

Das 3'-Ende der tRNA und seine Rolle bei der Proteinbiosynthese**

Von Stanislav Chládek und Mathias Sprinzl*

Während der Proteinbiosynthese wechselwirken das 3'-Ende der Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) und der Peptidyl-tRNA spezifisch mit Makromolekülen des Proteinbiosynthese-Apparats. Das 3'-Ende der tRNAs besteht aus einem invarianten C-C-A-Einzelstrang. Die Wechselwirkung des 3'-Endes der aa-tRNA mit dem Elongationsfaktor (EF) ist wichtig für die Bildung des aa-tRNA·EF-Tu·GTP-Komplexes und, nachdem dieser Komplex an das Ribosom gebunden ist, für die GTP-Hydrolyse. Diesem Vorgang folgt die spezifische Bindung des 3'-Endes der Aminoacyl-tRNA an die Acceptorstelle der ribosomalen Peptidyltransferase. In diesem Aufsatz wird ein Modell vorgestellt, nach welchem die C-C-Nucleotide des 3'-Endes der Aminoacyl-tRNA mit einer spezifischen G-G-Sequenz der ribosomalen 23S-RNA Watson-Crick-Basenpaare bilden. Ähnlich bindet die Peptidyl-tRNA mit ihrem 3'-Ende an die komplementäre Sequenz der ribosomalen 23S-RNA. Wir schlagen vor, daß die Bildung der Peptidbindung zwischen den beiden tRNAs durch einen Bereich der 23S-RNA katalysiert wird, der sich in der Nähe des 3'-Endes der Aminoacyl- und der Peptidyl-tRNA befindet. An der Bindung der 3'-Enden der beiden tRNAs sowie an der Katalyse sind zwei Schleifen der 23S-RNA beteiligt, welche durch Faltung in unmittelbare Nachbarschaft gebracht werden können. Das vorgeschlagene Modell setzt eine dynamische Struktur der ribosomalen RNA voraus, die durch Wechselwirkungen mit Elongationsfaktoren und ribosomalen Proteinen funktionell verändert und gesteuert wird.

1. Einleitung***

Die Proteinbiosynthese als zentraler Vorgang in der lebenden Zelle gehört zu den am intensivsten studierten Themen der Molekularbiologie. Mehrere Aspekte sind gegenwärtig in den Mittelpunkt des Interesses gerückt: Die Regulation der Proteinbiosynthese auf der Ebene der Translation^[3], die Prozessierung und der Transport der neu synthetisierten Proteine^[4,5] sowie die Genauigkeit der Proteinsynthese^[6]. Als Grundfragen bleiben jedoch der Mechanismus der Translation sowie Struktur und Funktion des Proteinbiosynthese-Apparats zu klären.

[*] Prof. Dr. M. Sprinzl
Laboratorium für Biochemie der Universität
Universitätsstraße 30, D-8580 Bayreuth

Prof. Dr. S. Chládek
Michigan Cancer Foundation, Chemistry Department
110 East Warren Avenue, Detroit, MI 48201 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde während des Gastaufenthaltes von S. C. im Laboratorium für Biochemie der Universität Bayreuth verfaßt.

[***] Standardabkürzungen der Aminosäuren und Nucleoside nach CBN-Empfehlungen (siehe [1, 2]): N, Nebularin (Purinribosid); F, Formycin; Ade, Adenin; Gua, Guanin; Cyt, Cytosin; Ura, Uracil. aa-tRNA, Aminoacyl-Transferribonucleinsäure; mRNA, messenger-Ribonucleinsäure (Boten-RNA); EF, Elongationsfaktor; IF, Initiationsfaktor. tRNA-Nucleotide sind nach dem Standardsystem auf der Basis von tRNA^{Phc} aus Hesse nummeriert: Das 3'-terminale Adenin hat immer die Nummer 76 [2]; tRNA-C-C-A, native tRNA mit der terminalen C-C-A-Sequenz; tRNA-C-C-2'dA, tRNA, die als 3'-terminales Nucleosid 2'-Desoxyadenosin enthält; tRNA-C-C-3'NH₂A, tRNA, die als terminales Nucleotid 3'-Amino-3'-desoxyadenosin enthält (ähnliche Abkürzungen für Isomere); tRNA^{Phc}, tRNA, die für Phenylalanin spezifisch ist (ähnlich für andere Aminosäuren); tRNA_{ox-red}, tRNA, in der die 2',3'-Bindung der 3'-terminalen Ribose oxidativ gespalten und der gebildete Dialdehyd zum Diol reduziert ist (Abb. 7); tRNA-U-C-A, tRNA, in welcher Cytidin-64 durch Uridin ersetzt ist (ähnlich bei anderen Derivaten); f, Formyl; Ac, Acetyl; GMPPCP, Guanylyl-5'-methylendiphosphonat; pA, Adenosin-5'-phosphat; MepA, Adenosin-5'-methylphosphat; AppA, Diadenosin-5',5'-diphosphat; Nps, o-Nitrophenylsulfeny; A-Stelle, Acceptorstelle des Ribosoms; P-Stelle, Peptidylstelle des Ribosoms, A'-Stelle, Acceptorstelle des Peptidyltransferase-Zentrums; P'-Stelle, Peptidylstelle des Peptidyltransferase-Zentrums.

Der wichtigste Schritt der Proteinbiosynthese ist aus chemischer Sicht die Bildung der Peptidbindung. Diese Reaktion, die am Ribosom stattfindet, besteht aus der Übertragung eines aktivierten Peptidrestes von der Peptidyl-tRNA auf die Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA. Das richtige Lesen der mRNA während der Translation hat größte Bedeutung, denn die Korrektur von Fehlern ist nach der Bildung einer neuen Peptidbindung für den Translationsapparat energetisch extrem ungünstig. Da bei der Proteinbiosynthese nur äußerst wenige Fehler vorkommen^[6], werden sie offenbar vor der Bildung der Peptidbindung korrigiert. Das tRNA-Adaptormolekül spielt in diesem Prozeß eine wichtige Rolle, da es einerseits das entsprechende Codon der mRNA genau erkennen muß und andererseits den Aminoacylrest der aa-tRNA auf die wachsende Peptidkette überträgt. Die Erkennung der aa-tRNA durch den Proteinbiosynthese-Apparat muß folglich ein komplexer Vorgang sein. Zwei Domänen der tRNA sind in diesem Prozeß besonders wichtig: zum einen die Anticodonschleife, die spezifisch mit dem Codon der mRNA wechselwirkt, und zum anderen das 3'-Ende, an dem die chemischen Reaktionen stattfinden.

Das 3'-Ende der tRNA besteht aus einem invarianten C-C-A⁷⁶-Einzelstrang^[2], der mit der Helix des Aminoacyl-stamms der tRNA durch ein nicht basengepaartes Nucleotid (meistens ein Purin) verbunden ist (Abb. 1). Die C-C-A-Sequenz der tRNA beteiligt sich nicht an tertiären Wechselwirkungen mit anderen Regionen des Moleküls und steht daher für intermolekulare Wechselwirkungen mit den Komponenten des Proteinbiosynthese-Apparats zur Verfügung. Der Aminoacylrest der aa-tRNA ist an die 2'(3')-Hydroxygruppe des terminalen Adenosins der tRNA über eine Esterbindung geknüpft. Die C-C-A-Sequenz der beladenen tRNA kann somit über spezifische Wechselwirkungen mit den ribosomalen Komponenten die Bindung des

Aminoacylrestes an die entsprechende Stelle des Ribosoms bewirken.

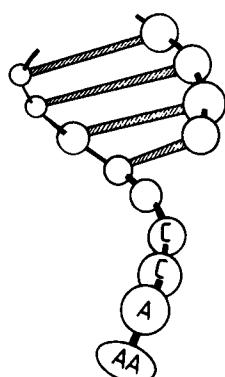


Abb. 1. Struktur des 3'-Endes der aa-tRNA, schematisch. Die letzten vier Nucleotide wechselwirken nicht mit dem Rest des tRNA-Moleküls; sie liegen wahrscheinlich gestapelt vor. AA = Aminoacylrest.

Die C-C-A-Sequenz der tRNA hat eine geordnete Struktur, die durch die gestapelten Nucleotidreste des Aminoacylstamms der tRNA stabilisiert wird. Diese Struktur wird wahrscheinlich auch durch die Enzyme des Proteinbiosynthese-Apparats erkannt. Das 3'-terminale Adenosin ist an der Stapelung beteiligt; schon kleine Strukturänderungen, z. B. die Aminoacylierung, können jedoch die Ordnung stören^[7,8]. Es wird angenommen, daß sich die Struktur der C-C-A-Sequenz schon durch kleinste Änderungen in der Umgebung beeinflussen läßt. Das 3'-Ende der tRNA kann deshalb als mobiles Vehikel dienen, das sich an verschiedene Partner des Translationssystems anpassen kann.

Dieser Aufsatz befaßt sich hauptsächlich mit der Rolle des 3'-Endes der tRNA bei der Proteinbiosynthese. Die molekularen Mechanismen zur Erkennung des 3'-Endes der tRNA werden hier vor allem auf der Grundlage chemischer Befunde diskutiert. Es ist zu hoffen, daß dadurch das Interesse für dieses Thema erweckt und außerdem das Verständnis der Vorgänge, die zur Proteinsynthese an Ribosomen führen, erleichtert wird.

Einige Aspekte dieses Themas wurden in den letzten Jahren zusammenfassend behandelt^[9-15]. Mit dem gesamten Mechanismus der Proteinbiosynthese haben sich mehrere Autoren beschäftigt^[16-18]; die Struktur der Ribosomen hat Wittmann eingehend besprochen^[19].

2. Eigenschaften der Aminoacyl-Esterbindung

2.1. Chemische Eigenschaften der Aminoacyl-Esterbindung

Die Esterbindung der aa-tRNA ist eine aktivierte, energiereiche Bindung. Die freie Energie der Hydrolyse der aa-tRNA ist etwa ebenso groß wie die freie Energie der Hydrolyse von ATP^[20]. Der Aminoacylrest der aa-tRNA ist an das Sauerstoffatom in 2'- oder an das in 3'-Position des terminalen Adenosins geknüpft. Die Veresterung der tRNA durch die Aminosäure wird von einer spezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthetase katalysiert. Ein vereinfachtes Reaktionsschema ist in Abbildung 2 dargestellt. Im ersten Schritt wird aus Aminosäure und ATP ein Aminoacyladenylat gebildet, daneben anorganisches Pyrophosphat, das

in einer weiteren enzymatischen Reaktion zu anorganischem Phosphat hydrolysiert wird. Diese gekoppelte Reaktion verschiebt das Gleichgewicht bei der Aktivierung der Aminosäure in Richtung auf das Produkt Aminoacyladenylat. Im zweiten Schritt wird der Aminoacylrest von Aminoacyladenosin auf den 3'-terminalen Adenosinrest der tRNA übertragen; diese Reaktion wird ebenfalls durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase katalysiert. Prinzipiell kann die 2'- oder die 3'-Hydroxygruppe des terminalen Adenosins als Acceptor des Aminoacylrestes dienen. Die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sind aber nur für eine Hydroxygruppe spezifisch^[14,21]. Es ist bemerkenswert, daß der Fehleranteil der Gesamtreaktion, d.h. der Aktivierung und der Übertragung des Aminoacylrestes, sehr niedrig ist. Diese hohe Genauigkeit der zweistufigen Aminoacylierung wird durch eine enzymatische Korrekturstufe erreicht^[22-24].

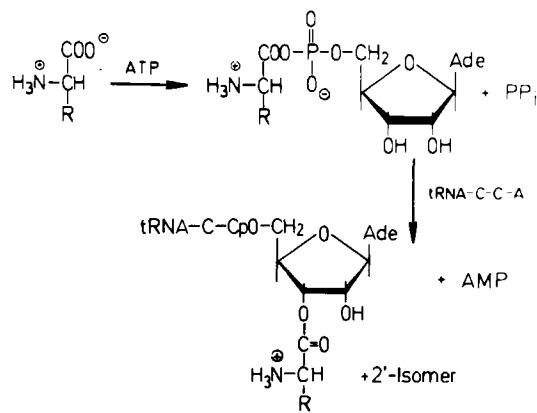


Abb. 2. Enzymatische Aminoacylierung der tRNA. Beide Reaktionsschritte werden durch die entsprechende spezifische aa-tRNA-Synthetase katalysiert.

Unter der Annahme, daß bei der Aminoacylierung nur das reine 2'- oder 3'-Isomer der aa-tRNA gebildet wird, sind für die aa-tRNA in Lösung zwei spontan ablaufende, konkurrierende Reaktionen möglich: a) Hydrolyse unter Bildung einer freien Aminosäure und unbeladener tRNA und b) Transacylierung des Aminosäurerestes zwischen den vicinalen cis-Hydroxygruppen des 3'-terminalen Adenosins, bei welcher ein Gleichgewichtsgemisch der 2'- und 3'-Aminoacylester der tRNA entsteht (Abb. 3). Beide chemischen Prozesse wurden intensiv untersucht. Die Hydrolyse des Aminoacylrestes der aa-tRNA wird durch die benachbarte 3'(2')-Hydroxygruppe begünstigt^[25]. Dieser Effekt wird allerdings oft überschätzt. Eine native aa-tRNA, die durch Adenosin terminiert ist, hydrolysiert nur etwa dreimal schneller als eine aa-tRNA, die am 3'-Ende Desoxyadenosin enthält^[26]. Die 2'(3')-Hydroxygruppe der Ribose ist eine schlechte Abgangsgruppe für eine Hydrolyse ($pK = 12.5$), ist aber immer noch saurer als z. B. Ethanol ($pK = 16$). Diese Eigenschaft der 2'(3')OH-Gruppe der Ribose beruht auf der elektronenziehenden Wirkung des Sauerstoffatoms im Ribosering. aa-tRNA hydrolysiert etwa 30mal schneller als ein Aminoacyl-alkylester. Dieser Unterschied wird hauptsächlich durch die pK -Differenz der Abgangsgruppen von 3.5 verursacht, die eine Änderung der Hydrolysegeschwindigkeit um den Faktor zehn ergibt^[27]. Der Effekt der benachbarten OH-Gruppe erhöht

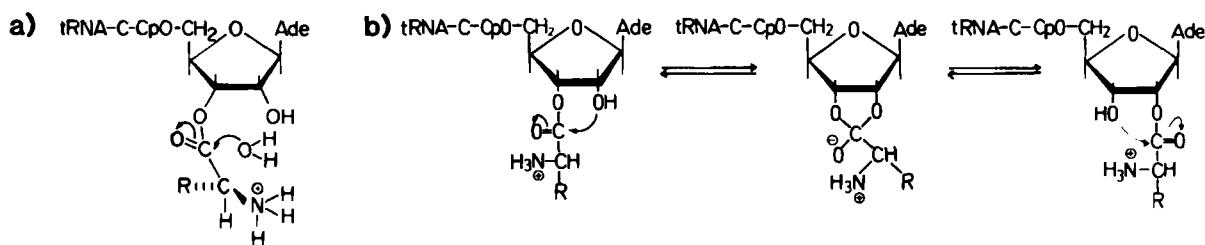


Abb. 3. a) Hydrolyse des Aminoacylrestes der aa-tRNA. b) Transacylierung des Aminoacylrestes zwischen 2'- und 3'-Hydroxygruppen der aa-tRNA. Die Bildung des intermediären Orthoesters wird durch die protonierte α -Aminogruppe des Aminoacylrestes begünstigt.

die Hydrolysegeschwindigkeit dagegen nur um das Dreifache^[27].

Aminoacylierte Pyrimidin- oder Purinnucleotide und aa-tRNAs mit dem gleichen Aminoacylrest haben sehr ähnliche Hydrolysegeschwindigkeiten^[28,29]. Dies deutet darauf hin, daß weder die terminale Nucleobase noch die Polynucleotidkette der aa-tRNA die Reaktivität der Esterbindung beeinflußt. Die Unterschiede in den Hydrolysegeschwindigkeiten von aa-tRNAs, die verschiedene Aminosäuren enthalten, sind aber beträchtlich^[30].

Die Geschwindigkeitskonstanten für die Hydrolyse der Methylester von Aminosäuren können gut mit den Taft-Substituentenkonstanten σ korreliert werden^[31]. Ausnahmen sind Valin- und Isoleucin-methylester, bei denen wahrscheinlich die Kettenverzweigung in der Nähe des Reaktionszentrums zur sterischen Hinderung und dadurch zur Verlangsamung der Hydrolyse führt. Der Hauptfaktor, der den nucleophilen Angriff an der Carbonylgruppe eines Aminoacylestes erleichtert, ist der induktive ($-I$)-Effekt der protonierten α -Aminogruppe. Beispielsweise wird Val-tRNA mit positiv geladener α -Aminogruppe 90mal schneller als die neutrale Form derselben aa-tRNA hydrolysiert^[27]. Das Fehlen einer protonierten α -Aminogruppe bei *N*-Acylaminoacyl-tRNA^[27] oder Phenyllactyl-tRNA^[32] erklärt ihre hohe Stabilität gegenüber alkalischer Hydrolyse. Da die pK -Werte der α -Aminogruppe von aa-tRNAs zwischen 7 und 8 liegen^[33], wird die Hydrolysegeschwindigkeit der aa-tRNAs bei physiologischen pH-Werten wesentlich von der Protonierung der entsprechenden Aminogruppe abhängen. Es ist deshalb zu erwarten, daß sich die Hydrolysegeschwindigkeiten verschiedener Aminoacyl-tRNAs im physiologischen pH-Bereich am stärksten unterscheiden.

Die Geschwindigkeit der Transacylierung des 2'(3')-O-Aminoacylestes von Adenosin und Adenosin-5'-phosphat wurde kürzlich NMR-spektroskopisch bestimmt^[34]. In wäßriger Pufferlösung bei pH 7.3 und 37°C beträgt die Geschwindigkeitskonstante für die Umwandlung eines 2'-O-Aminoacyladenosins in das 3'-Derivat $3-11\text{ s}^{-1}$; für die 3'→2'-Transacylierung wurden $1-4\text{ s}^{-1}$ gemessen. Auch die Transacylierungsgeschwindigkeit hängt in erster Linie von der Protonierung der α -Aminogruppe ab: Der protonierte Aminoacylrest wandert etwa 100fach schneller als der unprotonierte. Dies beruht auf dem induktiven Effekt der protonierten Aminogruppe, die wahrscheinlich bei der Transacylierung durch ionische Wechselwirkung auch die intermediäre Orthoesterstruktur stabilisiert (Abb. 3b). Die 5'-Phosphatgruppe des terminalen Adenosins sowie geladene funktionelle Seitengruppen der Aminosäuren, z. B.

bei Lysin oder Glutaminsäure, beeinflussen die Geschwindigkeit der Transacylierung fast nicht. Überdies scheinen auch die terminale C-C-A-Sequenz der aa-tRNA und andere Strukturelemente der Polynucleotidkette der tRNA die Geschwindigkeit der Transacylierung nicht wesentlich zu verändern.

Die Gesamtgeschwindigkeit der Proteinbiosynthese in *E. coli* entspricht in vivo dem Einbau von etwa 15 bis 20 Aminosäureresten pro Sekunde^[35]. Die Geschwindigkeit der spontanen 2'↔3'-Transacylierung ist somit im Vergleich zur Gesamtgeschwindigkeit der Biosynthese gering. Es ist durchaus vorstellbar, daß eine enzymatische Aktivität in der Zelle vorhanden ist, welche die Transacylierung zum jeweils erforderlichen (2'- oder 3')-Isomer der aa-tRNA katalysiert^[36].

2.2. Konformation des Aminoacylrestes

Über die Konformation des Aminoacylrestes der aa-tRNA und die möglichen Wechselwirkungen mit der Polynucleotidkette der tRNA gibt es wenig Informationen. Die physikalisch-chemischen Untersuchungen dieses Problems sind vor allem durch die Labilität der Esterbindung der aa-tRNA sowie durch die relativ großen Substanzmengen, die für solche Untersuchungen notwendig sind, erschwert. Die Kristallisation der aa-tRNA ist noch nicht gelungen. Eine Kristallstrukturanalyse wurde deshalb nur an Puromycin, einem stabilen Analogon von 3'-O-Aminoacyladenosin durchgeführt^[37] (vgl. Legende zu Abb. 14). Diese Studien haben keinen Hinweis auf eine Wechselwirkung zwischen der Aminoacylseitenkette und dem Adenosinrest ergeben. Es konnte jedoch beobachtet werden, daß sich die Struktur der Polynucleotidkette der aa-tRNA bei der Aminoacylierung ändert^[38,39], doch ist die Natur dieser Änderungen unbekannt. Die Kristallisation stabiler aa-tRNA-Analoga^[39] und eine hochauflösende NMR-Studie an solchen Substanzen könnten wesentlich zur Klärung dieses Problems beitragen.

3. Analoga der Aminoacyl-tRNA

Einige Aspekte der Funktion des 3'-Endes der tRNA wurden unter Verwendung von Analoga aufgeklärt. Im Prinzip können zwei Arten von Analoga benutzt werden: tRNA-Spezies mit modifizierten Bausteinen, die in das 3'-Ende der Polynucleotidkette eingebaut werden, sowie 3'-terminale Fragmente der aa- oder Peptidyl-tRNA, welche ebenfalls modifizierte Bausteine enthalten können.

3.1. Modifizierte Aminoacyl- und Peptidyl-tRNAs

Der Einbau modifizierter Nucleotide in das 3'-Ende der tRNA gelingt durch Kombination von chemischen und enzymatischen Reaktionen. Einige synthetische Nucleosid-5'-triphosphate sind Substrate für die ATP (CTP): tRNA-Nucleotidyltransferase und können in tRNAs eingebaut werden. Auf diese Weise ist es möglich, die natürlichen CMP- und AMP-Reste der C-C-A-Sequenz der tRNA zu ersetzen (Abb. 4)^[40]. Diese Strategie wurde für die Herstel-

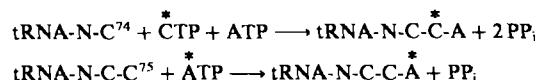


Abb. 4. Enzymatischer Einbau von CTP- und ATP-Analoga in verkürzte tRNAs mit ATP (CTP): tRNA-Nucleotidyltransferase. C* und A* sind modifizierte Cytidin- bzw. Adenosineinheiten. N bedeutet hier ein beliebiges Nucleotid.

lung von tRNAs 1 und 2 mit terminalem Desoxyadenosin angewendet^[14, 21], die in aa-tRNAs überführt werden können. Bei solchen aa-tRNA unterbleibt die 2'(3')-Isomerisierung, da die benachbarte OH-Gruppe am terminalen Adenosin fehlt. tRNA-Derivate mit 2'-Amino-2'-desoxyadenosin 4 oder 3'-Amino-3'-desoxyadenosin 3 am 3'-terminalen Ende wurden ähnlich hergestellt^[40, 41] (Abb. 5). Auch die Cytidinreste in den Positionen 74 und 75 können durch modifizierte Nucleotide ersetzt werden. Die für solche Synthesen notwendigen verkürzten tRNAs (tRNA-N⁷³, tRNA-N-C⁷⁴ oder tRNA-N-C-C⁷⁵) werden durch partiellen Abbau der nativen tRNA-N-C-C-A⁷⁶ mit Schlangengift-Phosphodiesterase^[42] oder Polynucleotid-Phosphorylase^[43] hergestellt. Ein stufenweiser Abbau der Nucleotide über Periodat-Oxidation, β-Eliminierung und Phosphatase-Behandlung wurde vor allem bei der Herstellung von großen Mengen verkürzter tRNAs angewendet. Der Nachteil dieser chemischen Methode ist die Desaktivierung einiger tRNA-Spezies während der Periodat-Behandlung^[40].

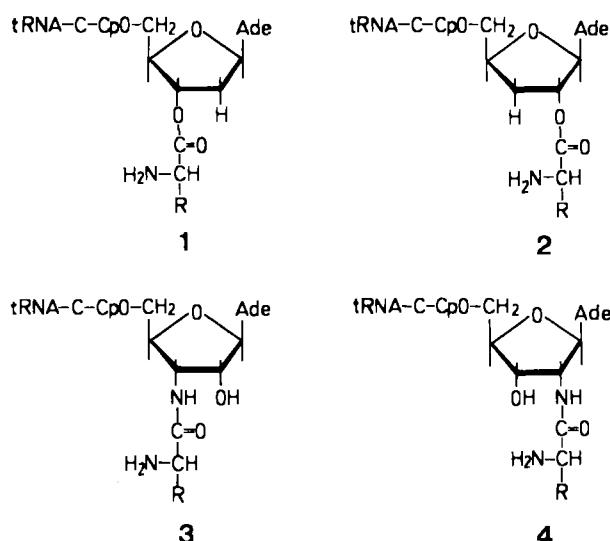


Abb. 5. Nicht isomerisierbare aa-tRNA-Analoga aa-tRNA-C-C-2'dA 1, aa-tRNA-C-C-3'-dA 2, aa-tRNA-C-C-3'NH₂A 3 und aa-tRNA-C-C-2'NH₂A 4.

Seit kurzem werden 3'-modifizierte tRNAs auch durch den Einbau von Polynucleotiden in das 3'-Ende der tRNAs mit RNA-Ligase hergestellt (Abb. 6). Als Acceptor^[44] dienen die verkürzten tRNAs; Donormoleküle sind entweder 5'-phosphorylierte Oligoribonucleotide^[45-47], in denen die 3'-Hydroxygruppe geschützt ist, oder Derivate von 5',5'-Diadenosindiphosphat (AppA-X), wobei X den Substituenten an der 3'- oder 2'-Hydroxygruppe des Donoradenosins symbolisiert^[48].

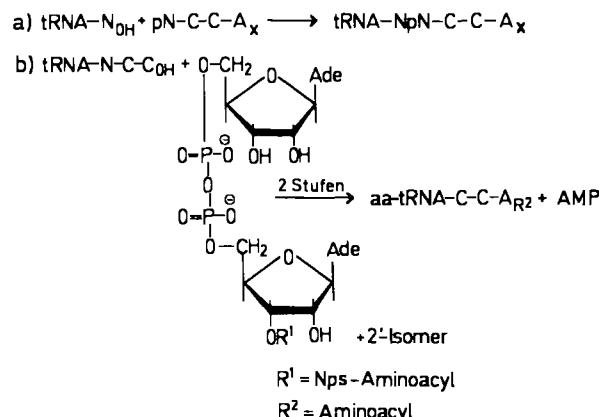


Abb. 6. Enzymatische Synthese von modifizierten aa-tRNAs mit RNA-Ligase. Die verkürzte tRNA kann entweder mit dem 3'-blockierten Tetranucleotid-Donor reagieren (a), oder die Verlängerung wird durch Reaktion mit AppA, das eine N-geschützte Aminosäure enthält, erreicht (b). Nach der enzymatischen Kondensation mit RNA-Ligase wird die *o*-Nitrophenylsulfenyln(Nps)-Schutzgruppe entfernt (nach [48]). N bedeutet hier ein beliebiges Nucleotid.

3.2. 3'-terminale Fragmente der Aminoacyl- oder Peptidyl-tRNA

Diese Fragmente sind Nucleoside oder Oligoribonucleotide von unterschiedlicher Länge und können durch spezifische enzymatische Spaltung der aa-tRNAs gewonnen werden. Die Methode bleibt natürlich auf Sequenzen beschränkt, die in nativen tRNAs vorkommen^[49]. Durch chemische Synthese können auch Analoga hergestellt werden, z. B. mit Modifikationen im Aminoacylrest der Nucleobase oder im Zuckerrest^[50].

4. Definition der Einzelschritte der Proteinbiosynthese; Testsysteme für diese Schritte

4.1. Definition der Einzelschritte

Für unsere Diskussion ist es ausreichend, wenn diejenigen Einzelschritte der Proteinbiosynthese, an denen das 3'-Ende der Aminoacyl-tRNA teilnimmt, kurz definiert werden. Wir werden dabei das (leicht modifizierte) klassische Zweibindungsstellen-Modell benutzen, das Watson^[51] vor etwa 20 Jahren vorgeschlagen hatte. Abbildung 7 zeigt das Prinzip. Das 70S-Ribosom hat zwei funktionell definierte Bindungsstellen, die Acceptor-(A-) und die Donor- oder Peptidyl-(D- oder P-)Stelle. Die an der A-Stelle gebundene aa-tRNA reagiert mit dem Peptidylrest der an der P-Stelle gebundenen Peptidyl-tRNA. Der Peptidylrest wird dabei

auf den Aminoacylrest der aa-tRNA übertragen. Die 3'-terminale C-C-A-Sequenz der beiden tRNAs ist während dieses Prozesses in Kontakt mit den Teilbereichen A' und P', die sich im Peptidyltransferase-Zentrum des Ribosoms befinden^[52].

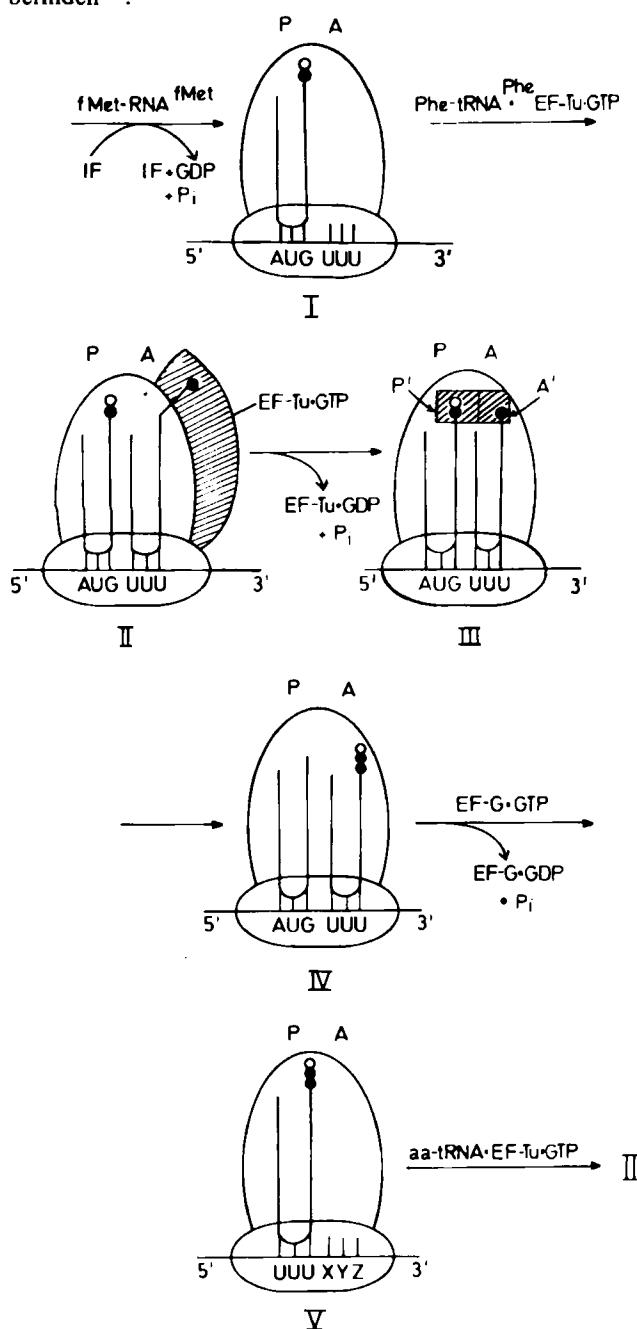


Abb. 7. Schematische Darstellung des ribosomalen Cyclus mit Einzelschritten des Elongationsprozesses (siehe Text). Die Bindungsstellen A und P enthalten spezielle Teile A' und P', welche sich im Peptidyltransferase-Zentrum befinden und die terminale C-C-A-Sequenz der Aminoacyl- und Peptidyl-tRNA binden.

Während der Initiation der Polypeptidsynthese wird die Initiator-tRNA (fMet-tRNA) an der P-Stelle gebunden (Komplex I). Im Laufe des Elongationszyklus finden mehrere Reaktionen statt: aa-tRNA (in Abb. 7 Phe-tRNA^{Phe}) setzt sich zunächst zum ternären Komplex aa-tRNA · EF-Tu · GTP um. Dieser Komplex bindet dann an das Ribosom in einer durch mRNA definierten, codonabhängigen Reaktion. Zwischenstufe ist wahrscheinlich der Komplex II, der EF-Tu · GTP enthält, das die Reaktion zwischen der aa-tRNA und der Peptidyl-tRNA (fMet-tRNA) verhindert.

Eine minimale Bewegung des 3'-Endes der aa-tRNA ist notwendig, um die im Komplex III angedeutete Stellung zu erreichen. Diese Akkomodationsstufe wird nach Hydrolyse von GTP und anschließender Dissoziation des EF-Tu · GDP-Komplexes vom Ribosom durchlaufen^[53, 54]. Im Komplex III befindet sich die aa-tRNA in der eigentlichen A'-Bindungsstelle; die Peptidyltransferase-Reaktion kann beginnen. Diese Reaktion wird wahrscheinlich durch eine enzymatische Aktivität, die Bestandteil der 50S-Untereinheit des Ribosoms ist, katalysiert; Proteine und externe Energie sind nicht notwendig (siehe Abschnitt 6). Durch die Übertragung des Peptidylrestes (oder von fMet) auf die α-Aminogruppe der aa-tRNA wird der Prätranslokationskomplex gebildet (Komplex IV). Die neugebildete Peptidyl-tRNA ist nun an der A-Stelle gebunden. Damit die nächste Runde des cyclischen Prozesses stattfinden kann, muß die Peptidyl-tRNA auf die P-Stelle übertragen werden. An dieser Translokation nimmt ein weiterer Proteinfaktor teil, der Elongationsfaktor G (EF-G). Dabei wird ein Molekül GTP hydrolysiert. Gleichzeitig dissoziiert die desacylierte tRNA aus dem ribosomalen Komplex, und die Peptidyl-tRNA (fMetPhe-tRNA in Abb. 7) verschiebt sich zusammen mit der mRNA an die P-Stelle. Dadurch wird das nächste Codon X-Y-Z an die A-Stelle des Ribosoms gebracht. Falls ein Nonsensecodon der mRNA (U-A-A, U-G-A oder U-A-G, das kein Codewort für eine Aminosäure ist) die A-Stelle erreicht, wird unter Beteiligung eines Terminationsfaktors bei gleichzeitiger GTP-Hydrolyse die Termination der Proteinbiosynthese eingeleitet: Unter Mitwirkung der Peptidyltransferase wird die Peptidyl-tRNA hydrolysiert, und das neu synthetisierte Peptid verläßt das Ribosom.

Nierhaus et al.^[55, 56] haben kürzlich ein Dreibindungsstellen-Modell für das Ribosom vorgeschlagen. Die dritte Stelle (E-Stelle, „exit-site“) kann nach dieser Vorstellung durch eine desacylierte tRNA besetzt werden. Die Dissoziation der tRNA aus der E-Stelle findet gleichzeitig mit der Bindung eines neuen ternären aa-tRNA · EF-Tu · GTP-Komplexes an die ribosomale A-Stelle statt. Nach der Bildung der neuen Peptidbindung zwischen der aa-tRNA in der A-Stelle und der Peptidyl-tRNA in der P-Stelle wird durch Translokation die neugebildete Peptidyl-tRNA in die P-Stelle und die desacylierte tRNA in die E-Stelle des Ribosoms übertragen. Der Einfachheit halber werden wir hier das klassische Zweistellen-Modell verwenden; diese Vereinfachung hat keine Auswirkungen auf die folgende Diskussion.

4.2. Testsysteme für die Einzelschritte der Proteinbiosynthese

4.2.1. Wechselwirkung der aa-tRNA mit EF-Tu

Die Fähigkeit von EF-Tu · GTP, an die aa-tRNA zu binden, kann mit mehreren Methoden wie Gelfiltration und Affinitätschromatographie oder durch Hydrolyseschutzexperimente demonstriert werden^[57-60]. Die 2'(3')-O-Aminoacyl oligonucleotide wechselwirken mit EF-Tu · GTP nur in sehr hoher Konzentration und bilden keine stabilen ternären Komplexe^[61]. Die Wechselwirkung der modifizierten aa-tRNAs mit EF-Tu · GTP kann auch direkt durch die

EF-Tu·GTP-abhängige Bindung an die A-Stelle des programmierten Ribosoms untersucht werden. Bei diesem Test wird gewöhnlich die P-Stelle des Ribosoms durch eine desacylierte tRNA besetzt. Gleichzeitig mit der Bindung der aa-tRNA an die A-Stelle des Ribosoms kann auch die EF-Tu- und aa-tRNA-abhängige GTPase-Reaktion, welche diesen Bindungsprozeß begleitet, gemessen werden^[62].

Sowohl aa-tRNA als auch 2'(3')-O-Aminoacyl oligonucleotide schützen EF-Tu·GTP gegen Desaktivierung durch das L-Phenylalaninderivat (*S*)-N-(1-Benzyl-3-chlor-2-oxo-propyl)-*p*-toluolsulfonamid^[63]. Diese Verbindung reagiert in Abwesenheit der aa-tRNA oder der aminoacylierten Oligonucleotide mit einer essentiellen SH-Gruppe des Proteins^[11]. Der resultierende Schutz dieser SH-Gruppe kann als indirekter Bindungstest verwendet werden.

Eine sehr bequeme Methode zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen 2'(3')-O-Aminoacyl oligonucleotiden mit EF-Tu·GTP erfordert die Messung der EF-Tukatalysierten GTPase-Aktivität, welche durch die Oligonucleotide induziert wird. Im einfachsten Test wird EF-Tu·GTPase durch das Antibioticum Kirromycin induziert und weiter durch ein 2'(3')-O-Aminoacyl oligonucleotid stimuliert^[54, 64]. Aus dem Ausmaß dieser Stimulation kann man Schlüsse auf die Wechselwirkung der Substrate mit EF-Tu·GTP ziehen. In einem zweiten Testsystem wird EF-Tu·GTPase in Anwesenheit von 70S-Ribosomen gemessen. Die 2'(3')-O-Aminoacyl oligonucleotide induzieren diese Reaktion^[65] in Gegenwart von desacylierten tRNAs und mRNAs^[66].

4.2.2. Bindung der aa-tRNA an die ribosomale A- oder P-Stelle

Die Untersuchungen der enzymatischen Aktivität der modifizierten aa-tRNAs zeigen, daß einige von ihnen sowohl gegenüber Ribosomen als auch gegenüber EF-Tu eine Affinität aufweisen. Einige modifizierte aa-tRNAs, die mit EF-Tu·GTP keine Komplexe bilden (z.B. Phe-tRNA-C-C-3'NH₂A)^[57], können jedoch in Gegenwart von mRNA und bei speziellen ionischen Bedingungen (meistens höherer Mg²⁺-Konzentration) nichtenzymatisch an die ribosomale A-Stelle gebunden werden^[67]. Die Gegenwart der desacylierten, korrekt codierten tRNA an der P-Stelle des Ribosoms stimuliert die Bindung der aa-tRNA an die A-Stelle^[68]. Die enzymatische Bindung der Peptidyl-tRNA an die P-Stelle des Ribosoms kann durch Translokation in Gegenwart von EF-G und GTP oder im Falle von fMet-tRNA^{fMet} in Gegenwart von Initiationsfaktoren und GTP erreicht werden. Eine nichtenzymatische Bindung der Peptidyl-tRNA an die ribosomale P-Stelle ist unter passenden ionischen Bedingungen ebenfalls möglich^[69].

Die Aminoacyl- und Peptidyl-tRNAs können auch als Acceptoren oder Donoren in der Peptidyltransferase-Reaktion untersucht werden. Dabei kann die Bildung des Peptids gemessen und das Peptid chromatographisch identifiziert werden. Voraussetzung für diese Reaktion ist die korrekte Bindung der Substrate an die entsprechende ribosomale Stelle. Ein ähnlicher Weg wird auch bei Studien mit tRNA-Fragmenten beschritten. In typischen Systemen werden Oligolysyl-tRNA, AcPhe-tRNA^{Phe} oder fMet-tRNA^{fMet} als Donormoleküle in Gegenwart einer geeigneten mRNA verwendet^[70, 71].

Um die 2'(3')-O-(N-Acylaminoacyl)oligonucleotide als potentielle Donoren in der Peptidyltransferase-Reaktion mit aa-tRNA oder Puromycin als Acceptoren zu untersuchen, müssen Ethanol und ein Puffer höherer Ionenstärke im Reaktionsgemisch vorhanden sein, jedoch ist bei dieser „Fragmentreaktion“^[72] keine mRNA notwendig. Unter diesen Bedingungen können die kompletten 70S-Ribosomen durch 50S-Untereinheiten ersetzt werden. Es wurde ursprünglich angenommen, daß Ethanol bei dieser Reaktion die Wechselwirkung zwischen den Substraten und ihren Bindungsstellen begünstigt^[73]. Andere Autoren^[74, 75] haben Konformationsänderungen an ribosomalen Bindungsstellen unter dem Einfluß von organischen Lösungsmitteln vorgeschlagen. Obwohl die genaue Funktion von Ethanol bei der Fragmentreaktion nicht geklärt ist, scheint es sicher zu sein, daß er die Spezifität der Peptidyltransferase-Reaktion nicht beeinflußt^[76, 77].

Verbindungen wie C-C-A-Phe binden in Gegenwart von Ethanol und hoher Mg²⁺-Konzentration^[78] an die A'-Stelle des 70S-Ribosoms. In Abwesenheit von Ethanol ist für die Bindung die Gegenwart von tRNA^{Phe} und Poly(U) notwendig^[79]. Verbindungen wie U-A-C-C-A(AcLeu) binden unter Bedingungen der Fragmentreaktion an die ribosomale P'-Stelle^[80].

Die Anwendung der Fragmentreaktion auf Fragmente, die vom 3'-Ende der aa-tRNA oder Peptidyl-tRNA stammen, hat mehrere Vorteile. So ist es möglich, die Wechselwirkung des 3'-terminalen Teils der tRNA mit dem Peptidyltransferase-Zentrum des Ribosoms oder mit dem aktiven Zentrum von EF-Tu isoliert und unabhängig von den anderen Teilen der tRNA zu beobachten. Es ist bemerkenswert, daß die Ergebnisse, die mit Fragmenten sowie mit intakten tRNAs in ribosomalen Testsystemen erhalten wurden, gut miteinander übereinstimmen^[62, 81].

5. Beteiligung des 3'-Endes der Aminoacyl-tRNA an Wechselwirkungen mit den Komponenten des Proteinbiosynthese-Apparats

An dieser Stelle werden folgende Wechselwirkungen des 3'-Endes der aa-tRNA erörtert: a) mit Initiationsfaktoren und Ribosomen bei der Initiation, b) mit dem Elongationsfaktor Tu bei der enzymatischen Bindung der aa-tRNA an das Ribosom und c) mit der Acceptor- und der Donorstelle der Peptidyl-Transferase.

5.1. Wechselwirkungen mit Initiationsfaktoren

Über die Wechselwirkung des 3'-Endes der Initiator-tRNA fMet-tRNA^{fMet} mit Initiationsfaktoren ist wenig bekannt^[82]. Klar ist jedoch, daß die Initiationsfaktoren in diesem Prozeß vor allem solche Strukturelemente der tRNA erkennen müssen, die in der Initiator-tRNA und den übrigen Elongator-tRNAs unterschiedlich sind^[83]. Gebundene fMet-tRNA^{fMet} reagiert mit Puromycin. Dies legt nahe, daß fMet-tRNA^{fMet} an der P-Stelle des Ribosoms gebunden wird. Sowohl die P-Stelle als auch der Initiationsfaktor IF-2 unterscheiden zwischen formylierten und nicht formylierten Met-tRNAs. Durch Modifikation der C-C-A-Sequenz der tRNA^{fMet} kann die Bindung an das Ribosom beeinflußt werden: So wird z.B. AcPhe-tRNA^{Phe}_{ox-red} 5b

(Abb. 8) mit geöffneter 2'-3'-Bindung in den von Initiationsfaktoren abhängigen Prozessen nicht mehr an die P-Stelle gebunden^[84]. Auch fMet-tRNA^{fMet}-U-C-A bindet nur sehr schlecht an die ribosomale P-Stelle^[85].

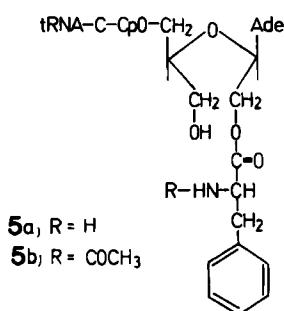


Abb. 8. Phe-tRNA^{Phe} **5a** und AcPhe-tRNA^{Phe} **5b**.

tRNA^{fMet} wird enzymatisch an der 2'-OH-Gruppe der terminalen Ribose aminoacyliert^[14]. Die Formylierung findet jedoch spezifisch an Methionin statt, das in 3'-Position der terminalen Ribose gebunden ist. Die Transacylierung von Methionin in Met-tRNA^{fMet} muß deshalb vor der Formylierung ablaufen. Das 3'-Isomer der fMet-tRNA^{fMet} nimmt am Initiationsprozeß in Gegenwart von Initiationsfaktoren, mRNA und 70S-Ribosom teil^[86].

5.2. Wechselwirkung mit dem Elongationsfaktor Tu

Durch Quervernetzung der aa-tRNA mit dem EF-Tu·GTP-Komplex konnte bewiesen werden, daß der ternäre aa-tRNA·EF-Tu·GTP-Komplex eine echte Zwischenstufe bei der enzymatischen Bindung der aa-tRNA an das Ribosom ist^[87]. Bei der Bildung des ternären Komplexes sowie bei der folgenden Bindung der aa-tRNA an das Ribosom unter GTP-Hydrolyse spielt das 3'-Ende der aa-tRNA neben anderen Teilen der tRNA eine Schlüsselrolle^[88-91]. Vor allem der doppelhelicale Acceptorstamm der tRNA in direkter Nachbarschaft der C-C-A-Sequenz ist an der Erkennung von EF-Tu beteiligt. Dies konnte durch Experimente demonstriert werden, in welchen der pC-Rest des 5'-Endes der Met-tRNA^{fMet}, die nur ein schwaches Substrat für EF-Tu·GTP ist, chemisch zu einem pU-Rest umgewandelt wurde. Die derart modifizierte tRNA wird durch EF-Tu erkannt, offenbar deshalb, weil durch die Modifizierung ein voll basengepaarter Acceptorstamm entstanden ist^[92]. Das Fehlen dieses wichtigen Strukturmerkmals bei bakteriellen tRNAs^{fMet} erklärt die nur sehr schwache Wechselwirkung der Met-tRNA^{fMet} mit EF-Tu·GTP.

5.2.1. Der Aminoacylrest

Der Aminoacylrest der aa-tRNA ist wesentlich für die Bindung an EF-Tu·GTP; zwischen desacylierter tRNA und EF-Tu·GTP wurde nur eine schwache Wechselwirkung beobachtet^[11, 63, 93]. Die α-Aminogruppe der aa-tRNA ist im Komplex mit EF-Tu·GTP gegen weitere (chemische) Acylierung geschützt. Daraus kann man schließen, daß diese Aminogruppe wahrscheinlich an der Bindung an

das Protein beteiligt ist^[94]. Austausch des Aminoacylrests der aa-tRNA durch die Phenyllactoyl-^[95] oder Cinnamoylgruppe (**6** bzw. **7**; Abb. 9)^[96] erniedrigt die Bindungseffizienz um das 300fache. Dieser Befund demonstriert die Bedeutung der α-Aminogruppe und weist zugleich darauf hin, daß die Esterfunktion dieser Analoga zur Wechselwirkung mit EF-Tu·GTP wesentlich beiträgt.

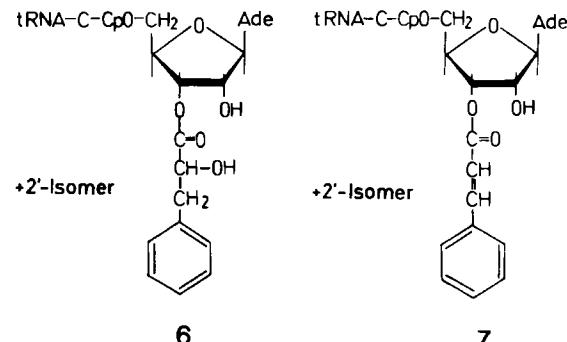


Abb. 9. Phenyllactoyl- **6** und Cinnamoyl-tRNA^α **7**.

Es wurde vorgeschlagen, daß die 5'-Phosphatgruppe der tRNA eine intramolekulare Salzbrücke mit der protonierten α-Aminogruppe des Aminoacylrestes bildet, und daß EF-Tu·GTP diese Struktur als Erkennungsmerkmal benutzt^[92]. Diese Hypothese erwies sich als unzutreffend, da es zwischen nativer aa-tRNA und 5'-dephosphorylierter aa-tRNA bei der Komplexbildung mit EF-Tu·GTP kaum Unterschiede gibt^[97]. Der Aminoacylrest der aa-tRNA ist im Komplex mit EF-Tu·GTP vor Hydrolyse geschützt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß der Aminoacylrest an der Komplexbildung mit dem Protein beteiligt ist^[59, 60].

EF-Tu wechselt bevorzugt mit L-Aminoacyl-tRNA; die Derivate der D-Aminosäuren binden viel schwächer^[66, 98, 99]. Diese Spezifität ist aber nicht absolut. EF-Tu kann z. B. funktionell mit den achiralen 2'(3')-O-Aminoacyl oligonucleotiden **8a** und **8b** (Abb. 10) wechselwirken. Diese Analoga enthalten einen weiteren Substituenten am α-C-Atom (α-Aminoisobuttersäure und Cycloleucin)^[54, 66]. Diese Befunde deuten auf eine gewisse Flexibilität der Wechselwirkung der Aminosäure mit EF-Tu.

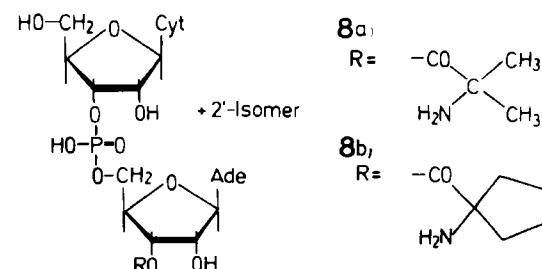


Abb. 10. 2'(3')-O-(α-Aminoisobutyryl)- **8a** und Cycloleucyl-Derivate von C-A **8b**. Cycloleucin ist 1-Amino-1-cyclopentancarbonsäure.

Auch die Seitenkette der Aminosäure beeinflußt die Effizienz der Wechselwirkung zwischen aa-tRNA und EF-Tu·GTP^[60, 100, 101]. Die Aktivität von aa-tRNA-Fragmenten wie 2'(3')-O-Aminoacyl-nucleosiden und -oligonucleotiden

bei der EF-Tu·GTPase-Reaktion hängt ebenfalls von der Seitenkette ab^[63, 66, 91]. Deshalb wurde vorgeschlagen, daß EF-Tu eine Bindungsstelle für die Seitenkette haben muß^[60], wobei die Wechselwirkung mit basischen und aromatischen Aminosäuren am stärksten ist. Eine derartige „Tasche“ für die Bindung der Aminosäureseitenkette der aa-tRNA wurde ursprünglich auch für die A'-Stelle der Peptidyl-Transferase postuliert^[71]. Durch Messung der Wechselwirkung von 2'- und 3'-isomeren aa-tRNAs mit EF-Tu·GTP kann man die Existenz solcher Bindungsstellen überprüfen: Demnach können beide Isomere (vgl. 1 und 2) der aa-tRNA mit EF-Tu wechselwirken. Werden die für die Bindung wichtigen α -Aminogruppen dieser Isomere in dieselbe Position der Bindungstasche gebracht, so befinden sich die Seitenketten der Aminosäuren in unterschiedlichen Positionen (Abb. 11). Der Befund, daß aa-tRNA keine Präferenz für 2'- oder 3'-aa-tRNA zeigt, widerlegt deshalb die Hypothese von der Bindungstasche für aromatische oder basische Aminosäurereste an EF-Tu^[57, 102].

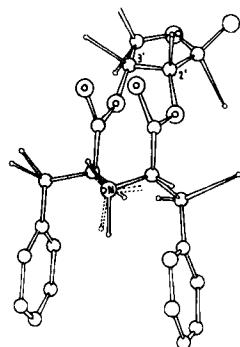


Abb. 11. Räumliche Darstellung der möglichen Konformation des 2'- und 3'-O-L-Aminoacylderivats von Adenosin am 3'-Ende der tRNA. Um die räumliche Anordnung der α -Aminogruppen und der Seitenketten zu demonstrieren, ist sowohl in 2'- als auch in 3'-Position ein Aminoacylrest eingezeichnet (nach [61, 62]).

Eine alternative Erklärung für die Rolle der Aminosäureseitenkette der aa-tRNA bei der Bildung des ternären Komplexes wäre, daß für die Wechselwirkung eine protonierte α -Aminogruppe notwendig ist. In welchem Ausmaß diese α -Aminogruppe protoniert wird, sollte von der Struktur der Seitenkette abhängen. Diese Annahme wird durch Messungen der pK-Werte der α -Aminogruppe verschiedener Aminoacylestere gestützt. Die Werte sind stark von der Struktur der Seitenkette abhängig^[33].

5.2.2. Der Zuckerrest

EF-Tu ist sehr empfindlich gegenüber Modifizierung der aa-tRNA am Riboserest des 3'-terminalen Adenosins. Die 3'-terminalen „Desoxy-aa-tRNAs“ 1 und 2 binden schwächer an EF-Tu·GTP als die nativen aa-tRNAs^[57, 102]. Keine oder sehr niedrige Aktivität bei der EF-Tu-abhängigen GTPase-Reaktion haben ebenfalls die 2'(3')-O-Aminoacylderivate von C-A, in denen die 2'(3')-Hydroxygruppe durch Methoxy oder Wasserstoff ersetzt ist^[54, 66]. Auch die Oxidation der *cis*-Diolfunktion des terminalen Adenosins führt zur Desaktivierung. Phe-tRNA^{Phe}_{ox-red} 5a bindet nicht mehr an EF-Tu·GTP^[62, 103]. Eine plausible Erklärung dafür ist, daß die für die Erkennung von EF-Tu notwendige

Stapelung der Nucleobasen des 3'-Endes durch diese Modifizierung empfindlich gestört wird^[71]. Die Derivate 3 und 4 mit 3'- bzw. 2'-Aminoacylamidobindung wechselwirken nicht mit EF-Tu·GTP^[57, 66], wie mit aa-tRNA sowie mit entsprechenden Fragmenten beobachtet wurde. Wahrscheinlich beruht der Aktivitätsverlust auf der starren Struktur der Acylamidobindung; die Esterbindung ist dagegen leicht beweglich^[57]. Vermutlich können die Aminoacylamidoderivate dadurch nicht an das Protein angepaßt werden. Es ist auch möglich, daß EF-Tu eine intermediaire Orthoesterstruktur der aa-tRNA (Abb. 12) erkennt. Die Bildung dieser Struktur ist weder mit den Analoga 3 und 4 noch mit den Desoxyverbindungen 1 und 2 möglich. Eine alternative Erklärung für die niedrigere Aktivität der Desoxyderivate 1 und 2 bei der Komplexbildung mit EF-Tu·GTP könnte auch in der Abwesenheit der vicinalen Hydroxygruppe liegen. Beim Versuch, die unterschiedliche Aktivität der aa-tRNA-Derivate bei der Wechselwirkung mit EF-Tu·GTP zu erklären, sollte auch die Konformation des Riboseringes und die darauf resultierende Orientierung des Aminoacylrestes berücksichtigt werden.

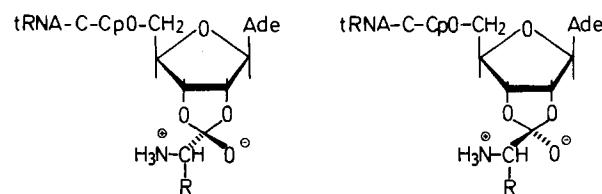


Abb. 12. Hypothetische Orthoesterstruktur der aa-tRNA (beide Diastereomere; vgl. Abb. 3).

5.2.3. Die C-C-A-Sequenz der aa-tRNA

Es gibt überzeugende Hinweise für die Beteiligung der 3'-terminalen C-C-A-Sequenz der aa-tRNA an der Wechselwirkung mit EF-Tu. Diese Sequenz ist z. B. gegen Nucleaseangriffe im ternären Komplex geschützt, jedoch für Basenpaarung mit komplementären Oligonucleotiden zugänglich^[104, 105]. Phe-tRNA^{Phe}-C-C-C-A⁷⁷ wechselwirkt nur sehr schwach mit EF-Tu·GTP, was darauf hindeutet, daß auch die Länge der 3'-terminalen Sequenz für die Wechselwirkung wichtig ist^[106]. Die Aktivität der 2'(3')-O-Aminoacyl oligonucleotide als Promotoren der EF-Tu·GTPase steigt mit der Kettenlänge in der Reihenfolge A-Phe < C-A-Phe < C-C-A-Phe an^[54, 63, 64, 66, 91]. aa-tRNA-C-U-A (Uridin-75 anstelle von Cytidin-75) kann nur sehr schwach mit EF-Tu·GTP wechselwirken. Diese Modifizierung stört vor allem die Basenstapelung am 3'-Ende der aa-tRNA^[92]. Die Wechselwirkung von EF-Tu·GTP mit aa-tRNA wird beim Ersatz von Cytidin-75 durch ein alkyliertes 2-Thiocytidin-75 (Abb. 13) nicht gestört^[107]. Zusammengefaßt deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß EF-Tu wahrscheinlich nicht direkt mit den Nucleobasen des C-C-A-Endes wechselwirkt, sondern den gesamten Aufbau des gestapelten C-C-A-Endes der tRNA erkennt. Diese gestapelte Struktur wird durch die Bindung an EF-Tu·GTP nicht wesentlich beeinflußt^[46]. Es ist allerdings möglich, daß dieses Modell sich als zu stark vereinfacht herausstellt, denn U-Phe kann A-Phe als Promotor der EF-Tu·GTPase nicht ersetzen. Mindestens teilweise, und vor allem beim termina-

len Adenosin, muß demnach auch die Nucleobase am Protein erkannt werden^[66].

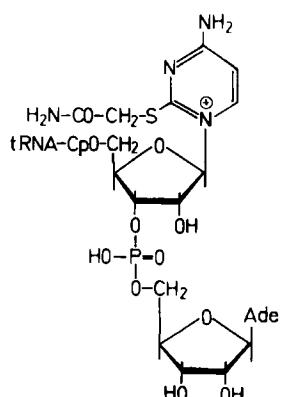


Abb. 13. Modifizierte tRNA, in der Cytidin-75 durch ein in Position 2 mit Iodacetamid carbamoylmethyliertes 2-Thiocytidin ersetzt ist.

5.2.4. EF-Tu·GTPase und Umacylierung der aa-tRNA

Der ternäre aa-tRNA·EF-Tu·GTP-Komplex dient als Vehikel für die codonabhängige Bindung der aa-tRNA an die ribosomale A-Stelle. Dieser Bindungsprozeß wird von der Hydrolyse eines GTP-Moleküls begleitet und führt zur Abspaltung von EF-Tu·GDP vom Ribosom und nachfolgender endgültiger Bindung der aa-tRNA an die ribosomale A'-Stelle. Es gilt als bewiesen, daß die GTPase-Aktivität mit EF-Tu assoziiert ist^[108]; außerdem ist bekannt, daß die C-C-A-Sequenz der aa-tRNA mit EF-Tu während der eigentlichen GTPase-Reaktion wechselwirkt^[54]. Daraus folgt, daß die C-C-A·EF-Tu-Wechselwirkung nach der Bindung des ternären Komplexes an das Ribosom noch besteht^[65].

Beide Isomere – die 2'- und die 3'-Aminoacyl-tRNA – können im EF-Tu-abhängigen Prozeß an die A-Stelle des Ribosoms gebunden werden^[109]. Falls die Transacylierung des 2'-Aminoacylrestes in die 3'-Stellung gehindert ist (vgl. 1 und 2), kann diese aa-tRNA allerdings sehr leicht aus der A-Stelle gedrängt werden^[62, 109]. In dieser Hinsicht zeigt Phe-tRNA-C-C-3'dA ähnliche Eigenschaften wie die native Phe-tRNA-C-C-A in Gegenwart des nicht hydrolysierbaren GTP-Analogons GMPPCP. Da in diesem Fall eine GTP-Hydrolyse nicht stattfinden kann und EF-Tu·GDP nicht vom Ribosom dissoziiert, wird das C-C-A-Ende der aa-tRNA wahrscheinlich nicht an die A'-Stelle der Peptidyltransferase gebunden^[53]. Es liegt nahe, daß die 2'-aa-tRNA im Gegensatz zur 3'-aa-tRNA nicht exakt an die ribosomale A'-Stelle angepaßt werden kann^[53]. Die enzymatische Bindung beider Isomere, der 2'- und der 3'-aa-tRNA, ist von der Hydrolyse von GTP begleitet^[109]. Aus Aktivitätsuntersuchungen der nicht isomerisierbaren aa-tRNAs bezüglich der Bildung des ternären Komplexes mit EF-Tu·GTP sowie aus der enzymatischen Bindung an das Ribosom wurde geschlossen, daß die 3'-aa-tRNA wahrscheinlich nicht direkt an das Ribosom binden kann. In der Acceptorreaktion aktive 3'-aa-tRNA wird vielmehr nach der Hydrolyse von GTP und nachfolgender Dissoziation des EF-Tu·GDP durch Transacylierung gebildet. Nur diese 3'-aa-tRNA kann dann die C-C-A-Sequenz korrekt an die A'-Stelle des Peptidyltransferase-Zentrums bin-

den^[14, 110]. Diese Hypothese muß noch experimentell mit nativen aa-tRNAs bestätigt werden. Gegenwärtig scheint gesichert zu sein, daß die tRNA, die als Acceptor des Peptidylrestes wirkt – die 3'-aa-tRNA – nicht das ausschließliche Substrat für EF-Tu ist. Mindestens ein Teil der aa-tRNA wird an EF-Tu auch als 2'-Isomer oder als Orthoester gebunden. Deshalb muß am Ribosom mindestens teilweise eine Transacylierung stattfinden, bevor die neue Peptidbindung gebildet werden kann. Es ist eine interessante Frage, ob für diese Transacylierung eine enzymatische Aktivität notwendig ist^[34].

Die EF-Tu·GTPase-Aktivität kann außer durch die C-C-A-Sequenz auch durch andere Teile der tRNA stimuliert werden^[91, 111]. Es kann allerdings nicht entschieden werden, ob dieser Effekt durch zusätzliche Wechselwirkungen anderer Teile der aa-tRNA mit EF-Tu bedingt ist, oder ob es sich hier nur um die Stabilisierung der Konformation des C-C-A-Endes durch den Rest des Moleküls handelt. Die normalerweise ruhende GTPase-Aktivität von EF-Tu wird erst wirksam, nachdem der ternäre Komplex in einer codonspezifischen Reaktion an das Ribosom gebunden ist, das heißt, wenn die aa-tRNA ihre Position an der ribosomalen A-Stelle eingenommen hat. An diesem Prozeß sind wahrscheinlich in einem komplexen Zusammenspiel mehrere Domänen des Ribosoms, der tRNA sowie des Elongationsfaktors Tu beteiligt. Obwohl die genaue Struktur der aktiven Stellen von EF-Tu noch unbekannt sind, wissen wir, daß das aktive Zentrum, welches die GTPase-Aktivität bewirkt, sich topologisch von der C-C-A-Bindungsstelle unterscheidet^[112, 113].

Man könnte spekulieren, daß die EF-Tu·GTPase durch eine spezifische Wechselwirkung des ternären Komplexes aa-tRNA·EF-Tu·GTP mit Teilen des Ribosoms reguliert wird^[114, 115]. Zugleich muß die C-C-A-Sequenz der aa-tRNA mit EF-Tu verbunden sein, damit die zur GTPase-Reaktion führende Konformationsänderung des Proteins eintreten kann.

5.3. Wechselwirkung mit der Acceptor- und der Donorstelle der Peptidyltransferase

5.3.1. Die α -Amino- und die N-Acyl- α -aminogruppe der aa-tRNA

Die α -Aminogruppe des Acceptorsubstrats ist nicht nur für die Synthese der Peptidbindung notwendig, sondern wird auch für die Bindung der aa-tRNA an die A'-Stelle des Ribosoms benötigt^[116, 117]. Dabei kann die α -Aminogruppe durch OH- oder SH-Gruppen teilweise ersetzt werden^[118, 119].

Für die Bindung der Substrate an die P'-Stelle muß die Aminogruppe der aa-tRNA acyliert werden. So bindet z. B. C-A-C-C-A(AcLeu) bevorzugt an die P'-Stelle^[80], und C-A-C-C-A-Phe wechselwirkt wiederum bevorzugt mit der A'-Stelle^[117]. Ribosomen müssen während ihrer Funktion die wachsende Peptidkette beherbergen. In Einklang damit werden die Formyl- oder Acetylgruppen durch die P'-Stelle des Ribosoms erkannt. Diese Gruppen können aber in in-vitro-Experimenten durch beliebige Acylgruppen ersetzt werden. Daraus folgt, daß die P'-Stelle der Peptidyltransferase in erster Linie zwei funktionelle Gruppen er-

kennen muß: Dies sind die Carbonylgruppe der Esterbindung und die Carbonylgruppe der letzten Peptidbindung der Peptidyl-tRNA.

5.3.2. Die Carbonylgruppe

Die Ester-Carbonylgruppe der aa-tRNA ist für die Bindung an die A'-Stelle absolut notwendig. Die Verbindungen 9–11 (Abb. 14), denen die Carbonylgruppe fehlt, sind in der Peptidyltransferase-Reaktion als Acceptor nicht aktiv^[120, 121]. Auch Verbindung 12 (Abb. 15) mit Ortho-

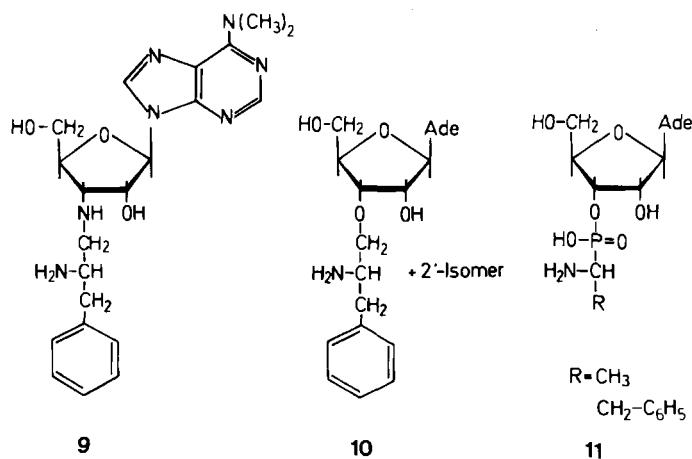


Abb. 14. Puromycin-Analogon 9, in welchem die Carbonylgruppe des Aminoacylrestes durch $>\text{CH}_2$ und die p-Methoxygruppe durch H ersetzt ist; Analoga 10 und 11 von 2'(3')-O-L-Phenylalanyladenosin, in welchen die Carbonylgruppe des Aminoacylrestes durch $>\text{CH}_2$ bzw. $>\text{P}(\text{O})\text{OH}$ ersetzt ist.

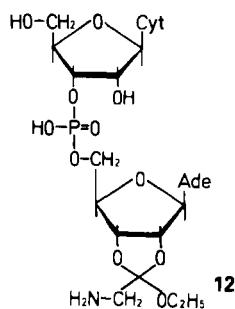


Abb. 15. 2',3'-Orthoesterderivat 12 von C-A.

estergruppe wirkt nicht als Acceptorsubstrat^[81]. Anscheinend erkennt die A'-Stelle die definierte räumliche Anordnung der α -Amino- und Carbonylgruppe des Aminoacylrestes, während die P'-Stelle mindestens zwei Carbonylgruppen am C-Terminus des Peptidylrestes der Peptidyl-tRNA erkennen muß.

5.3.3. Die Aminosäureseitenkette

Enzyme arbeiten stereospezifisch; sie erkennen ihre Substrate an mindestens drei Punkten^[122]. Wenn wir dieses Grundprinzip auf die Bindung der aa-tRNA an die A'-Stelle der Peptidyltransferase anwenden, dann folgt, daß außer der α -Aminogruppe und der Carbonylgruppe des Aminoacylrestes eine dritte Stelle am Substrat existieren muß, die durch das Ribosom erkannt wird. Diese dritte

Stelle ist sehr wahrscheinlich, wie Rychlik et al.^[71] ursprünglich vorschlugen, die Seitenkette des Aminoacylrestes. Andere Autoren^[81, 123–126] beobachteten, daß Derivate von aromatischen Aminosäuren die besten Acceptorsubstrate und Derivate von Glycin und Prolin die schlechtesten sind^[*]. Ähnliche Schlüsse folgen aus Beobachtungen von Lessard und Pestka^[78], die die Bindung mehrerer 2'(3')-O-Aminoacylderivate der C-C-A-Sequenz an die A'-Stelle untersucht haben. Der Effekt der Seitenkette ist bei Fragmenten am stärksten ausgeprägt, konnte aber auch bei aa-tRNAs beobachtet werden^[128].

Um die Stereospezifität der Peptidyltransferase-Reaktion zu gewährleisten, müssen die Seitenketten aller Aminosäuren an der Bindungsstelle in dieselbe Richtung orientiert werden^[81]; wahrscheinlich ist eine Proteintasche im Spiel. Die hohe Bindungsaffinität der aromatischen Aminosäuren kann allerdings auch eher durch zufällige lipophile Wechselwirkungen als durch eine Spezifität der Bindungsstelle zustandekommen.

Eine Abhängigkeit der Donoraktivität der Fragmente von ihrer Aminosäureseitenkette wurde ebenfalls beobachtet^[127–132], doch hat sie mit der Aktivität der A'-Stelle nichts zu tun. Während A-Phe zu den besten Acceptor nicht zählt, sind AcPhe-Oligonucleotide sehr schlechte Donoren. Die höchste Donoraktivität weisen Derivate von fMet und AcLeu auf. Diese Befunde deuten darauf hin, daß an der Wechselwirkung mit den Seitenketten in den Acceptor- und Donorstellen des Ribosoms verschiedene Teilbereiche der ribosomalen Struktur beteiligt sind.

Die C-A-Derivate von achiralen Aminosäuren, z.B. α -Aminoisobuttersäure 8a oder Cycloleucin 8b, haben keine Acceptoraktivität^[133]. Die Bindung an die A'-Stelle wird, wahrscheinlich durch den zweiten α -Substituenten, verhindert. Diese Verbindungen wechselwirken aber mit der ribosomalen A'-Stelle und hemmen dadurch die Peptidyltransferase-Reaktion. Es ist nicht bekannt, ob dieses Phänomen auch an der P'-Stelle auftritt.

Das Cyclohexyl-Analogon 13 von Puromycin (Abb. 16) wirkt als Acceptor^[134]. Dieser Befund ist mit dem allgemeinen Modell in Einklang, welches hier präsentiert wird. Der

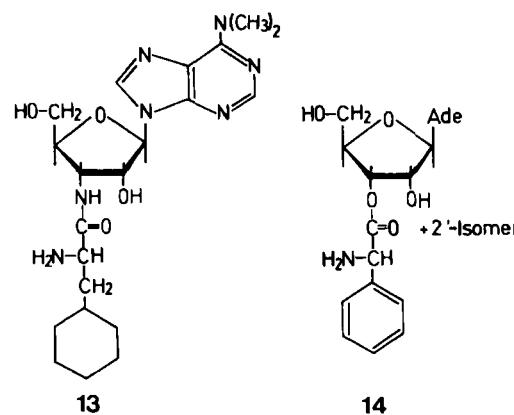


Abb. 16. Analoga von Puromycin und 2'(3')-O-L-Phenylalanyladenosin. Verbindung 13 ist ein Analogon von Puromycin, in dem die aromatische Seitenkette durch Cyclohexyl ersetzt ist. Verbindung 14 enthält L-Phenylglycin.

[*] Als einzige Ausnahme wurde eine niedrige Aktivität eines Tryptophan-Analogons von Puromycin beschrieben [127]. Dieser Befund wurde noch nicht unabhängig bestätigt.

lipophile alicyclische Rest dieser Verbindung kann offensichtlich sehr gut mit der A'-Stelle wechselwirken. Die Distanz zwischen der hydrophoben Tasche am Ribosom und der α -Aminogruppe des Acceptorsubstrats wurde vor kurzem mit einigen Modellderivaten der aa-tRNA untersucht^[135, 136]. Außerdem ist auch 2'(3')-O-L-Phenylglycyladenosin **14** als Acceptor aktiv, etwas schwächer als das strukturverwandte A-Phe^[173].

5.3.4. Stereospezifität

Mit einer Serie von Experimenten unter Anwendung von Fragmenten sowie intakten tRNAs wurde gezeigt, daß die Peptidyltransferase sowohl an der A'- als auch an der P'-Stelle stereoselektiv arbeitet. Nur die L- α -Aminoacylderivate können an der Peptidyltransferase-Reaktion als Substrate teilnehmen^[47, 81, 132]. Interessanterweise wirken aber z. B. C-A(D-Phe) oder C-A(Ac-D-Met), die keine Substrate der Peptidyltransferase-Reaktion sind, als spezifische Inhibitoren der entsprechenden ribosomalen Bindungsstellen^[81, 132]. Das heißt, daß die Stereospezifität ähnlich wie bei proteolytischen Enzymen nicht durch die bevorzugte Bindung eines Diastereomers an das aktive Zentrum gewährleistet ist, sondern durch die räumliche Beziehung der funktionellen Gruppen des Substrats (Carbonylgruppe, Aminogruppe, Seitenkette) und des Enzyms^[138].

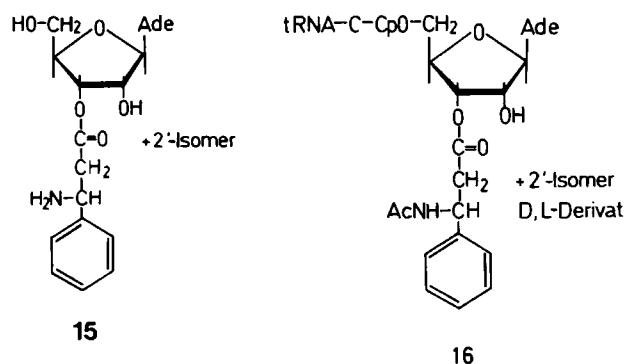


Abb. 17. Analoga von 2'(3')-O-L-Phenylalanyladenosin und AcPhe-tRNA^{Phe}. Verbindung **15** enthält L- β -Phenylalanin, Verbindung **16** Ac(DL- β -Phenylalanin).

Weder D- noch L-2'(3')-O-(β -Phenylalanyl)adenosin **15** (Abb. 17) wirkt als Acceptor bei der Peptidyltransferase-Reaktion^[137], dagegen ist Ac(DL- β -Phe)-tRNA **16** (Abb. 17) als Donor aktiv^[47]. Es wäre interessant festzustellen, ob auch die P'-Stelle in Analogie zu Chymotrypsin eine „umgekehrte Stereospezifität“ aufweist; N-Acetyl-D- β -Phenylalanylester wird nämlich durch Chymotrypsin bevorzugt gespalten^[139].

5.3.5. Isomerspezifität

Die Spezifität der A'-Stelle der Peptidyltransferase in bezug auf die 2',3'-Positionsisomerie der aa-tRNA wurde eingehend untersucht. Für diese Studien wurden die nicht isomerisierbaren aa-tRNA-Derivate **1-4** verwendet. Da die Peptidyltransferase tRNA-Derivate mit modifizierten Zuckerresten erkennen kann (siehe Abschnitt 5.3.6), lassen sich auch Verbindungen, in welchen die 2',3'-Transacylierung unmöglich ist, als Modelle heranziehen.

Die 3'-aa-tRNAs Lys-tRNA^{Lys}-C-C-2'dA (Typ 1) und Phe-tRNA^{Phe}-C-C-3'NH₂A (Typ 3) sind Aczeptoren^[67, 109, 140, 141], Phe-tRNA^{Phe}-C-C-3'dA (Typ 2) und Phe-tRNA^{Phe}_{ox-red} **5a** dagegen nur sehr schwache Aczeptoren^[62]. Einen quantitativen Vergleich mehrerer nicht isomerisierbarer 2'(3')-O-Aminoacylderivate von C-A (**17-19**; Abb. 18) führten Bhuta et al.^[81] durch. Diese Autoren folgerten, daß die 3'-Aminoacylderivate der optisch aktiven Aminosäuren wesentlich bessere Aczeptoren als die 2'-Derivate sind. Die K_m -Werte für die Acceptorreaktion sind bei den 2'-Isomeren mehr als 100mal so groß wie bei den 3'-Isomeren (Tabelle 1).

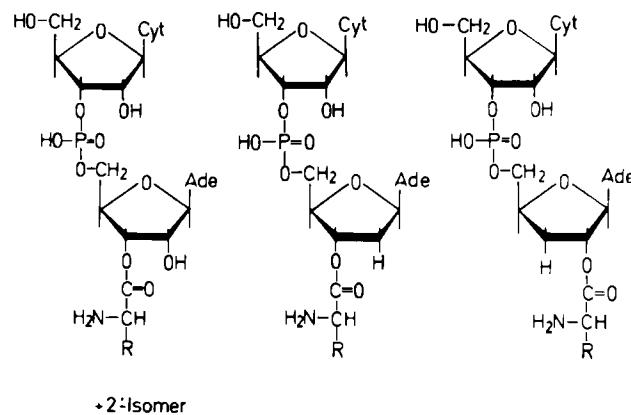


Abb. 18. 2'(3')-O-L-Aminoacylderivate **17** von C-A; 3'-O-L-Aminoacylderivate **18** von C-2'dA; 2'-O-L-Aminoacylderivate **19** von C-3'dA (R = Aminosäureseitenkette; siehe Tabelle 1).

Tabelle 1. Abhängigkeit der K_m -Werte der Peptidyltransferase-Reaktion von der Position des Aminoacylrestes (2',3'-Isomerie), bestimmt mit dem fMet-tRNA^{fMet}.A-U-G-70S-Ribosom-System. Die Aminoacylderivate von C-A **17**, C-2'dA **18** und C-3'dA **19** dienten als Aczeptoren [81].

Aminoacylrest	Michaeliskonstante K_m [M]			$K_m^{2'}/K_m^{3'}$
	2'(3') 17	2'-Isomer 18	3'-Isomer 19	
Phe	1.1×10^{-7}	2×10^{-5}	1.1×10^{-7}	182
Leu	1.0×10^{-6}	$> 10^{-3}$	9.5×10^{-6}	> 100
Lys	3.4×10^{-7}	$> 10^{-3}$	3.0×10^{-7}	> 1000
Ala	9.0×10^{-7}	$> 10^{-3}$	1.0×10^{-5}	> 100
Gly	5.0×10^{-6}	6.4×10^{-5}	4.0×10^{-5}	1.6

Die isomeren Glyciderivate **20** und **21** (Abb. 19) verhalten sich allerdings völlig anders. In diesen Fällen wirken sowohl 2'- als auch 3'-Isomere der Gly-Oligonucleotide als Aczeptoren und reagieren mit dem fMet-Rest der in der P-Stelle gebundenen fMet-tRNA^{fMet}^[81]. Dieser Befund ist sehr überraschend; seine Allgemeingültigkeit sollte durch Versuche auf tRNA-Ebene überprüft werden.

Die Resultate über die 2',3'-Spezifität der A'-Stelle können mit einem Modell, in welchem die Orientierung der Aminoacylreste am 3'-Ende der tRNA dargestellt ist (Abb. 11), erklärt werden^[61, 62]. Wenn wir annehmen, daß eine bestimmte Orientierung der α -Aminogruppe des Aminoacylrestes für die Peptidyltransferase-Reaktion notwendig ist, können wir die Aminogruppe des 2'-gebundenen Aminoacylrestes mit der Aminogruppe des 3'-gebundenen Aminoacylrestes nur dann zur Deckung bringen, wenn die Seitenketten dieser Aminoacylreste in verschiedene Richtun-

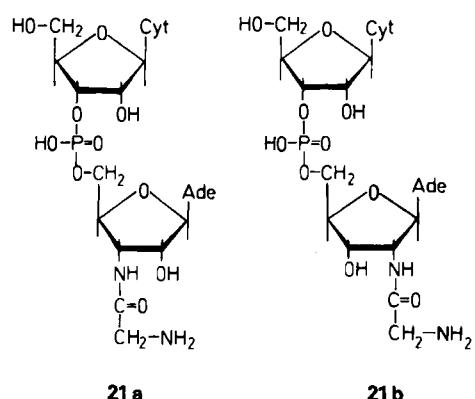
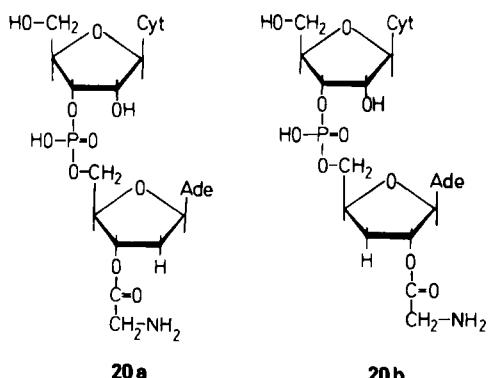


Abb. 19. Nicht isomerisierbare Analoga 20 und 21 von C-A-Gly, die einen modifizierten Adenosinrest enthalten.

gen zeigen. Dieser wesentliche Unterschied in der Struktur der 2'- und der 3'-aa-tRNAs ist wahrscheinlich der Grund für die Selektivität der A'-Stelle bezüglich der Positionsisomere. Da Glycinderivate keine Seitenkette haben, können beide Isomere als Substrate wirken.

In allen untersuchten Systemen konnten die 2'-Aminoacylderivate an die A'-Stelle des Ribosoms gebunden werden. Diese Bindung ist ähnlich wie bei D-Derivaten allerdings nicht produktiv, d.h. es entsteht keine Peptidbindung.

Die Untersuchung der Isomerspezifität der P'-Stelle hat sich als viel schwieriger erwiesen. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden^[109], daß Ac₂Lys-tRNA^{Lys}-C-C-2'dA 22 (Abb. 20) als Donorsubstrat aktiv ist und mit einer an der

A'-Stelle gebundenen aa-tRNA reagiert; das 2'-Isomer 23 war unter den gleichen Bedingungen inaktiv. Demnach ist die stereochemische Situation an der P'-Stelle ähnlich wie an der A'-Stelle. Es ist allerdings noch nicht bekannt, ob (analog zur A'-Stelle) sowohl 2'- als auch 3'-AcGly-Ester als Donoren aktiv sind. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Aktivierung der reagierenden Carbonylgruppe der Peptidyl-tRNA durch die Bildung einer Wasserstoffbrücke zur benachbarten 2'-OH-Gruppe, welche beim Derivat 22 fehlt, bei der Peptid-Transferreaktion nicht erforderlich ist.

5.3.6. Der Zuckerrest

Die A'-Stelle kann Substrate mit modifizierten Zuckerresten, z.B. 2'-Desoxyribose, 2'-O-Methylribose, zwischen C2' und C3' gespaltene Ribose und 3'-Amino-3'-desoxyribose erkennen^[67, 123, 142–145]. Die 2'-Aminoacylderivate sind im allgemeinen Inhibitoren der A'-Stelle. Aus dieser Sicht unterscheidet sich die A'-Stelle des Ribosoms stark von EF-Tu, das gegenüber Ribosemodifizierung viel empfindlicher zu sein scheint. Die Abwesenheit der 2'-OH-Gruppe beeinflußt die Acceptoraktivität im Falle von schwachen Substraten (z.B. Glycinderivaten) in viel höherem Ausmaß, als das bei aktiveren Aczeptoren (z.B. Phenylalaninderivaten) der Fall ist^[81]. Interessanterweise wirkt 2'dA-Phe nicht als Acceptorsubstrat, obwohl das Dinucleotid C-2'-dA-Phe ein hervorragender Acceptor ist und in seiner Aktivität dem Substrat C-A-Phe ähnelt (Tabelle 1). Diese Anomalie kann nicht allein durch die Existenz einer Bindungsstelle für die 2'-OH-Gruppe erklärt werden. Es ist auch möglich, daß eine Konformationsänderung des Ribosringes und daraus resultierende Änderungen der Orientierung des Aminosäurerestes bei der Erkennung durch die Peptidyltransferase eine wichtige Rolle spielen^[*].

5.3.7. Die Nucleotidsequenz

Die Acceptoraktivität der 2'(3')-O-Aminoacylderivate von C-A ist wesentlich größer als die der entsprechenden Aminoacylderivate von Adenosin. Die K_m -Werte unterscheiden sich um mehr als das 10Fache^[149]. Dieser Effekt resultiert ausschließlich aus dem Anbau des Cp-Restes; mit anderen Nucleotiden wird er nicht erreicht^[127, 150]. Die Acceptoraktivität steigt ebenfalls in der Reihe A-Phe < p-A-Phe < MepA-Phe, jedoch wesentlich weniger als beim Anbau von Cp^[151]. Die Steigerung der Acceptoraktivität durch Anfügen des zweiten Cp-Restes unter Bildung des 2'(3')-O-Aminoacylderivats von C-C-A ist nicht mehr so signifikant, insbesondere nicht mit hochaktiven Substraten. So liegt die Acceptoraktivität von C-A-Phe in der gleichen Größenordnung wie die von C-C-A-Phe, während bei schwach aktiven Substraten wie C-C-A-Gly die Acceptoraktivität viel höher als die von C-A-Gly ist^[79]. Der zweite Cp-Rest spielt bei der Bindung an die A'-Stelle des Ribo-

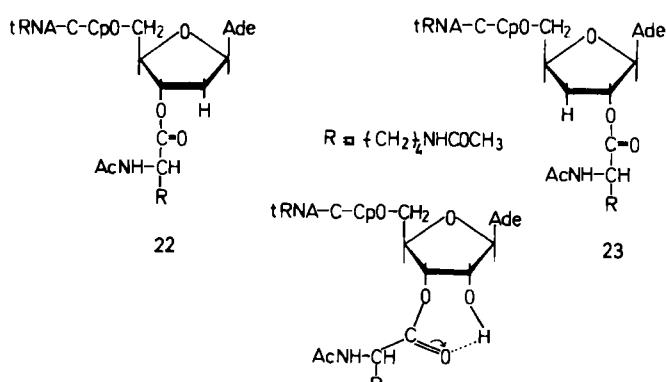


Abb. 20. Nicht isomerisierbare Analoga von Ac₂Lys-tRNA^{Lys} mit fehlender Hydroxygruppe: Ac₂Lys-tRNA^{Lys}-C-C-2'dA 22 und Ac₂Lys-tRNA^{Lys}-C-C-3'dA 23. Unten ist die Aktivierung des Aminoacylestes der Peptidyl-tRNA durch die Wasserstoffbrücke zur benachbarten Hydroxygruppe dargestellt.

[*] Es bestehen Unterschiede in der Zuckerkonformation zwischen Ribos- und Desoxyribosiden. Puromycin liegt in einer N-(3'-endo)-Konformation vor, 2'-Desoxyribose haben wahrscheinlich S-(2'-endo)-Konformation. Nur in der N-Konformation lassen sich die Nucleobasen am C-C-A-Ende stapeln. Es könnte sein, daß die Anwesenheit des Cp-Restes in C-2'-dA-Phe eine N-Konformation der 2'dA-Gruppe induziert [145–148].

soms ebenfalls eine Rolle^[78]. Eine direkte Wechselwirkung der C-C-A-Sequenz der aa-tRNA mit der A'- und P'-Stelle des Ribosoms wurde daraus abgeleitet^[152-154], daß die C-C-A-Sequenz der gebundenen aa-tRNA gegen chemische oder enzymatische Reaktionen geschützt ist.

Die Nucleotide jenseits der C-C-A-Sequenz haben wahrscheinlich bei der Bindung an die A'-Stelle keine wichtige Aufgabe, wie durch Vergleich der Bindungsaktivitäten von C-C-A-Phe und C-A-C-C-A-Phe gezeigt werden konnte^[78, 79]. Detaillierte Untersuchungen der Acceptoraktivität von 2'(3')-O-Aminoacylnucleotiden mit modifizierten Nucleobasen deuten auf relativ geringe Basenspezifität der ribosomalen A'-Stelle hin^[155, 156]. Zum Beispiel sind Modifizierungen an Position 6 des terminalen Adenosins mit extrem großen Substituenten möglich^[157], ohne die Acceptoraktivität des Acceptorsubstrats zu beeinflussen, so lange die Elektronenkonfiguration des Purinringes im wesentlichen erhalten bleibt. Ein Austausch von A-Phe durch G-Phe wird z. B. durch die ribosomale A'-Stelle nicht toleriert. Es ist bemerkenswert, daß auch Substanzen, die keine Watson-Crick-Basenpaare bilden können, z. B. Puromycin und andere 2'(3')-O-Phenylalanylnucleoside, als Aczeptoren wirken. Eine Basenpaarung des terminalen Adenosins mit der ribosomalen RNA ist demnach für die Acceptoraktivität nicht notwendig^[156, 158, 159]. Die Möglichkeit der Hoogsteen-Basenpaarung an Position 7 des Purinringes kann ausgeschlossen werden, da 2'(3')-O-Phenylalanyl-tubercidin (7-Desazaadenosin) als Acceptor aktiv ist^[156]. Das terminale Adenosin der tRNA kann auch durch Formycin ersetzt werden; Phe-tRNA^{Phe}-C-C-F 24a (Abb. 21)

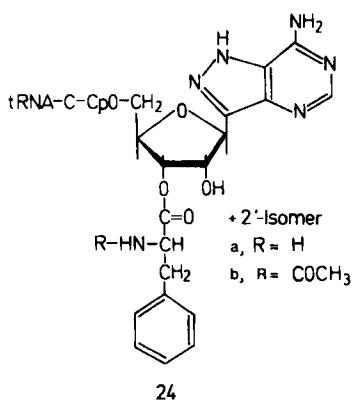


Abb. 21. Phe-tRNA^{Phe}-C-C-F 24a und AcPhe-tRNA^{Phe}-C-C-F 24b, die einen Formycinrest als 3'-terminales Nucleotid enthalten.

ist ein Acceptor^[160]. Aus diesen Untersuchungen folgt, daß die A'-Stelle der Peptidyltransferase wahrscheinlich nur die räumliche Form des letzten Nucleosids der tRNA erkennt. 2'(3')-O-Phenylalanylenocytidin 25 (Abb. 22) ist als Acceptor aktiver als das Cytidinderivat 26, was sich durch die Ähnlichkeit des Bicyclus mit Purin erklären läßt^[158]. Es wird vermutet, daß das terminale Adenosin in der tRNA beweglich ist^[14]. Dieses Nucleosid könnte deshalb sowohl in *syn*- als auch in *anti*-Konformation vom Enzym erkannt werden. Nach Modellstudien mit den Nucleosidanalogen 27 und 28 (Abb. 23) bevorzugt die Acceptorstelle die *anti*-Konformation des terminalen Nucleosids (wie in 27)^[161].

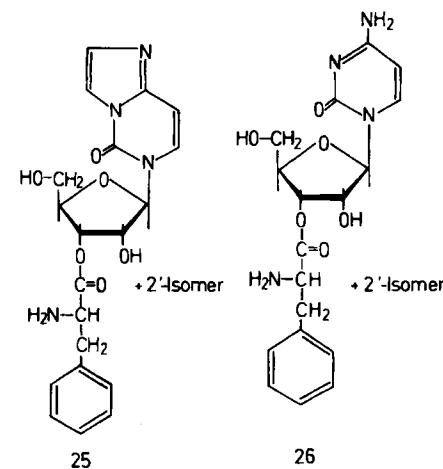


Abb. 22. 2'(3')-O-L-Phenylalanylenocytidin 25 und 2'(3')-O-L-Phenylalanylcytidin 26.

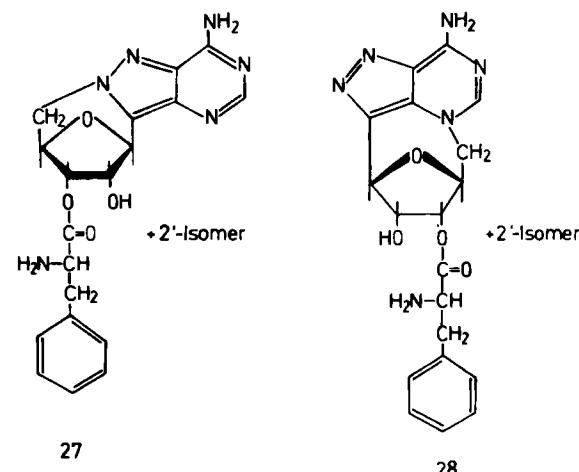


Abb. 23. 2'(3')-O-L-Phenylalanylderivate der beiden Cycloformycine. In Verbindung 27 ist eine *anti*-, in Verbindung 28 eine *syn*-Konformation fixiert.

Eine an Cytidin 75 modifizierte Phe-tRNA^{Phe}-C-C-A (vgl. Abb. 13) ist ein viel schlechterer Acceptor als die entsprechende unmodifizierte Phe-tRNA^{Phe}. Die Fähigkeit dieser tRNA, Basenpaarungen mit den Resten 73-75 einzugehen, ist ebenfalls stark verringert^[107]. Daraus läßt sich schließen, daß eine geordnet gestapelte Struktur der terminalen C-C-A-Sequenz der tRNA für die Wechselwirkung mit der A'-Stelle außerordentlich wichtig ist^[162]. In Einklang mit dieser Annahme ist auch der Befund, daß das 2'-S'-Dinucleotid 29 (Abb. 24) mit seiner anomalen Staplungsgeometrie nicht als Acceptor wirkt^[163].

Ähnlich wie die aa-tRNA ist auch die terminale C-C-A-Sequenz der Peptidyl-tRNA an spezifischen Wechselwirkungen mit der P'-Stelle der Peptidyltransferase beteiligt. Die 2'(3')-O-(N-Acylaminoacyl)mononucleotide, z. B. pA(fMet) 30a (Abb. 25), sind nur bei sehr hoher Konzentration als Donorsubstrate aktiv^[164]. Die entsprechenden Di- oder Trinucleotide sind wesentlich bessere Donorsubstrate^[129, 131, 132]. C-C-A-fMet ist viel aktiver als C-A-fMet, während ähnlich wie an der A'-Stelle der Anbau eines Cytidinrestes an pA(fMet) nicht zu drastischen Änderungen der Aktivität führt^[129, 149]. Zwischen Tri- und Pentanucleotiden gibt es keine signifikanten Unterschiede der Donor-

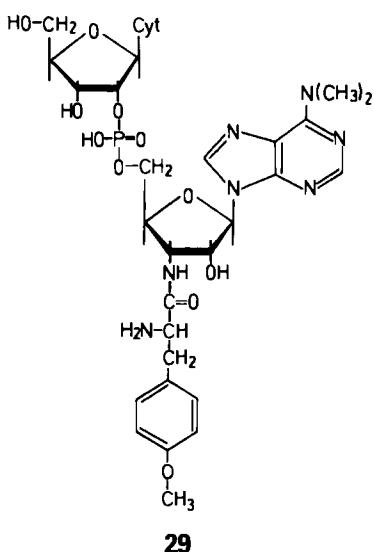


Abb. 24. Cytidylyl-(2'-5')-puromycin 29.

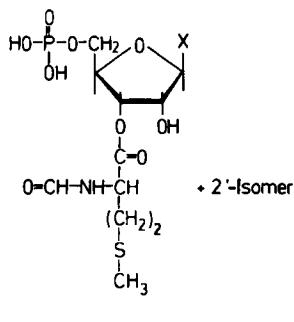


Abb. 25. 2'(3')-O-(N-Formyl-L-methionyl)nucleosid-5'-phosphate 30a, X = Ade, 30b, X = Hyp, 30c, X = Cyt, 30d, X = Ura.

aktivität^[129, 131]. Für die Bindung an die P'-Stelle sind deshalb wahrscheinlich nur die Nucleotide C-C-A des 3'-Endes der Peptidyl-tRNA wichtig. AcPhe-tRNA^{Phe}-C-C-A 24b, die als 3'-terminales Nucleotid einen Formycinrest enthält, zeigt im Vergleich zu AcPhe-tRNA^{Phe}-C-C-A eine recht kleine Donoraktivität^[160]. Dieser Effekt dürfte mit der veränderten Basenstapelung am 3'-Ende dieser modifizierten tRNA zusammenhängen^[160]. Die Donoraktivität von pX(fMet) 30 nimmt in der Reihenfolge X = Ade > Hyp > Gua ab; Derivate mit X = Cyt und Ura zeigen keine Aktivität^[165]. Ähnlich ist C-N(AcMet) (N = Nebularin) 31 (Abb. 26) als Donorsubstrat inaktiv; C-(8-Br)A(AcMet) 32 ist dagegen als Donor annähernd so aktiv wie unmodifiziertes C-A(AcMet)^[132]. Diese Befunde weisen darauf hin, daß die P'-Stelle die 3'-terminalen Reste der Peptidyl-tRNA spezifischer erkennt als die A'-Stelle die entsprechenden Nucleotidreste der aa-tRNA. Für Überlegungen über die Art der Wechselwirkungen an der P'-Stelle ist wichtig, daß C-N(AcMet) 31 keine Watson-Crick-Basenpaare mit dem 3'-Nucleotid bilden kann. In C-(8-Br)A(AcMet) 32 liegt das 3'-terminale Nucleotid wahrscheinlich in *syn*-Konformation vor; 32 ist trotzdem als Donor aktiv. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen anderer Autoren überein^[166], die eine schwache Donoraktivität von p(8-Br)A(fMet) feststellen konnten. Verbindung 33 mit fixierter *anti*-Konformation ist als Donor nicht aktiv. Obwohl

die Experimente mit dieser Verbindung sehr vorsichtig interpretiert werden müssen, da auch die „guten“ Peptidyl-Nucleoside allgemein nur eine sehr niedrige Donoraktivität aufweisen, ist es möglich, daß die Donorstelle die *syn*-Konformation des 3'-terminalen Nucleosids der Peptidyl-tRNA vorzieht. Um diese Hypothese zu überprüfen, wäre es allerdings notwendig, ein Donorsubstrat-Analogon mit fixierter *syn*-Konformation zu synthetisieren und zu testen. Zur Zeit kann man jedoch nicht ausschließen, daß bei der Translokation der Peptidyl-tRNA von der A- auf die P-Stelle eine Rotation der 3'-terminalen Nucleobase von *anti*- in *syn*-Konformation stattfindet.

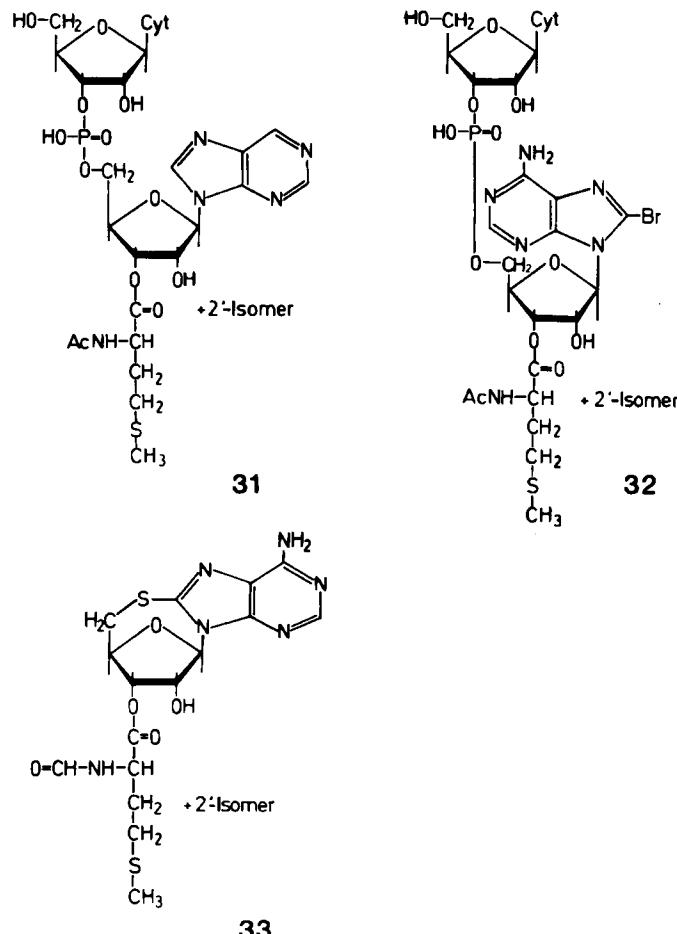


Abb. 26. Cytidylyl(3'-5')2'(3')-O-(N-acetyl-L-methionyl)purinribosid, C-N(AcMet) 31; Cytidylyl(3'-5')2'(3')-O-(N-acetyl-L-methionyl)-8-bromadenosin, C-(8-Br)A(AcMet) 32; (3')-O-(N-Formyl-L-methionyl)-5', S-anhydro-8-mercaptopadenosin 33.

Modifizierte AcPhe-tRNA^{Phe}, in welcher Cytidin-75 in Position 2 alkyliert wurde, ist ein ausgezeichneter Donor. Anders als beim Acceptorsubstrat hat diese Modifizierung des Donorsubstrats (Abb. 13) keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit und die Ausbeute der Peptidyltransferase-Reaktion^[107]. Der Austausch von Cytidin-74 durch Uridin in fMet-tRNA^{fMet} führt zur vollständigen Desaktivierung dieses Substrats (fMet-tRNA^{fMet}-U-C-A) in der Puromycin-Reaktion^[85]. Eine Verlängerung der C-C-A-Sequenz um einen zusätzlichen Cp-Rest, z. B. AcPhe-tRNA^{Phe}-C-C-A, verminderte die Donoraktivität dieser modifizierten tRNA etwa um das 20fache^[106].

Aus dem Vergleich der Substrateigenschaften der A'- und der P'-Stelle des Peptidyltransferase-Zentrums ergibt sich, daß diese Stellen unterschiedliche Spezifität bezüglich des Nucleosidrestes Adenosin-76 der tRNA haben. Außerdem weisen sowohl die A'- als auch die P'-Stelle des Peptidyltransferase-Zentrums eine Bindungsstelle für die C-C-Sequenz auf. Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeit sind beide Bindungsstellen nicht äquivalent. Die Reste C-74 und C-75 der tRNA unterscheiden in ihrem Bindungsverhalten zwischen der A'- und der P'-Stelle des Ribosoms. Darüber hinaus werden diese beiden Cytidinreste auch innerhalb einer Bindungsstelle (A' oder P') nicht äquivalent gebunden^[77, 107, 149, 167].

Die Modellvorstellung von der Bindung des 3'-Endes der tRNA ist sehr vereinfacht in Abbildung 27 dargestellt.

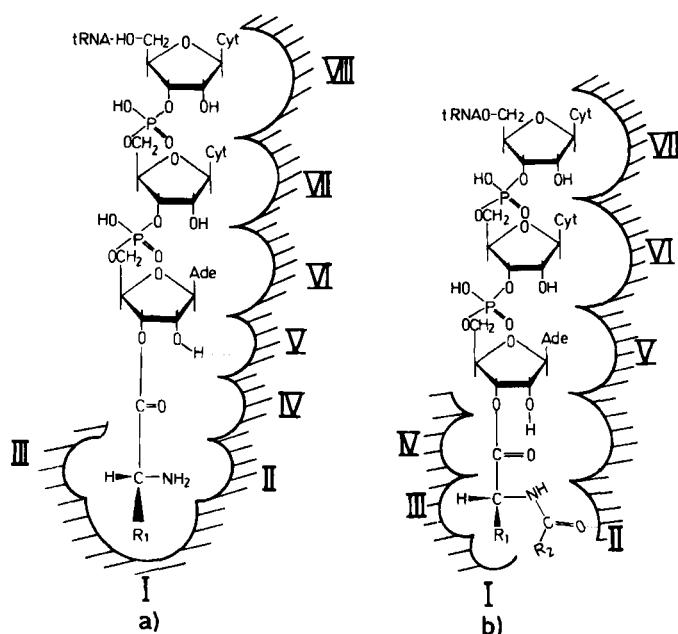


Abb. 27. a) Schematische Darstellung der ribosomalen A'-Stelle mit angedeuteten Wechselwirkungen mit dem 3'-Ende der aa-tRNA. Die A'-Stelle bindet mehrere Teilbereiche des Substrats. Die Bindungsstelle III hat nur Raum für α -Wasserstoff, aber nicht für einen größeren Substituenten. Wahrscheinlich sind nicht alle Bindungsstellen an einem einzigen Molekül einer ribosomalen Komponente lokalisiert, sondern befinden sich an einem oder mehreren ribosomalen Proteinen und einer Teilessequenz der 23S-RNA. - b) Schematische Darstellung der ribosomalen P'-Stelle mit angedeuteten Wechselwirkungen mit dem 3'-Ende der Peptidyl-tRNA. Für die wachsende Peptidkette ist Raum ausgespart worden. Ähnlich wie bei der A'-Stelle befinden sich wahrscheinlich nicht alle Bindungsstellen an einem einzigen Molekül einer ribosomalen Komponente.

5.3.8. Kooperative Effekte an den Bindungsstellen der Peptidyltransferase

Ribosomen und insbesondere das Peptidyltransferase-Zentrum haben eine dynamische Struktur. Die Makromoleküle, welche die Bindungsstellen des Ribosoms bilden, sind konformativ flexibel, so daß kooperative Effekte auftreten können. Die Kommunikation zwischen den Bindungsstellen kann entweder über die Komponenten des Ribosoms oder über die Substrate selbst, d. h. die tRNAs, stattfinden.

Peptidyl-tRNA, die an die P-Stelle des Ribosoms gebunden ist, stimuliert die enzymatische Bindung der aa-tRNA an die A-Stelle^[68]. Das 3'-Isomer der Peptidyl-tRNA (das richtige Substrat der Peptidyltransferase-Reaktion) wirkt stimulierend, dagegen ist das 2'-Isomer in diesem Test inaktiv^[67]. Dies zeigt, daß die korrekte Besetzung der P'-Stelle des Ribosoms an diesem Phänomen spezifisch beteiligt ist. Auch die Acceptoraktivität der aminoacylierten Fragmente ist von der Struktur der Donormoleküle stark abhängig^[71, 81]. Ähnlich beeinflußt die Besetzung der Donorstelle mit AcPhe-tRNA^{Phe} die Affinität der Acceptorstelle für Substrate^[79]. Die Stimulierung der Bindung von C-A-C-C-A-Phe an die Acceptorstelle durch die desacylierte tRNA (an der P-Stelle gebunden) wurde ebenfalls beobachtet^[74, 168, 169]. Sogar die Bindung eines Acceptors an die A'-Stelle der 50S-Untereinheit des Ribosoms wird durch tRNA oder C-C-A, die offensichtlich mit der P'-Stelle wechselwirken, stimuliert^[170]. Diese Befunde deuten auf ein sehr interessantes Zusammenspiel zwischen der P'- und der A'-Stelle des Ribosoms hin; demnach ändert sich die Struktur der A'-Stelle in Abhängigkeit von der Besetzung der P'-Stelle.

Kooperative Effekte können auch an der P'-Stelle beobachtet werden. So entdeckte Černá^[77] einen stimulierenden Effekt von pC auf die Donoraktivität von pA(fMet) unter den Bedingungen der Fragmentreaktion. Der stimulierende Effekt ist für Nucleotide spezifisch, welche ein G-C-Basenpaar bilden können. Andere Nucleotide, z. B. pA, wirken inhibierend^[171]. Diese Beobachtungen hängen zweifellos mit der Bindung des pC-Restes an die Bindungsstelle des vorletzten Nucleotidrestes der Peptidyl-tRNA an der P'-Stelle zusammen. Interessant ist auch der Befund, daß pC die Donoraktivität des Oligonucleotids C-A(AcMet) hemmt^[149]. Das heißt: Die Bindungsstellen für den zweiten und dritten Nucleotidrest des C-C-A-Terminus der Peptidyl-tRNA sind nicht äquivalent. Offensichtlich müssen auch die Bindungsstellen für die Cp-Reste an den A'- und P'-Stellen des Peptidyltransferase-Zentrums sehr unterschiedlich sein. An der A'-Stelle zeigen nämlich weder pC noch andere Cytidinnucleotide einen stimulierenden Effekt auf die Acceptoraktivität von Puromycin oder C-A-Lys^[149]. Im letzten Fall wirkt pC sogar inhibierend^[172].

5.3.9. Struktur der Peptidyltransferase

Die Erkenntnisse über Substratspezifitäten der A'- und P'-Stellen sowie Strukturuntersuchungen an Ribosomen ermöglichen es, neue Vorstellungen über das Peptidyltransferase-Zentrum zu entwickeln.

Die Peptidyltransferase ist ein Teil der größeren ribosomalen Untereinheit. Bis heute ist es nicht gelungen, eine einzige ribosomale Komponente zu identifizieren, welche die Bindung der Substrate oder die enzymatische Aktivität beim Peptidyltransfer bewirkt. Affinitätsmarkierungsexperimente mit reaktiven Derivaten beladener tRNAs und anderen Liganden für die A'- und die P'-Stelle führten zur Identifikation einiger ribosomaler Proteine sowie von Teilen der 23S-RNA, die sich in der Nachbarschaft des Peptidyltransferase-Zentrums befinden. Dies bedeutet allerdings nicht, daß Teile dieser Makromoleküle notwendigerweise Bestandteile dieses Zentrums sein müssen^[173].

Es ist fast sicher, daß das 3'-terminale Nucleosid der an die A'-Stelle gebundenen aa-tRNA nicht basengepaart ist. Bei der Peptidyl-tRNA kann die Situation jedoch anders sein. Wahrscheinlich ist der *N*-Acylaminoacyl(Peptidyl)-Rest der Peptidyl-tRNA an ein Protein gebunden. Der 3'-terminale Adenosinrest bildet wiederum mit einem U-Rest der ribosomalen RNA ein Basenpaar. Diese Annahme geht von dem Befund aus, daß die P'-Stelle, im Gegensatz zur A'-Stelle, eine deutliche Spezifität für Adenosin am 3'-Ende der Peptidyl-tRNA aufweist^[12, 132, 165]. Die Fähigkeit des Donors, der ein 3'-terminales Nucleosid in *syn*-Konformation enthält, funktionell mit der P'-Stelle zu wechselwirken, ist allerdings ein Hinweis auf eine asymmetrische Basenpaarung zwischen einem *syn*-Nucleosid der tRNA und einem *anti*-Nucleosid der ribosomalen RNA^[174].

Eines der bisher interessantesten Ergebnisse ist der acceptor- bzw. donoraktivitätsstimulierende Effekt beim Anbau von Cytidin-3'-phosphat bzw. Cytidin an 2'(3')-O-Aminoacyladenosin bzw. 2'(3')-O-(*N*-Acylaminoacyl)adenosin-5'-Phosphat (siehe Abschnitt 5.3.7). Diese Resultate sind ein deutlicher Hinweis auf die Möglichkeit einer Basenpaarung zwischen der C-C-Sequenz der beladenen tRNA und einer invarianten G-G-Sequenz, wahrscheinlich an der 23S-RNA.

Anders als 16S-RNA bindet die 23S-RNA an die 3'-terminalen Fragmente der tRNA, wie C-A-C-C-A-Leu oder C-A-C-C-A(AcLeu)^[170]. Es wurden auch Experimente beschrieben, die auf eine direkte Beteiligung der 23S-RNA an der Peptidyltransferase-Aktivität des Ribosoms hinweisen. So sind z. B. einige Nucleotidreste in der zentralen Schleife V der 23S-RNA an der Resistenz gegen die Antibiotika Chloramphenicol und Erythromycin beteiligt^[178]. Diese Antibiotika wirken bekanntlich auf das Peptidyltransferase-Zentrum^[175-177]. Die Schleife V der 23S-RNA ist ein in der Evolution der rRNA konservierter Teil der 23S-RNA und deshalb wahrscheinlich ein Bestandteil des Peptidyltransferase-Zentrums (Abb. 28). Zwei Uridinreste

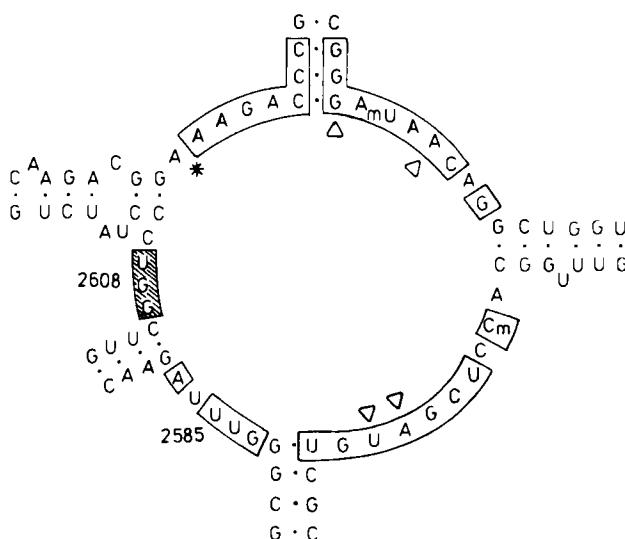


Abb. 28. Sekundärstruktur eines Teils der *E. coli*-23S-RNA, welche die zentrale Schleife der Domäne V enthält (nach [178, 181]). Die konservierten Nucleotidreste sind eingerahmt; das Sternchen weist auf die Erythromycinresistenz-Stelle in *B. stearothermophilus*-23S-RNA hin, die Dreiecke markieren die Chloramphenicolresistenz-Stellen in der mitochondrialen RNA. Die schraffierte Sequenz ist der vorgeschlagene Teil der A'-Stelle, welcher mit der Pu-C-C⁷⁵-Sequenz der aa-tRNA ein Basenpaar bilden kann. Die Nucleotide 2584 und 2585 wurden mit dem photoreaktiven Analogon 34 der Peptidyl-tRNA umgesetzt (siehe Abb. 29) [179].

dieser Schleife (2584 und 2585) sind auch die Stellen, an denen sich das photoreaktive Peptidyl-tRNA-Analogon 34 (Abb. 29) mit der 23S-RNA umsetzt^[179]. Nach Bestrahlung

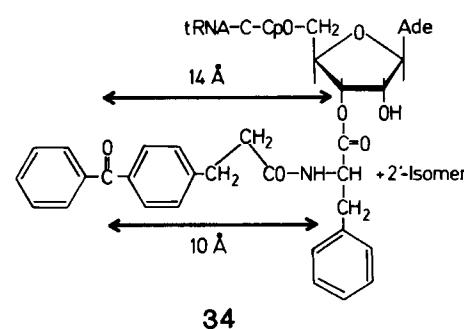


Abb. 29. Photolabiles Analogon 34 der AcPhe-tRNA^{Phe}. Ein Teil dieser Verbindung wird nach der Photolyse kovalent mit 23S-RNA verknüpft [179], und zwar an der aromatischen Ketogruppe.

von 34 verbleibt ein 14 Å langer reaktiver Arm mit der aromatischen Ketogruppe. Es wurde vorgeschlagen, daß das C-C-A-Ende der Peptidyl-tRNA an einer Wechselwirkung mit der konservierten U-G-G⁸⁰⁹-Sequenz in der Domäne II der 23S-RNA (Abb. 30) beteiligt ist. Andere Quervernet-

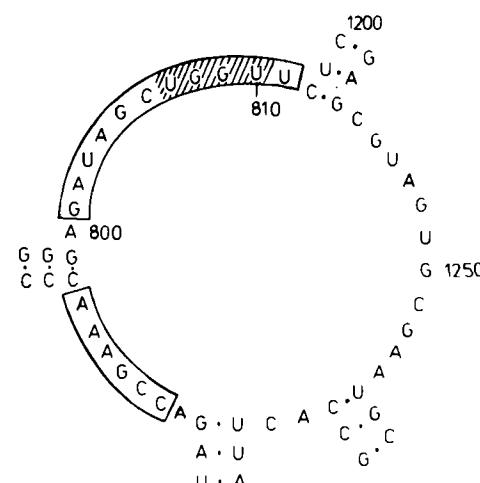


Abb. 30. Sekundärstruktur eines Teils der *E. coli*-23S-RNA (Domäne II) mit der invarianten U-G-G-U-Sequenz. Diese Sequenz wurde als Teil der P'-Stelle vorgeschlagen und sollte mit der Pu-C-C-A⁷⁵-Sequenz der Peptidyl-tRNA wechselwirken. Die konservierten Nucleotidreste sind eingerahmt; der schraffierte Bereich ist Teil der A'-Stelle [179].

zungsexperimente zeigen, daß die Domänen II und V räumlich benachbart sind^[180]. Wenn das der Fall ist – wo befindet sich dann die konservierte G-G-Sequenz für die Bindung des 3'-Endes der aa-tRNA? Eine konventionelle Betrachtung dieses Problems würde diese Bindungsstelle an den Guanosinresten G-G²⁶⁰⁸ der Domäne V vermuten (Abb. 28)^[178, 181]. Diese Sequenz wäre dann ein Teil der A'-Stelle.

Die Bildung einer Peptidbindung zwischen den beiden tRNAs, welche auf diese Weise an die 23S-RNA gebunden sind, ist sterisch möglich. Die Resistenzstellen gegen die genannten Antibiotika sind ebenfalls in Einklang mit diesem Vorschlag, da z. B. Chloramphenicol durch die Bindung an das Ribosom die Funktion der A'-ribosomalen

Stelle inhibiert^[182]. Uridin-2605 ist möglicherweise auch die Angriffsstelle eines reaktiven Puromycin-Analogons, wie ein Affinitätsmarkierungsexperiment nahelegt^[178, 183]. Die Basenpaarung der beiden tRNA-Moleküle mit 23S-RNA führt zur Bildung von zwei coaxialen Helices. Eine solche Struktur ist für die Stabilisierung der neugebildeten RNA·RNA-Hybride vorteilhaft und bewirkt eine genaue Ausrichtung der beiden tRNA-Moleküle^[178] (Abb. 31).

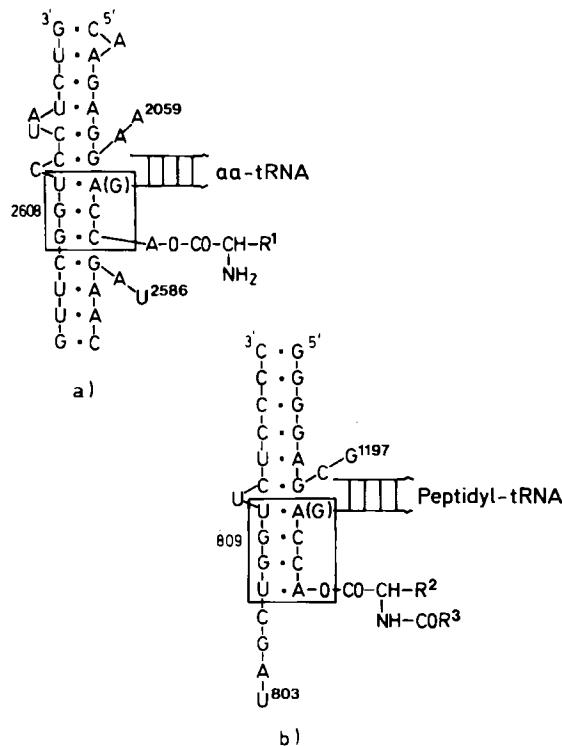


Abb. 31. Modelle der coaxialen Stapelung von jeweils einer tRNA und 23S-RNA. a) Basenpaarung der Pu-C-C⁷⁵-Sequenz der aa-tRNA mit der komplementären Sequenz der 23S-RNA in der zentralen Schleife der Domäne V (vgl. Abb. 28) an der A'-Stelle. b) Basenpaarung der Pu-C-C-A⁷⁶-Sequenz der Peptidyl-tRNA mit der komplementären Sequenz der 23S-RNA in der Domäne II (vgl. Abb. 30) an der P'-Stelle.

Wenn wir die Basenpaarung der 23S-RNA auch mit dem Rest 73 der tRNA (meistens Purine) erlauben entstehen zwei aus Einzelnucleotiden aufgebaute, nicht basegepaarte Schleifen. Ein solches Strukturmerkmal kann als bevorzugte Erkennungsstelle für Proteine^[184] dienen und die Wechselwirkungen mit den ribosomalen Proteinen oder mit Elongations- und Terminationsfaktoren regulieren.

5.3.10. Beteiligung des 3'-Endes der tRNA an der Translokation

Leder^[185] hat vorgeschlagen, daß die Translokation thermodynamisch durch eine Produkt-Substrat-Beziehung der Peptidyl-tRNA und der (desacylierten) tRNA während des Prätranslokations- bzw. Posttranslokations-Zustandes (vgl. Abb. 7) bestimmt wird. Die treibende Kraft ist nach diesem Modell die Dissoziation der Produkte (Peptidyl-tRNA und tRNA) und die Bindung des Substrats (Peptidyl-tRNA). Wenn dieses Modell richtig ist, sollte die Struktur des 3'-terminalen Adenosins sowohl in der Peptidyl-tRNA als auch in der desacylierten tRNA bei der Auslösung der Translokation entscheidend sein. In der Tat findet die

Translokation nicht statt, wenn die modifizierte Peptidyl-tRNA 22, der die 2'-OH-Gruppe fehlt, an die A-Stelle gebunden ist. Die EF-G-abhängige Dissoziation der desacylierten tRNA aus der P-Stelle unterbleibt ebenfalls, wenn tRNA-C-C-2'dA statt der nativen tRNA-C-C-A benutzt wird^[186]. Diese Ergebnisse zeigen, daß die 3'-terminale Ribose im Translokationsprozeß an der A'- und an der P'-Stelle erkannt wird. Wahrscheinlich wird die Translokation durch direkte Wechselwirkung von EF-G mit der 2'-OH-Gruppe der Peptidyl-tRNA und der cis-Diolfunktion der desacylierten tRNA eingeleitet. Statt EF-G könnte an diesem Erkennungsvorgang aber auch ein ribosomales Protein beteiligt sein, das dann auch die Translokation bewirkt (siehe auch^[187]).

Um die Bewegung der neugebildeten Peptidyl-tRNA von der A-Stelle an die P-Stelle zu ermöglichen, müssen während der Translokation die coaxialen Strukturen (Abb. 31) aufgelöst werden. Ein Faktor, welcher eine derartige Bewegung begünstigen könnte, ist die Acylierung der α-Aminogruppe der neugebildeten Peptidyl-tRNA^[188]. Eine acyierte α-Aminogruppe ist aber mit der Spezifität der A'-Stelle nicht zu vereinbaren, da diese eine freie α-Aminogruppe benötigt. Die Acylierung könnte somit die Translokationsbewegung auslösen.

6. Katalyse der Peptidyltransferase-Reaktion

Die Reaktion der Peptidyl-tRNA mit der Aminoacyl-tRNA ist thermodynamisch begünstigt^[13]. Eine spontane Reaktion zwischen diesen Verbindungen findet in Abwesenheit des Ribosoms trotzdem nicht statt. Mit anderen Worten: Die tRNA-Struktur verhindert eine spontane Übertragung des Peptidylrestes von der Peptidyl-tRNA auf die Aminoacyl-tRNA. Peptidyltransferase, die normalerweise Peptidbindungen synthetisiert, kann mit niedriger Effizienz auch Ester-^[118, 189, 190], Thioester-^[119], Thioamid-^[191] und Phosphinsäureamidbindungen^[192] herstellen. Dagegen gibt es keinen Hinweis auf die Rückreaktion bei der Peptidyltransferase. Die Spaltung einer Peptidbindung kann sie nicht katalysieren. Wahrscheinlich ist die Peptidyltransferase noch an zwei weiteren ribosomabergängigen Reaktionen beteiligt: der Termination der Peptidketten^[193] und der Alkoholyse der Peptidyl-tRNA^[194]. In beiden Fällen wirken ein Wasser- oder ein Ethanolmolekül als Acceptorsubstrate.

Was also ist die Funktion der Peptidyltransferase? Ist sie eine enzymatische Aktivität einer bestimmten ribosomalen Komponente oder wirkt sie lediglich als eine Art Matrix, welche die reaktiven Stellen beider tRNAs einander nähert, damit sie spontan die Peptidbindung bilden können? Diese beiden Möglichkeiten werden im Folgenden diskutiert.

6.1. Peptidyltransferase als Matrix

Nach dieser Hypothese ist die Peptidyltransferase-Reaktion eine Aminolyse des aktivierte Esters der Peptidyl-tRNA durch die α-Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA ohne katalytische Beteiligung des Ribosoms. Die Reaktion verläuft über eine tetraedrische Zwischenstufe 35 (Abb. 32). Die Bildung dieser Zwischenstufe ist thermodyn-

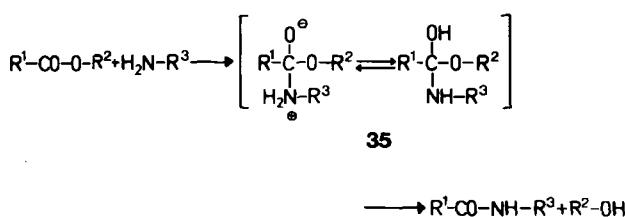


Abb. 32. Bildung der Peptidbindung während der Peptidyltransferase-Reaktion über eine tetraedrische Zwischenstufe.

misch günstig, da zwischen der aktivierte Esterbindung der Peptidyl-tRNA und der Amidbindung des Produktes ein ausreichendes Energiegefälle vorhanden ist. Nierhaus et al.^[195] haben überzeugend dargelegt, daß die neue Peptidbindung mit der erforderlichen Geschwindigkeit synthetisiert werden kann, wenn beide Substrate benachbart sind. Die notwendige räumliche Orientierung ist durch die Existenz zweier genau definierter Substrat-Bindungsstellen garantiert. Nach dieser Vorstellung nehmen die funktionellen Gruppen der ribosomalen Komponenten an der Peptidyltransferase-Reaktion nicht teil.

Ein Beispiel für eine schnelle „nicht-katalysierte“ Transacylierung ist die Aminoacylierung der „Amino“-tRNA 36 (Abb. 33). Hier wird die tRNA an der acceptierenden 2'-Hydroxygruppe enzymatisch beladen. Eine schnelle und wahrscheinlich spontane Isomerisierung von 37 führt dann zur Bildung der stabilen Acylaminobindung in 3. Diese Reaktion kann als Modell für die Bildung einer Peptidbindung während der Proteinbiosynthese betrachtet werden, da auch hier aus einem Ester, bedingt durch die Nachbarschaft der reaktiven Aminogruppe, ein Amid (das heißt eine Peptidbindung) entsteht^[14].

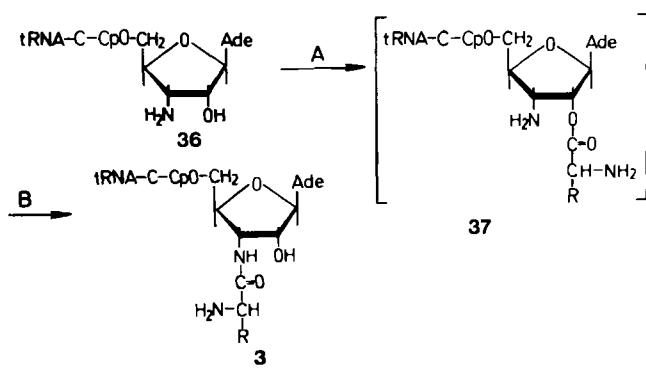


Abb. 33. Bildung der Aminoacylamidobindung an der tRNA-C-C-3'NH₂A 36 über einen intermediären Ester 37. A: 2'-spezifische enzymatische Aminoacylierung; B: Transacylierung zu 3.

6.2. Peptidyltransferase als Enzym

Obwohl die notwendige Geschwindigkeit zur Bildung der Peptidbindung durch korrekte sterische Anordnung der beiden tRNA-Substrate und ohne zusätzliche Katalyse erreicht werden kann, weisen mehrere Beobachtungen darauf hin, daß das Ribosom als Enzym an der Bildung der Peptidbindung beteiligt ist. Es fragt sich nun, ob die Peptidyltransferase einen ähnlichen Mechanismus zur Synthese neuer Peptide wie die proteolytischen Enzyme benutzt, welche ebenfalls Peptidbindungen knüpfen können. So

wirken wahrscheinlich alle Serinproteasen über ein Serin-Histidin-Asparaginsäure-Ladungsverbundsystem und die Bildung einer kovalenten Acyl-Enzym-Zwischenstufe. Die Entstehung kovalenter Substrat-Enzym-Zwischenstufen ist bei der Peptidyltransferase aber nicht wahrscheinlich^[195, 196].

Für die Peptidyltransferase wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, der über das Histidin-Carboxysystem abläuft. Dieses Modell kann die Beobachtung erklären, daß ein Histidinrest eines ribosomalen Proteins zur Substrat-bindung an der A'-Stelle beiträgt^[197-199]. Grundsätzlich muß aber an der katalytischen Funktion der ribosomalen Peptidyltransferase kein Ladungsverbundsystem wie bei Proteasen beteiligt sein. Die Katalyse der Peptidsynthese könnte nämlich durch ganz andere Evolutionsmechanismen als die der Serinproteasen entstanden sein.

Die Peptidyltransferase-Reaktion kann nur dann stattfinden, wenn die α -Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA durch eine protonenacceptierende Gruppe an geeigneter Stelle des Ribosoms deprotoniert wird; somit könnte man den Peptidyltransfer als „katalysierte“ Reaktion betrachten^[200]. Einen derartigen konzertierten Mechanismus der katalysierten Peptidsynthese, der die Übertragung des Peptidylrestes von der Peptidyl-tRNA auf eine *deprotonierte* Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA vorsieht, hatte bereits Cheney^[201] vorgeschlagen. Ein Proton wird dabei unter Beteiligung von Mg^{2+} übertragen. In diesem Modell ist eine ribosomale Funktion notwendig, die als Protonenüberträger wirkt (Abb. 34) und die man als die eigentliche katalytische Stelle betrachten kann. Dieser Mechanismus erklärt elegant die Stabilisierung der tetraedrischen Zwischenstufe, was natürlich mit dem Modell einer „unkatalysierten“ Reaktion nicht möglich ist. Weiterhin bietet dieses Modell auch eine rationelle Erklärung für die kompetitive Bindung von Antibiotika wie Lincomycin, Chloramphenicol und Erythromycin, welche bekanntlich die Peptidyltransferase-Reaktion inhibieren. Nach dem Vorschlag von Cheney würden diese Antibiotika direkt mit dem katalytischen Zentrum des Ribosoms wechselwirken. Die katalytische Einwirkung der Peptidyltransferase bei der Bildung der neuen Peptidbindung würde auch eine kinetische Regulation dieser Reaktion ermöglichen. Solche Regulation ist für die Erhöhung der Translationsgenauigkeit notwendig^[6, 202].

Falls wir an der traditionellen Ansicht festhalten, daß die enzymatische Aktivität die Funktion eines Proteins sein muß, dann sollte die Peptidyltransferase-Aktivität von einem einzigen Proteinmolekül bewirkt werden. Es ist nämlich nur schwer vorstellbar, daß ein aus zwei oder mehreren Molekülen zusammengesetztes aktives Zentrum durch Evolution entstehen konnte. Sehr lange wurde das Protein L16 als bester Kandidat für die Peptidyltransferase-Aktivität betrachtet^[203]. Diese Ansicht ist allerdings nicht mehr haltbar^[204, 205]. Der neueste potentielle Kandidat für das Peptidyltransferase-Protein ist das in vielen Organismen mit ähnlicher Struktur vorkommende ribosomale Protein L2^[187].

Da der Proteinbiosynthese-Apparat vor der Existenz der Proteine entstehen mußte, bestand das präbiotische Ribosom höchstwahrscheinlich nur aus RNA^[206, 207]. Diese Überlegung führt zu der Frage, ob RNA allein die Bildung der Peptidbindung katalysieren kann. Noch vor kurzer

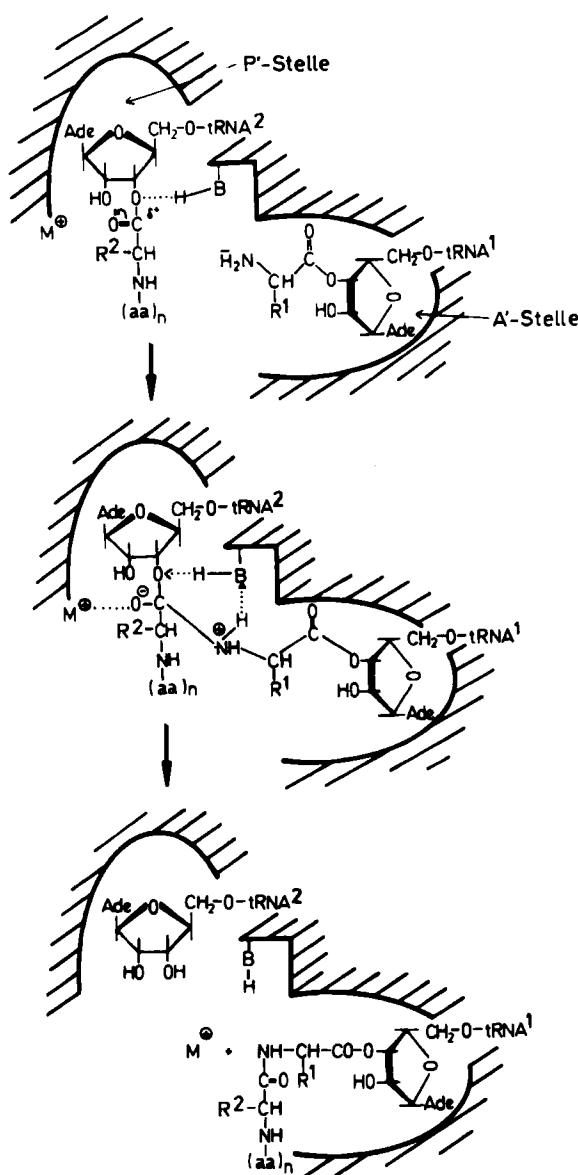


Abb. 34. Mechanismus der enzymatisch katalysierten Synthese einer Peptidbindung am Ribosom. An der Reaktion sind ein Metall-Ion M^+ und eine ribosomale funktionelle Gruppe B–H beteiligt, die als Protonenacceptor oder -donor fungiert. tRNA¹ ist die Aminoacyl-, tRNA² die Peptidyl-tRNA (Zeichnung in Anlehnung an [201]).

Zeit hätte man diese Frage als Ketzerei betrachtet, da katalytische Funktionen aus Tradition nur für Proteine reserviert waren und den Nucleinsäuren im Ribosom nur strukturelle Aufgaben zugeschrieben wurden. Dieses Konzept hat sich in letzter Zeit drastisch verändert. Nach unserer Kenntnis gibt es zwei eindeutige Beispiele für die katalytische Funktion von RNA, und zwar bei der Spaltung und der Synthese von Phosphodiesterbindungen zwischen Nucleinsäuren; Proteine sind an diesen Reaktionen nicht beteiligt^[208, 209]. Garrett und Wooley^[200] haben vor kurzem spekuliert, daß die Synthese der Peptidbindung am Ribosom möglicherweise durch die richtig plazierte 5'-Phosphatgruppe der Peptidyl-tRNA in einem Mechanismus, der dem in Abbildung 34 sehr ähnlich ist, katalysiert wird. Es wurde auch experimentell gezeigt, daß sich die ribosomale Poly(Phe)-Synthese durch Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe der tRNA verlangsamen läßt^[97]. Kritisch betrachtet ist dieser Effekt aber nicht groß genug, um der Phosphatgruppe eine katalytische Rolle bei der Peptidyl-

transferase-Reaktion zuzuschreiben. Der Vorschlag von Garrett und Wooley^[200] ist auch mit der Donoraktivität der Fragmente, z.B. C-C-A(fMet), nicht in Einklang zu bringen. Falls die zentrale Schleife der Domäne V der 23S-RNA ein Teil des Peptidyltransferase-Zentrums ist (siehe Abschnitt 5.3.9), wäre es plausibler, daß eine funktionelle Gruppe dieser Schleife die Deprotonierung der α -Aminogruppe der aa-tRNA und dadurch die Katalyse der Peptidyltransferase-Reaktion bewirkt. Direkte experimentelle Hinweise für diesen Vorschlag gibt es bisher jedoch nicht.

Nach neuesten Untersuchungen ist ein Komplex zwischen 16S- und 23S-RNA als primitives Ribosom wirksam und hat eine viel niedrigere, aber immerhin signifikante Aktivität bei der Poly(Phe)-Synthese^[210]. Burma et al. haben auch zeigen können, daß für die EF-Tu-abhängige Bindung der Phe-tRNA an den 16S- und 23S-RNA-Komplex die Gegenwart von 5S-RNA notwendig ist^[210]. Die 5S-RNA bindet an den 16S·23S-RNA-Komplex aber nur in Gegenwart von 5S-RNA-bindenden Proteinen (L5, L18, L15/25). Entsprechend müssen diese Proteine in das Experiment eingebracht werden. Kontrollexperimente zeigen allerdings eindeutig, daß diese Proteine an der Peptidyltransferase-Aktivität nicht beteiligt sind. Die enzymatische Aktivität, die zur Bildung der Peptidbindung führt, muß deshalb mit der 23S-RNA zusammenhängen. Höchstwahrscheinlich ist es die zentrale Schleife der Domäne V, welche an diesem Prozeß beteiligt ist. Viele Nucleotide in dieser einzelsträngigen Region der 23S-RNA wurden nämlich während der Evolution der Spezies nicht mehr ausgetauscht^[178, 181]; überdies führen einige Mutationen dieser Nucleotidreste zur Resistenz gegen Chloramphenicol und Erythromycin. Die Bindungsstelle des 3'-Endes der Peptidyl-tRNA in der Domäne II der 23S-RNA^[179] ist wahrscheinlich die P'-Stelle. Die Bindungsstelle des 3'-Endes der aa-tRNA an die Peptidyltransferase-Schleife der 23S-RNA (Domäne V), welche auch die katalytische Aktivität enthält, ist wahrscheinlich die A'-Stelle. Eine solche Konfiguration würde auch die Entkopplung der katalytischen Aktivität von der Bindung der Substrate gewährleisten. Diese Entkopplung ist für die Regulation der Peptidsynthese, die Korrekturmechanismen und den fehlerlosen Ablauf des Prozesses notwendig. Der Befund von Burma et al.^[210] hat deshalb weitreichende funktionelle Konsequenzen. So wurde auch zum ersten Mal gezeigt, daß die ribosomale RNA ihre primitiven Funktionen bei der Synthese von Proteinen beibehalten hat, daß dieser Prozeß aber während der Evolution durch die Proteine selbst stark verfeinert wurde.

7. Schlußfolgerungen und Ausblick

Die auf verschiedenen Wegen erhaltenen Daten ermöglichen es, die Wechselwirkung der 3'-terminalen C-C-A-Sequenz der tRNA mit Elongationsfaktoren und mit der ribosomalen A'- und P'-Stelle recht detailliert auf molekularer Ebene zu betrachten. Die wichtigsten Beobachtungen der letzten Zeit betreffen die Schlüsselrolle der 23S-RNA bei der Peptidyltransferase-Reaktion.

Die Wechselwirkung des 3'-Endes der aa-tRNA mit der entsprechenden Bindungsstelle von EF-Tu·GTP ist für die Bildung des ternären Komplexes und für die EF-Tu-kata-

lysierte GTP-Hydrolyse besonders wichtig. Sehr wahrscheinlich sind die Nucleobasen der C-C-A-Sequenz am Kontakt mit EF-Tu nicht direkt beteiligt. Während der enzymatischen Bindung der aa-tRNA an das Ribosom sind diese Nucleobasen frei und können mit der ribosomalen A'-Stelle wechselwirken. Es ist unklar, ob EF-Tu tatsächlich in bezug auf die 2',3'-Isomerie der aa-tRNA unspezifisch ist. Unsere heutigen Erkenntnisse zu diesem Problem stützen sich auf Modellstudien und können durch Unvollkommenheit dieser Modelle beeinflußt werden. Dagegen steht fest, daß die terminale C-C-A-Sequenz der aa-tRNA an der EF-Tu-abhängigen GTP-Hydrolyse beteiligt ist. Diese Erkenntnis ermöglicht allerdings keine Antwort auf die zentrale Frage: Welche Konformationsänderungen finden am EF-Tu-Molekül statt, die zur Hydrolyse von GTP durch das Protein führen? Auch die Frage, wie die Bindung anderer Teile der tRNA an EF-Tu oder an das Ribosom die Wechselwirkung der C-C-A-Sequenz der aa-tRNA mit dem Enzym beeinflußt, bleibt noch offen. Weiterhin bleibt zu klären, ob dieses Phänomen die GTPase-Aktivität des Elongationsfaktors auslöst.

Es ist nicht bekannt, ob intermediäre Wechselwirkungen zwischen dem 3'-Ende der aa-tRNA und der ribosomalen A'-Stelle nach der GTP-Hydrolyse und der Dissoziation von EF-Tu vom Ribosom stattfinden. Solche Zwischenstufen könnten beim Akkomodationsprozeß der tRNA an der ribosomalen A'-Stelle für die Korrekturmecanismen wichtig sein. Anstatt der aa-tRNA könnte an einem derartigen Prozeß auch eine Bewegung der ribosomalen RNA beteiligt sein. Ribosomale Proteine sind für die genaue Bindung des Aminoacylrestes für beide Substrate (Aminoacyl- oder Peptidyl-tRNA) sowie für die Bildung der Peptidbindung notwendig. Wir nehmen an, daß diese Proteine Bindungsstellen haben, welche die korrekte, für die Reaktion notwendige Orientierung beider Substrate gewährleisten. An dieser Bindung müssen mindestens die Carbonylgruppen sowie die Seitenketten des Aminoacylrestes beteiligt sein; Wechselwirkungen mit Resten des 3'-terminalen Adenosins sind ebenfalls wahrscheinlich. Die α-Aminogruppe des Acceptors und die Estercarbonylgruppe des Donors dürften an Wasserstoffbrücken zur katalytisch wirksamen Gruppe der Peptidyltransferase beteiligt sein.

Man nimmt an, daß die Peptidyltransferase-Reaktion durch eine funktionelle Gruppe in der zentralen Schleife der Domäne V der 23S-RNA katalysiert wird. Wir schlagen hier einen Mechanismus für die Peptidyltransferase-Reaktion vor, nach welchem die A'- und die P'-Stelle der Ribosomen durch G-G- sowie U-G-G-Sequenzen in der 23S-RNA gebildet werden. Diese Teile der 23S-RNA befinden sich in verschiedenen Domänen der Nucleotidkette und liegen als Basenpaare mit den C-C- und C-C-A-Sequenzen der Aminoacyl- und Peptidyl-tRNA vor. Die Domänen der 23S-RNA, die Teile der A'- und P'-Stellen sind, müssen für die Synthese der Peptidbindung in unmittelbare Nähe gebracht werden. Diese funktionsabhängige Faltung der 23S-RNA kann eine Regulation der Proteinbiosynthese bewirken, welche für die mechanistische Erklärung der Korrekturmecanismen gefordert wird.

Die katalytische Funktion bei der Peptidyltransferase-Reaktion schreiben wir der ribosomalen RNA zu. Die ribosomalen Proteine sind an diesem Prozeß wahrscheinlich nur durch eine Modulation der tRNA-Struktur beteiligt.

Eine ähnliche Funktion können auch die allosterisch regulierten Elongations- und Terminationsfaktoren haben, die Änderungen der ribosomalen Konfiguration bewirken.

Während der Translokation müssen, um eine Bewegung der tRNA zu erreichen, die Wechselwirkungen von zwei tRNAs mit entsprechenden ribosomalen Bindungsstellen aufgehoben werden. Dieser Prozeß umfaßt deshalb unter anderem das Schmelzen von fünf Basenpaaren zwischen dem 3'-Ende der beiden tRNAs und der 23S-RNA. Es gibt Hinweise, daß auch andere wichtige Strukturänderungen des C-C-A-Terminus der tRNA während der Translokation stattfinden, z. B. die Drehung der Nucleobase des 3'-terminalen Adenosins um die glycosidische Bindung. Falls die 3'-terminale Einheit der Peptidyl-tRNA an die P'-Stelle in einer *syn*-Konformation gebunden ist, würde eine derartige Struktur zu veränderter Basenpaarung sowie modifizierter Stapelung des C-C-A-Endes führen. Dieses Modell würde eine unterschiedliche Wirkungsweise der A'- und der P'-Stelle erklären.

Die Terminationsstufe der Proteinbiosynthese ist wahrscheinlich ebenfalls mit Strukturänderungen im Peptidyltransferase-Zentrum verbunden; nur so kann ein Wassermolekül Zugang zur normalerweise wasserfreien A'-Stelle finden. Diese Änderung könnte wiederum durch entsprechende Strukturvariation der 23S-RNA unter Beteiligung der entsprechenden Proteine erreicht werden.

Somit beruht die praktisch fehlerfreie Funktion des Proteinbiosynthese-Apparats auf der dynamischen Struktur der ribosomalen RNA und den spezifischen Wechselwirkungen der 3'-terminalen C-C-A-Sequenzen der Aminoacyl- und der Peptidyl-tRNA mit den entsprechenden Stellen des Ribosoms.

Die hier erwähnten Resultate aus unseren Arbeitsgruppen wurden zum Teil durch die stimulierende Zusammenarbeit mit Drs. A. Bhuta, P. Bhuta, T. Ott, K. Quiggle und D. Ringer (Detroit) sowie K.-H. Derwenskus, H. Faulhammer, W. Fischer und T. Wagner (Göttingen und Bayreuth) erreicht. Zu Dank verpflichtet sind wir auch Drs. D. P. Burma, E. Cundliffe und E. Küchler für die Mitteilung nicht publizierter Ergebnisse. Die Untersuchungen in unseren Laboratorien wurden durch folgende Institutionen großzügig unterstützt: National Institutes of Health (Grants GM-1911, GM-21151), National Science Foundation (Grant 82-97539) (an S. C.), United Foundation of Greater Detroit (Institutional Grant an die Michigan Cancer Foundation), Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sp 243/1-1) und Fonds der Chemischen Industrie (an M. S.). Ohne ein Aufenthaltsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (für S. C.) hätte dieser Aufsatz nicht entstehen können. Wir danken Drs. J. P. Horwitz, J. Žemlička (Detroit) sowie Michael Sprinzl und G. Sczakiel (Heidelberg) für kritische Anmerkungen zu diesem Manuskript und für anregende Diskussionen. Frau B. Wagner (Bayreuth) danken wir für die Anfertigung der Abbildungen.

Eingegangen am 24. Mai 1984 [A 521]

- [1] H. A. Sober: *Handbook of Biochemistry*, CRC Press, Cleveland, OH 1970.
- [2] D. Gauss, M. Sprinzl, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 1.
- [3] L. Lindahl, J. M. Zengel, *Adv. Genet.* 21 (1982) 53.
- [4] W. Newpert, G. Schatz, *Trends Biochem. Res.* 6 (1981) 1.
- [5] G. Kreil, *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981) 317.
- [6] M. Yarus in P. R. Schimmel, D. Soll, J. N. Abelson: *Transfer RNA. Structure, Properties and Recognition*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1979, S. 501.

- [7] A. Maelicke, M. Sprinzl, F. von der Haar, T. A. Khwaja, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 43 (1974) 617.
- [8] M. Sprinzl, G. E. Siboska, J. Pedersen, *Nucleic Acids Res.* 5 (1978) 861.
- [9] J. Ofengand in H. Weissbach, S. Pestka: *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis*, Academic Press, New York 1977, S. 8.
- [10] R. J. Harris, S. Pestka in [9], S. 413.
- [11] D. L. Miller, H. Weissbach in [9], S. 324.
- [12] R. H. Symons, R. J. Harris, P. Greenwell, D. J. Eckermann, E. F. Vannin, *Bioorg. Chem.* 7 (1978) 409.
- [13] A. A. Krayevsky, M. K. Kukhanova, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 23 (1979) 1.
- [14] M. Sprinzl, F. Cramer, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 22 (1979) 1.
- [15] S. Chládek in J. Augustynyak: *Biological Implications of Protein-Nucleic Acid Interactions*, Elsevier, Amsterdam 1980, S. 149.
- [16] R. Haselkorn, L. B. Rothman-Denes, *Annu. Rev. Biochem.* 42 (1973) 397.
- [17] E. Bermek, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 21 (1978) 64.
- [18] H. G. Gassen, *Angew. Chem.* 94 (1982) 15; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 23.
- [19] H. G. Wittmann, *Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 35.
- [20] R. B. Loftus, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 12 (1972) 87.
- [21] S. M. Hecht, *Acc. Chem. Res.* 10 (1977) 239.
- [22] J. J. Hopfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 35.
- [23] R. S. Mulvey, A. R. Fersht, *Biochemistry* 16 (1977) 4731.
- [24] F. Cramer, F. von der Haar, G. L. Igloi in [6], S. 267.
- [25] B. E. Griffin, M. Jarman, C. B. Reese, J. E. Sulston, D. R. Trentham, *Biochemistry* 5 (1966) 3638.
- [26] M. Sprinzl, F. Cramer, *Nature New Biol. (London)* 245 (1973) 3.
- [27] F. Schuber, M. Pinck, *Biochimie* 56 (1974) 383.
- [28] H. G. Zachau, W. Karau, *Chem. Ber.* 93 (1960) 1830.
- [29] C. S. McLaughlin, V. M. Ingram, *Biochemistry* 4 (1965) 1442.
- [30] D. Hentzen, P. Mandel, J. P. Garrel, *Biochim. Biophys. Acta* 281 (1972) 228.
- [31] R. W. Hay, P. J. Morris, *J. Chem. Soc. B* 1967, 1261.
- [32] G. Hevré, F. J. Chapeville, *J. Mol. Biol.* 12 (1965) 757.
- [33] R. W. Hay, L. J. Porter, *J. Chem. Soc. B* 1967, 1261.
- [34] M. Taji, S. Yokoyama, T. Miyazawa, *Biochemistry* 22 (1983) 3220.
- [35] J. Forchhammer, L. Lindhal, *J. Mol. Biol.* 55 (1971) 563.
- [36] R. Wolfenden, D. H. Rammler, F. Lipmann, *Biochemistry* 3 (1964) 329.
- [37] M. Sundaralingam, S. K. Arora, *J. Mol. Biol.* 71 (1972) 49.
- [38] R. O. Potts, N. C. Ford, Jr., M. J. Fournier, *Biochemistry* 20 (1981) 1653.
- [39] P. Davanloo, M. Sprinzl, F. Cramer, *Biochemistry* 15 (1979) 3189.
- [40] M. Sprinzl, H. Sternbach, F. von der Haar, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 81 (1977) 579.
- [41] T. H. Fraser, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3044.
- [42] G. Zubay, M. Takanami, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15 (1964) 207.
- [43] B. Belchev, M. N. Thang, C. Portier, *Eur. J. Biochem.* 19 (1971) 194.
- [44] A. G. Bruce, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* 21 (1982) 855.
- [45] H. Uemura, M. Imai, E. Ohtsuka, M. Ikebara, D. Soll, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 6531.
- [46] H. Paulsen, W. Wintermeyer, *Eur. J. Biochem.* 138 (1984) 117.
- [47] T. G. Heckler, Y. Zama, T. Naka, S. M. Hecht, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 4492.
- [48] S. M. Hecht, B. Alford, Y. Kuroda, S. Kitano, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 4517.
- [49] M. Takanami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52 (1964) 1271.
- [50] G. Kumar, L. Celewicz, S. Chládek, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 634.
- [51] J. D. Watson, *Bull. Soc. Chem. Biol.* 46 (1964) 1399.
- [52] R. J. Harris, R. H. Symons, *Bioorg. Chem.* 2 (1973) 266.
- [53] J. Lucas-Lenard, P. Tao, A.-L. Haenni, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34 (1969) 455.
- [54] P. Bhuta, S. Chládek, *FEBS Lett.* 122 (1980) 113.
- [55] H.-J. Rheinberger, H. Sternbach, K. H. Nierhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 5310.
- [56] H.-J. Rheinberger, K. H. Nierhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 4213.
- [57] M. Sprinzl, M. Kucharzewski, J. B. Hobbs, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 78 (1977) 55.
- [58] K.-H. Derwenskus, W. Fischer, M. Sprinzl, *Anal. Biochem.* 136 (1984) 161.
- [59] L. Beres, J. Lucas-Lenard, *Biochemistry* 12 (1973) 3998.
- [60] A. Pingoud, C. Urbanke, *Biochemistry* 19 (1980) 2108.
- [61] D. Ringer, S. Chládek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2950.
- [62] G. Chinali, M. Sprinzl, A. Parmeggiani, F. Cramer, *Biochemistry* 13 (1974) 3001.
- [63] J. Jonák, J. Smrt, A. Holý, I. Rychlik, *Eur. J. Biochem.* 105 (1980) 315.
- [64] G. Parlato, J. Guesnet, J.-B. Crechet, A. Parmeggiani, *FEBS Lett.* 125 (1981) 257.
- [65] S. Campuzano, J. Modolell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 905.
- [66] P. Bhuta, G. Kumar, S. Chládek, *Biochemistry* 21 (1982) 899.
- [67] E. Baksh, N. de Groot, M. Sprinzl, F. Cramer, *Biochemistry* 15 (1976) 3639.
- [68] E. Baksh, N. de Groot, *Mol. Biol. Rep.* 1 (1974) 493.
- [69] S. Watanabe, *J. Mol. Biol.* 67 (1972) 443.
- [70] P. Leder, H. Bursztyn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25 (1966) 233.
- [71] I. Rychlik, J. Černá, S. Chládek, P. Pulkrabek, J. Žemlička, *Eur. J. Biochem.* 16 (1970) 136.
- [72] R. E. Monroe, *J. Mol. Biol.* 26 (1967) 147.
- [73] R. E. Monroe, K. A. Marcker, *J. Mol. Biol.* 25 (1967) 347.
- [74] T. Hishizawa, S. Pestka, *Arch. Biochem. Biophys.* 147 (1971) 624.
- [75] E. Silverstein, *Biochim. Biophys. Acta* 186 (1969) 402.
- [76] J. Černá, I. Rychlik, S. Chládek, J. Žemlička, *Biochim. Biophys. Acta* 204 (1970) 203.
- [77] J. Černá, *FEBS Lett.* 58 (1975) 94.
- [78] J. L. Lessard, S. Pestka, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 6901.
- [79] P. Bhuta, G. Kumar, S. Chládek, *Biochim. Biophys. Acta* 696 (1982) 208.
- [80] M. L. Celma, R. E. Monroe, D. Vazquez, *FEBS Lett.* 6 (1970) 273.
- [81] A. Bhuta, K. Quiggle, T. Ott, D. Ringer, S. Chládek, *Biochemistry* 20 (1981) 8.
- [82] M. Grunberg-Manago, F. Gros, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 20 (1977) 209.
- [83] N. H. Woo, B. A. Roe, A. Rich, *Nature (London)* 286 (1980) 346.
- [84] J. Ofengand, Z. Hussain, *Nucleic Acids Res.* 1 (1974) 1079.
- [85] R. M. Sundari, H. Pelka, L. D. Schulman, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 3941.
- [86] M. Sprinzl, unveröffentlicht.
- [87] A. E. Johnson, D. L. Miller, C. R. Cantor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 3075.
- [88] A. S. Boutorin, B. F. C. Clark, J.-P. Ebel, T. B. Kruse, H. U. Peterson, P. Remy, S. J. Vasilenko, *J. Mol. Biol.* 152 (1981) 593.
- [89] F. P. Wikman, G. E. Siboska, H. U. Petersen, B. F. C. Clark, *EMBO J.* 7 (1982) 1095.
- [90] H. J. Adkins, D. L. Miller, A. E. Johnson, *Biochemistry* 22 (1983) 1208.
- [91] G. Parlato, R. Pizzano, D. Picone, J. Guesnett, O. Fasano, A. Parmeggiani, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 995.
- [92] L. H. Schulman, H. Pelka, R. M. Sundari, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 7102.
- [93] D. Picone, A. Parmeggiani, *Biochemistry* 22 (1983) 4400.
- [94] J. Sedláček, J. Jonák, I. Rychlik, *FEBS Lett.* 68 (1976) 208.
- [95] S. Fahnestock, H. Weissbach, A. Rich, *Biochim. Biophys. Acta* 269 (1972) 62.
- [96] K.-H. Derwenskus, M. Sprinzl, *FEBS Lett.* 151 (1983) 143.
- [97] M. Sprinzl, E. Graeser, *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 4737.
- [98] R. Calendar, P. Berg, *Biochemistry* 5 (1966) 1690.
- [99] T. Yamane, D. L. Miller, J. I. Hopfield, *Biochemistry* 20 (1981) 7059.
- [100] T. Wagner, M. Sprinzl, *Eur. J. Biochem.* 108 (1980) 213.
- [101] R. G. Knowlton, M. Yarus, *J. Mol. Biol.* 139 (1980) 721.
- [102] S. M. Hecht, K. H. Tan, C. Chinault, P. Arcari, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 437.
- [103] J. Ofengand, C.-M. Chen, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 2049.
- [104] E. Jekowsky, D. L. Miller, P. R. Schimmel, *J. Mol. Biol.* 114 (1977) 451.
- [105] T. A. Kruse, B. F. C. Clark, B. Appel, V. A. Erdmann, *FEBS Lett.* 117 (1980) 315.
- [106] M. N. Thang, L. Dondon, B. Rether, *FEBS Lett.* 26 (1972) 145.
- [107] T. A. Kruse, G. E. Siboska, M. Sprinzl, B. F. C. Clark, *Eur. J. Biochem.* 107 (1980) 1.
- [108] G. Chinali, H. Wolf, A. Parmeggiani, *Eur. J. Biochem.* 75 (1977) 55.
- [109] T. Wagner, F. Cramer, M. Sprinzl, *Biochemistry* 21 (1982) 1521.
- [110] D. Ringer, S. Chládek, J. Ofengand, *Biochemistry* 15 (1976) 2759.
- [111] P. Bhuta, S. Chládek, *Biochim. Biophys. Acta* 699 (1982) 293.
- [112] D. L. Miller, J. Hachmann, H. Weissbach, *Arch. Biochem. Biophys.* 144 (1971) 115.
- [113] J. Jonák, I. Rychlik, *FEBS Lett.* 117 (1980) 167.
- [114] A. Liljas, *Proc. Biophys. Mol. Biol.* 40 (1982) 161.
- [115] D. Donner, R. Villemans, A. Liljas, C. G. Kurland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 3192.
- [116] T. Hishizawa, J. L. Lessard, S. Pestka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66 (1970) 523.
- [117] S. Pestka, T. Hishizawa, J. L. Lessard, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 6208.
- [118] S. Fahnestock, H. Neumann, E. Shashoua, A. Rich, *Biochemistry* 9 (1970) 2477.
- [119] J. Gooch, A. O. Hawtrey, *Biochem. J.* 149 (1975) 209.
- [120] J. Žemlička, S. Chládek, *Coll. Czech. Chem. Commun.* 34 (1969) 1007.
- [121] T. Kato, J. Žemlička, *J. Org. Chem.* 45 (1980) 4006.
- [122] W. D. Ingles, J. R. Knowles, *Biochem. J.* 109 (1967) 369.
- [123] D. Nathans, A. Neidle, *Nature (London)* 197 (1963) 1076.
- [124] J. P. Waller, T. Erdős, F. LeMoine, S. Guttmann, E. Sandrin, *Biochim. Biophys. Acta* 119 (1966) 566.
- [125] R. H. Symons, R. J. Harris, L. P. Clarke, J. F. Wheldrake, W. H. Elliott, *Biochim. Biophys. Acta* 179 (1969) 248.

- [126] R. J. Harris, J. E. Hanlon, R. H. Symons, *Biochim. Biophys. Acta* 240 (1971) 244.
- [127] D. J. Eckermann, P. Greenwell, R. H. Symons, *Eur. J. Biochem.* 41 (1974) 547.
- [128] R. Goldberg, D. Ringer, S. Chládek, *Eur. J. Biochem.* 81 (1977) 373.
- [129] R. E. Monro, J. Černá, K. A. Marcker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61 (1968) 1042.
- [130] A. A. Krayevsky, M. K. Kukhanova, B. P. Gottikh, *Nucleic Acids Res.* 2 (1975) 2223.
- [131] T. F. B. Mercer, R. H. Symons, *Eur. J. Biochem.* 28 (1972) 38.
- [132] K. Quiggle, G. Kumar, T. W. Ott, E. K. Ryu, S. Chládek, *Biochemistry* 20 (1981) 3480.
- [133] S. Chládek, P. Bhuta, *Biochim. Biophys. Acta* 696 (1982) 212.
- [134] M. Adriatti, A. O. Hawtrey, *Biochem. J.* 145 (1975) 169.
- [135] R. Vince, K.-L. L. Fong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81 (1978) 559.
- [136] K.-L. L. Fong, R. Vince, *J. Med. Chem.* 21 (1978) 792.
- [137] J. Žemlička, A. Bhuta, P. Bhuta, *J. Med. Chem.* 28 (1983) 167.
- [138] H. R. Bosshard, *FEBS Lett.* 38 (1974) 139.
- [139] S. G. Cohen, *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 1969, 705.
- [140] T. H. Fraser, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 2671.
- [141] S. M. Hecht, J. M. Kozařich, F. J. Schmidt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 4317.
- [142] V. A. Pozdnyakov, Yu. Mitin, M. K. Kukhanova, L. V. Nikolaeva, A. A. Krayevsky, B. P. Gottikh, *FEBS Lett.* 24 (1972) 177.
- [143] Z. Hussain, J. Ofengand, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50 (1973) 1143.
- [144] S. Chládek, D. Ringer, J. Žemlička, *Biochemistry* 12 (1973) 5135.
- [145] S. Chládek, D. Ringer, K. Quiggle, *Biochemistry* 13 (1974) 2727.
- [146] C. Altona in M. Sundaralingam, S. T. Rao: *Conformations of Nucleic Acids and Protein-Nucleic Acid Interactions*. University Park Press, Baltimore, MD 1975, S. 613.
- [147] H. P. M. De Leeuw, J. R. Jager, H. J. Koeners, J. H. van Boom, C. Altona, *Eur. J. Biochem.* 76 (1977) 209.
- [148] W. Guschbauer, *Int. Symp. Biomolecular Structure, Conformation, Function and Evolution*, Madras (Indien) 1978.
- [149] K. Quiggle, S. Chládek, *FEBS Lett.* 118 (1980) 172.
- [150] I. Rychlik, S. Chládek, J. Žemlička, *Biochim. Biophys. Acta* 138 (1967) 640.
- [151] B. P. Gottikh, L. V. Nikolayeva, A. A. Krayevski, L. L. Kisselov, *FEBS Lett.* 7 (1970) 112.
- [152] S. Pestka, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 4939.
- [153] S. Pestka, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 4038.
- [154] D. A. Peattie, W. Herr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 2273.
- [155] I. Rychlik, J. Černá, S. Chládek, J. Žemlička, Z. Haladová, *J. Mol. Biol.* 43 (1969) 13.
- [156] J. Žemlička, S. Chládek, D. Ringer, K. Quiggle, *Biochemistry* 14 (1975) 5239.
- [157] C. Li, P. Bhuta, J. Žemlička, *Biochemistry* 17 (1978) 2537.
- [158] S. Chládek, D. Ringer, E. M. Abraham, *Nucleic Acids Res.* 3 (1976) 1215.
- [159] K. Quiggle, M. L. Wejrowski, S. Chládek, *Biochemistry* 17 (1978) 94.
- [160] E. Bakst, N. de Groot, M. Sprinzl, F. Cramer, *FEBS Lett.* 55 (1975) 105.
- [161] J. Žemlička, P. Bhuta, *Abstr. XIth Int. Meeting Biochem.*, Toronto 1979, 02-2-H, 65.
- [162] A. M. Bobst, S. Chládek, *Nucleic Acids Res.* 3 (1976) 63.
- [163] E. Hengesh, A. J. Morris, *Biochim. Biophys. Acta* 299 (1973) 654.
- [164] J. Černá, I. Rychlik, A. A. Krayevsky, B. P. Gottikh, *FEBS Lett.* 37 (1973) 188.
- [165] J. Černá, I. Rychlik, A. A. Krayevsky, B. P. Gottikh, *Acta Biol. Med. Ger.* 33 (1979) 877.
- [166] S. V. Popovkina, S. G. Zavgorodnii, A. V. Azhayev, V. V. Kotusov, R. Ya. Vigestane, L. S. Victorova, M. K. Kukhanova, N. V. Gnechev, A. A. Krayevsky, B. P. Gottikh, *Mol. Biol. (USSR)* 12 (1978) 397.
- [167] H. Paulsen, W. Wintermeyer, *Eur. J. Biochem.* 138 (1984) 125.
- [168] S. Pestka, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34 (1969) 395.
- [169] D. Ringer, K. Quiggle, S. Chládek, *Biochemistry* 14 (1975) 514.
- [170] B. Ulrich, G. Mertens, K. D. Nierhaus, *Arch. Biochem. Biophys.* 190 (1978) 149.
- [171] J. Černá, A. Holý, I. Rychlik, *Coll. Czech. Chem. Commun.* 43 (1978) 3280.
- [172] A. A. Krayevsky, L. S. Victorova, V. V. Kotusov, M. K. Kukhanova, A. A. Trebogianov, N. B. Tarussova, B. P. Gottikh, *FEBS Lett.* 62 (1976) 101.
- [173] B. S. Cooperman in G. Chambliss, G. R. Gravern, T. Davies, K. Davis, L. Kahan, M. Nomura: *Ribosomes, Structure, Function, and Genetics*. University Press, Baltimore, MD 1979, S. 531.
- [174] M. D. Topal, T. R. Fresco, *Nature (London)* 263 (1976) 289.
- [175] B. Dujon, *Cell* 20 (1980) 185.
- [176] S. E. Kearsey, I. W. Craig, *Nature (London)* 291 (1981) 607.
- [177] R. Skinner, E. Cundliffe, F. J. Schmidt, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 12702.
- [178] H. F. Noller, J. Kop, V. Wheaton, J. Brosius, R. R. Gutell, A. M. Kopylov, F. Dohme, W. Herr, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 6167.
- [179] A. Barta, G. Steiner, J. Brosius, H. F. Noller, E. Kuchler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 3607.
- [180] W. Steige, C. Glotz, R. Brimacombe, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 1687.
- [181] C. Branlant, A. Krol, M. A. Machatt, J. Pouyet, J.-P. Ebel, K. Edwards, H. Kössel, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 4303.
- [182] D. Vazquez, *FEBS Lett.* 40 (1974) 563.
- [183] D. T. Eckermann, R. H. Symons, *Eur. J. Biochem.* 82 (1978) 225.
- [184] H. F. Noller, C. R. Woese, *Science* 212 (1981) 403.
- [185] P. Leder, *Adv. Protein Chem.* 27 (1973) 213.
- [186] T. Wagner, M. Sprinzl, *Biochemistry* 22 (1983) 94.
- [187] F. Dohme, S. R. Fahnestock, *J. Mol. Biol.* 129 (1979) 63.
- [188] I. Rychlik, J. Černá, S. Chládek, P. Pulkrabek, J. Žemlička, Z. Haladová, *FEBS Symp.* 21 (1970) 47.
- [189] S. Fahnestock, A. Rich, *Nature New Biol. (London)* 229 (1971) 8.
- [190] S. Fahnestock, A. Rich, *Science* 173 (1971) 340.
- [191] L. S. Victorova, L. S. Kotusov, A. V. Azhayev, A. A. Krayevsky, M. K. Kukhanova, B. P. Gottikh, *FEBS Lett.* 68 (1976) 215.
- [192] N. B. Tarussova, G. M. Jacovleva, L. S. Victorova, M. K. Kukhanova, R. M. Khomutov, *FEBS Lett.* 130 (1981) 85.
- [193] W. P. Tate, C. T. Caskey, *Mol. Cell. Biochem.* 5 (1974) 115.
- [194] E. Scolnik, G. Milman, M. Rossmann, C. T. Caskey, *Nature (London)* 225 (1970) 152.
- [195] K. H. Nierhaus, H. Schulz, B. S. Coopermann, *Biochem. Int.* 1 (1980) 185.
- [196] I. Rychlik, J. Černá, *Biochem. Int.* 1 (1980) 193.
- [197] K. K. Wang, N. D. Zahid, R. M. Baxter, *Eur. J. Biochem.* 58 (1975) 397.
- [198] R. M. Baxter, N. D. Zahid, *Eur. J. Biochem.* 91 (1978) 49.
- [199] J. Černá, I. Rychlik, *FEBS Lett.* 119 (1980) 343.
- [200] R. A. Garrett, P. Wooley, *Trends Biochem. Sci.* 7 (1982) 385.
- [201] V. B. Cheney, *J. Med. Chem.* 17 (1974) 590.
- [202] K. H. Nierhaus, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 97 (1982) 81.
- [203] V. G. Moore, R. E. Achinson, G. Thomas, M. Moran, H. F. Noller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 844.
- [204] T. Maiments, M. Ustav, R. Villem, *Eur. J. Biochem.* 135 (1983) 127.
- [205] W. P. Tate, H. Schulze, K. H. Nierhaus, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 1810.
- [206] F. H. C. Crick, *J. Mol. Biol.* 38 (1968) 367.
- [207] L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* 38 (1968) 381.
- [208] T. R. Cech, A. T. Zang, P. J. Grabowski, *Cell* 27 (1981) 487.
- [209] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* 35 (1983) 849.
- [210] D. P. Burma, D. S. Tevari, A. K. Shrivastava, persönliche Mitteilung.