

Die Tricks der ribosomalen Elongationsfaktoren**

Knud H. Nierhaus*

Elongationsfaktoren (EF) katalysieren die Proteinbiosynthese. Zwei Klassen werden unterschieden: EF-Tu und EF-G in Eubakterien sowie EF-1 und EF-2 in Archaeobakterien und Eukaryonten. Sie können in mindestens zwei Konformationen vorliegen, in einer sind sie an GDP, in einer anderen an GTP gebunden. Daneben können wie im Fall von EF-Tu und EF-1 noch andere Liganden auftreten.

Kristallstrukturanalysen der verschiedenen Formen, in denen EF-Tu auftreten kann^[1-5], sowie von EF-G mit und ohne GDP^[6,7] haben uns aufregende Einblicke in die Funktionsweisen der Elongationsfaktoren sowie in ribosomale Mechanismen gewährt. Die größten Überraschungen lieferte die Kristallstrukturanalyse des ternären Komplexes Aminoacyl-tRNA · EF-Tu · GTP^[4]. Bevor die Strukturen und die funktionellen Implikationen diskutiert werden, wird kurz die Proteinbiosynthese beschrieben.

In allen Zellen übersetzen Ribosomen die genetische Information, die als Nucleinsäure (DNA oder RNA) gespeichert ist, in Proteine. Nucleinsäuren sind aus vier Bausteinen, den Nucleotiden aufgebaut; eine Sequenz von drei Nucleotiden (Codon) bestimmt eindeutig einen Baustein der Proteine (Aminosäure). Nucleinsäuren und Proteine sind unverzweigte Kettenmoleküle. Als Informationsspeicher dient fast immer DNA, nur einige wichtige Virusfamilien, z.B. das HIV-Virus, speichern die Information als RNA. Um die in einem Gen gespeicherte Information in eine Proteinsequenz umzusetzen, wird der entsprechende Abschnitt auf der DNA in eine mRNA umgeschrieben (Transkription). Die Summe aller mRNAs einer Zelle ist das aktuelle Syntheseprogramm der Zellproteine, deren zentrale Bedeutung für die Lebensvorgänge schon allein daran ersichtlich ist, daß mehr als 99,9% der Enzyme Proteine sind. Die an sich umständliche Transkriptionsprozedur ermöglicht es, das Syntheseprogramm zu regulieren und wechselnden Bedingungen anzupassen: Der Informationsspeicher, die DNA, ist sehr langlebig (viele Jahre), eine mRNA als Synthesevorschrift sehr kurzlebig und kann deshalb leicht reguliert werden (Halbwertszeiten von Sekunden bis Minuten; eine der langlebigsten mRNAs ist die für Globin in Erythrozyten: bis zu 100 Tage).

Die Ribosomen wandern entlang einer mRNA und synthetisieren dabei die Proteine. Sie können nicht selbst die Codons lesen, sondern nutzen Transfer-RNAs (tRNAs). tRNAs sind L-förmige Moleküle, die als Aminoacyl-tRNA am kurzen Arm eine Aminosäure tragen und am langen Arm drei Nucleotide exponieren, die jeweils komplementär zu dem Codon sind, das die betreffende Aminosäure codiert. Das exponierte Trinucleotid heißt deshalb Anticodon. Ein Ribosom bewegt sich in Codonschritten entlang der mRNA, der Schritt eine Codonlänge vorwärts wird Translokation genannt.

Während der Elongation, der Verlängerung der Polypeptidkette um jeweils eine Aminosäure, befinden sich mindestens zwei tRNAs auf dem Ribosom. Vor der Translokation liegen sie in der ribosomalen A- und P-Region; "A" steht für Aminoacyl-tRNA und "P" für Peptidyl-tRNA (Abb. 1), nach der Translokation in der ribosomalen P- und E-Region; "E" steht für "Exit", da die von ihrem Acyl-Rest befreite tRNA von dieser Region des Ribosoms bei der nächsten A-Region-Besetzung entlassen wird. Die ribosomalen Zustände vor (Prä, Abb. 1) und nach der Translokation (Post) sind die Hauptzustände des aktiven Ribosoms, die durch hohe Energiebarrieren getrennt sind (80 bis 90 kJ mol⁻¹^[8]). Der Post-Zustand ist wahrscheinlich energetisch günstiger als der Prä-Zustand. Hierfür spricht, daß nach Bildung einer Peptidbindung eine Inkubation von einigen Minuten bei 37 °C ausreicht, um eine Translokation auch ohne EF-G und GTP herbeizuführen (spontane Translokation^[9]). Dagegen ist eine Umkehrung der Translokation von einem Post-Zustand aus noch nicht beobachtet worden. Man kann jedoch einen Post-Zustand in Gegenwart eines A-Region-Liganden wie *N*-Acetyl-Phe-tRNA auch ohne EF-Tu und GTP in den Prä-Zustand überführen.

Die Elongationsfaktoren erniedrigen die Aktivierungsenergie und beschleunigen die Proteinsynthese um mehr als das 10⁴-fache. Damit ähneln sie Enzymen, die auch die Aktivierungsenergie einer Reaktion erniedrigen und zu hohen Beschleunigungsfaktoren von 10⁶ bis 10¹² führen. Enzyme beschleunigen eine Reaktion nur bis zum Erreichen des Gleichgewichtes, d. h. sie können Hin- und Rückreaktion katalysieren. Ein Elongationsfaktor kann mehr: Er beschleunigt eine Reaktion und bestimmt die Reaktionsrichtung, z.B. katalysiert EF-Tu den Post → Prä-Übergang des Ribosoms und EF-G den Prä → Post-Übergang. Aus diesem Grund gibt es zwei Elongationsfaktoren, für jede der beiden Reaktionsrichtungen eine. Nur die höheren Pilze wie Hefe oder *Candida albicans* haben einen dritten Faktor EF-3, der als E-Region-Faktor für die Proteinsynthese unerlässlich ist^[10].

Die universellen Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G sind Prototypen der großen Superfamilie der G-Proteine, die wichtige Prozesse der Zelle an- und abschalten. G-Proteine sind GTPasen und durchlaufen bei ihren Regulationsvorgängen einen typischen GTPase-Cyclus^[11]. Sie können GTP und GDP binden und dabei eine AN- und eine AUS-Konformation einnehmen. In der AN-Konformation – GTP ist gebunden – können sie an ein Protein oder einen Komplex binden und eine Reaktion auslösen. Anschließend wird das GTPase-Zentrum aktiviert; nach Abspaltung des endständigen Phosphatrestes hat das G-Protein GDP gebunden, nimmt die AUS-Konformation ein und dissoziiert vom Protein oder Komplex. Nach Regeneration des GTPs kann ein neuer GTPase-Cyclus beginnen.

Abbildung 1 zeigt die GTPase-Cyclus von EF-G und EF-Tu, die in der AN-Konformation an das Ribosom binden. Dabei folgt EF-G dem für ein G-Protein denkbar einfachsten Schema. Im Komplex mit GTP bindet EF-G an das Ribosom, das im Prä-Zustand sein und nach dem Peptidyltransfer die Peptidyl-

[*] Prof. Dr. K. H. Nierhaus
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, AG Ribosomen
Innstraße 73, D-14195 Berlin
Telefax: Int. +30/8413-1380
E-mail: nierhauskh@mping-berlin-dahlem.mpg.de

[**] Ich danke Eva Philippi für die Zeichnungen.

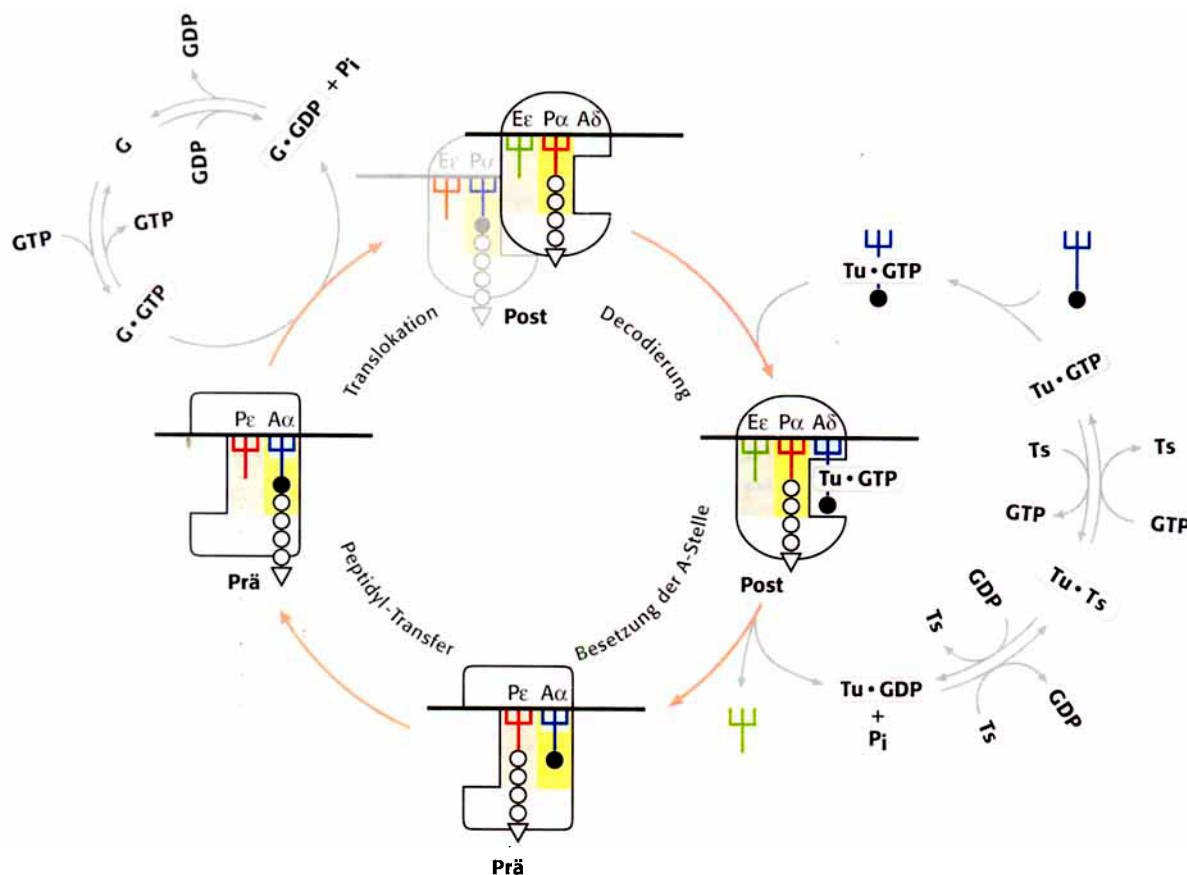


Abb. 1. Der ribosomale Elongationszyklus (im Zentrum) und die GTPase-Cyklen der Elongationsfaktoren EF-Tu (rechts, als Tu abgekürzt) und EF-G (links, als G abgekürzt). Der Elongationszyklus ist nach dem α - ϵ -Modell dargestellt, wonach die beiden tRNAs am Ribosom an eine bewegliche Domäne gebunden sind. Diese enthält zwei Bindungsstellen α und ϵ . Die beiden Bindungsstellen exponieren die tRNAs in der A- und P-Region, solange das Ribosom im Prä-Zustand ist, und bewegen sie während der Translokation in die P- und E-Region. Damit ist der Post-Zustand etabliert. In der A-Region ist das starre Decodierungszentrum δ , das mit der A-Stelle im Prä-Zustand, nicht jedoch im Post-Zustand überlappt.

tRNA in der A-Region tragen muß (Abb. 1). EF-G · GTP erniedrigt die Energiebarriere zwischen Prä- und Post-Zustand des Ribosoms, und da das Ribosom im Post-Zustand offensichtlich ein niedrigeres Energieniveau einnimmt, geht es in diesen Zustand über und trägt nun die Peptidyl-tRNA in der P- und die deacylierte tRNA in der E-Region. Über einen unbekannten Mechanismus aktiviert das Ribosom das GTPase-Zentrum des EF-Gs, das EF-G · GDP nimmt die AUS-Konformation ein und dissoziiert vom Ribosom. Dann wird die Energiebarriere wieder errichtet, die das Ribosom im Post-Zustand hält. EF-G hat eine sehr geringe Affinität zu GTP und GDP ($2.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ^[12] bzw. $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ^[13]); die Zellkonzentrationen von GTP und GDP (etwa 1 mM und 0.1 mM^[14]) haben zur Folge, daß GDP und GTP ohne einen zusätzlichen Faktor ersetzt und so ein neuer EF-G-Cyclus begonnen werden kann.

Die Verhältnisse mit EF-Tu sind komplizierter. EF-Tu · GTP kann nicht allein an das Ribosom binden, es muß erst mit einer Aminoacyl-tRNA den ternären Komplex Aminoacyl-tRNA · EF-Tu · GTP bilden. Dies ist eine Folge der zweiten wesentlichen Aufgabe, die EF-Tu neben der Katalyse des Post → Prä-Überganges erfüllen muß: Transport einer Aminoacyl-tRNA zum Ribosom. Die Struktur des ternären Komplexes im Kristall (Abb. 2A^[4]) hält hier ihre erste Überraschung bereit. Das Ribosom sollte die Codon-Anticodon-Wechselwirkung mehrfach nutzen (Proofreading), um die Präzision von

etwa einem Fehler auf tausend eingebaute Aminosäuren zu erreichen. Hypothesen für die Proofreading-Mechanismen gehen davon aus, daß EF-Tu die bei der GTP-Spaltung freiwerdende Energie nutzt, um den Proofreading-Prozeß anzutreiben^[15]. Die Kristallstrukturanalyse des ternären Komplexes ergab jedoch (Abb. 2A), daß EF-Tu die Aminoacyl-tRNA am kurzen Arm der tRNA ca. 50 Å weit entfernt vom Anticodon bindet und damit kaum eine Möglichkeit hat, in den Mechanismus der Codon-Anticodon-Wechselwirkung einzugreifen. In Einklang damit stehen Ergebnisse von Untersuchungen^[16], nach denen wahrscheinlich die Bindung einer korrekten Codon-Anticodon-Struktur im ribosomalen Decodierungszentrum δ genügend Energie aufbringt, um die Präzision der Proteinbiosynthese von 1:1000 auch ohne Proofreading zu erreichen. Damit werden unsere Vorstellungen über die Selektion des korrekten ternären Komplexes erheblich vereinfacht.

Es ist demnach wahrscheinlich, daß die Korrektheit der Codon-Anticodon-Wechselwirkung im Decodierungszentrum δ ohne Beteiligung von EF-Tu geprüft wird. Erst nachdem die Decodierung erfolgreich abgeschlossen ist, können EF-Tu und die Aminoacyl-tRNA außerhalb des Anticodons an das Ribosom binden, d. h. erst dann wird die hohe Bindungsenergie von EF-Tu und der Aminoacyl-tRNA genutzt, um das Ribosom auf das Energieniveau des Prä-Zustandes zu bringen. Bei den Replikasen und Transkriptasen, die DNA bzw. RNA synthetisieren,

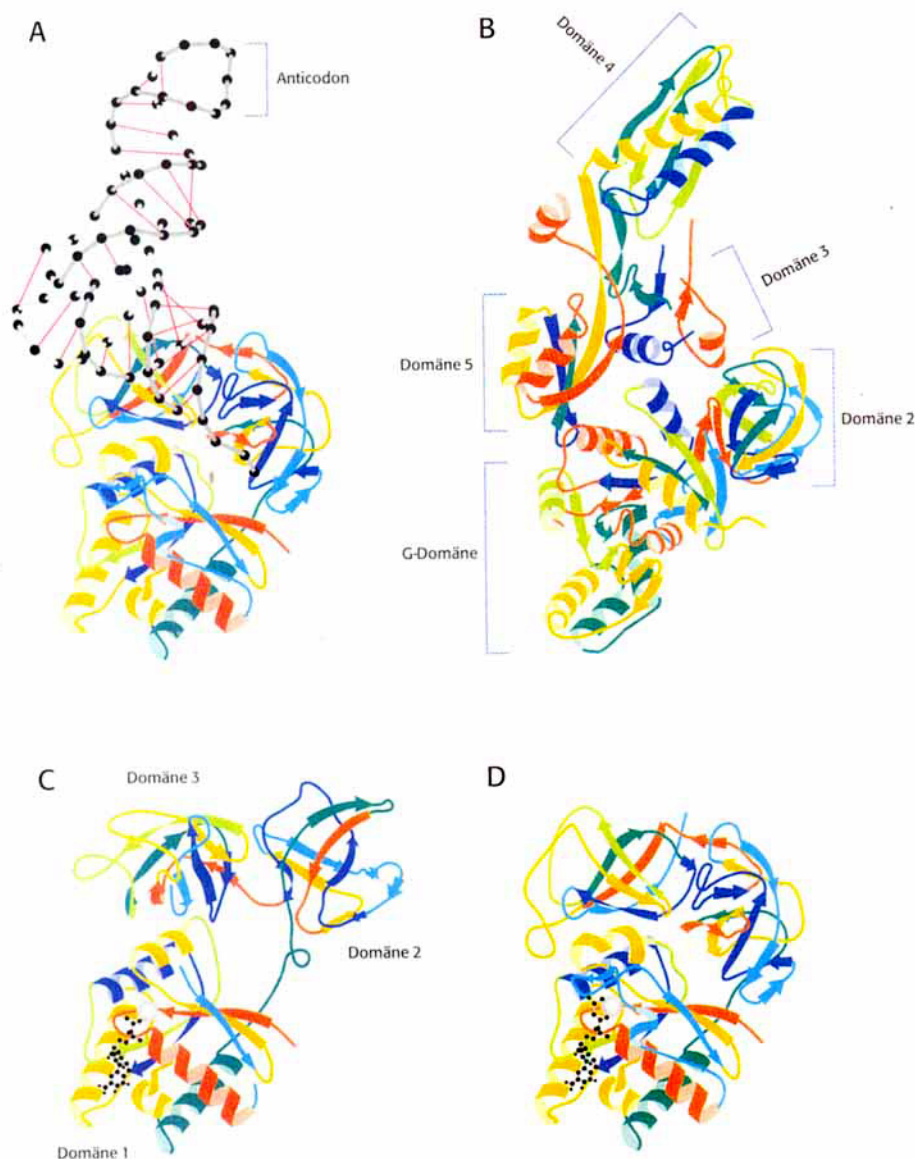


Abb. 2. Strukturen der Elongationsfaktoren im Kristall. A, Struktur des ternären Komplexes Phe-tRNA · EF-Tu · GTP, modifiziert nach Lit. [4, 21]. B, Struktur von EF-G von *T. thermophilus*, modifiziert nach Lit. [6, 7]. C und D, Strukturen von EF-Tu · GDP bzw. EF-Tu · GTP. Die *E.-coli*-Sequenz von EF-Tu wurde analog der Struktur von EF-Tu · GTP von *Thermus thermophilus* [2] modelliert [21]. GTP und GDP sind schwarz dargestellt, das Mg^{2+} -Ion als graue Kugel, modifiziert nach Lit. [21].

wird die Korrektheit einer Basenpaarung während der Nucleinsäuresynthese ohne Proofreading-Mechanismen überprüft, was zu einer Genauigkeit der Basenselektion größer als 1:10 000 führt^[17].

Die größte Überraschung war jedoch, daß die Struktur des ternären Komplexes im Kristall der des EF-G · GDP sehr ähnlich ist (vgl. Abb. 2A und B). Die EF-G-Struktur zeigt fünf Domänen (Abb. 2B), die Domänen drei bis fünf simulieren die Struktur des tRNA-Anteils innerhalb des ternären Komplexes, d.h. die Proteindomänen von EF-G imitieren die tRNA-Komponente des Aminoacyl-tRNA · EF-Tu · GTP-Komplexes (molekulares Mimikry). Das in Abbildung 1 gezeigte Ribosomenmodell legt folgende Interpretation nahe^[18]: Nachdem EF-G · GTP den Post-Zustand des Ribosoms etabliert hat, kann die „tRNA-Mimik“ von EF-G an das Decodierungszentrum binden und so ein Zurückfallen des Ribosoms in den Prä-

Zustand verhindern, solange die Energiebarriere zwischen den ribosomalen Zuständen durch EF-G niedrig gehalten wird. Sobald nach der GTPase-Aktion EF-G · GDP vom Ribosom dissoziiert, erhöht sich die Energiebarriere wieder und hält das Ribosom im Post-Zustand bis zur erfolgreichen Decodierung des nächsten ternären Komplexes.

Nachdem EF-Tu den Prä-Zustand des Ribosoms etabliert hat, wird vermutlich ähnlich wie bei EF-G das GTPase-Zentrum vom Ribosom aktiviert, EF-Tu · GDP nimmt seine AUS-Konformation ein und dissoziiert vom Ribosom. Die Struktur der AUS-Konformation ist die von EF-Tu · GTP (Abb. 2C und 2D). Die Domänen 2 und 3 entfernen sich von der Domäne 1, und Domäne 2 entfernt sich von Domäne 1 um erstaunliche 40 Å.

In krassem Gegensatz zu EF-G bindet EF-Tu GDP mit hoher ($6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) und GTP mit einer zwar zehnmal kleineren, aber immer noch hohen Affinität^[19], so daß die Konzentrationen von GDP und GTP in der Zelle die Bindung der Guanosinnucleotide an EF-Tu nicht beeinflussen. Deshalb existiert ein spezieller Faktor (EF-Ts), der EF-Tu · GTP aus EF-Tu · GDP regeneriert. Dieser Faktor bindet an EF-Tu · GDP und bewirkt den Austausch von GDP gegen GTP.

Die Kristallstrukturanalyse des EF-Tu · EF-Ts-Komplexes ergab^[5], daß der Komplex nicht wie erwartet als Heterodimer, sondern als Tetramer vorliegt. Im Tetramer weisen die beiden EF-Ts-Moleküle Kontaktflächen auf, während die beiden EF-Tu-Mole-

küle sich kaum berühren, so daß die Struktur des Tetramers als EF-Tu · (EF-Ts)₂ · EF-Tu beschrieben werden kann. Das Motiv Threonin-Asparaginsäure-Phenylalanin-Valin (82), das in allen bekannten EF-Ts-Strukturen konserviert ist, spielt bei der Verdrängung des GDPs die entscheidende Rolle: Die Aminosäuren Asp80 und Phe81 drängen an die GDP-Bindungsstelle und verdrängen drei Aminosäuren von EF-Tu, die zwei Wassermoleküle stabilisieren. Beide Wassermoleküle sind an ein Mg^{2+} -Ion koordiniert, das essentiell für die Affinität von EF-Tu zu GDP ist. Die „Sprengung“ dieser Mg^{2+} -Bindungsstelle führt zur Entlassung von GDP, das durch GTP ersetzt werden kann. Diese Reaktionen sind reversibel, für die Proteinbiosynthese muß jedoch GDP durch GTP ersetzt werden und nicht umgekehrt. Die Richtung des GTPase-Cyclus (Abb. 1) wird durch den nahezu irreversiblen Schritt der ternären Komplexbildung bestimmt, der EF-Tu · GTP den Gleichgewichten entzieht^[20].

Die Kristallstrukturanalysen ermöglichen überraschende Einblicke in die Funktionsweisen von Elongationsfaktoren und G-Proteinen sowie in ribosomale Mechanismen wie die Decodierung und sind ein aufregendes Beispiel für molekulare Mimikry. Nur das Ribosom selbst, der wohl komplizierteste Komplex innerhalb der Zelle, ist noch weitgehend unerforscht. Wichtige ribosomale Schritte der GTPase-Cyclen sind mechanistisch ungeklärt, z.B. wie das Ribosom die GTPase-Zentren der Elongationsfaktoren aktiviert und wie die Elongationsfaktoren die ribosomalen Aktivierungsbarrieren erniedrigen.

Stichworte: Elongationsfaktoren • G-Proteine • Proteinbiosynthese • Proteinstrukturen • Ribosomen

- [1] M. Kjeldgaard, J. Nyborg, *J. Mol. Biol.* **1992**, 223, 721–742.
- [2] H. Berchtold, L. Reshetnikova, C. O. A. Reiser, N. K. Schirmer, M. Sprinzl, R. Hilgenfeld, *Nature* **1993**, 365, 126–132.
- [3] M. Kjeldgaard, P. Nissen, S. Thirup, J. Nyborg, *Structure* **1993**, 1, 35–50.
- [4] P. Nissen, M. Kjeldgaard, S. Thirup, G. Polekhina, L. Reshetnikova, B. F. C. Clark, J. Nyborg, *Science* **1995**, 270, 1464–1472.
- [5] T. Kawashima, C. Berthet-Colominas, M. Wulff, S. Cusack, R. Leberman, *Nature* **1996**, 379, 511–518.
- [6] J. Czworkowski, T. J. Wang, T. A. Steitz, P. B. Moore, *EMBO J.* **1994**, 13, 3661–3668.
- [7] A. Åvarsson, E. Breznikov, M. Garber, J. Zheltonosova, Yu. Chirgadze, S. Al-Karadaghi, L. A. Svensson, A. Liljas, *EMBO J.* **1994**, 13, 3669–3677.
- [8] S. Schilling-Bartetzko, A. Bartetzko, K. H. Nierhaus, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 4703–4712.
- [9] K. Bergemann, K. H. Nierhaus, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 15105–15113.
- [10] F. J. Triana-Alonso, K. Chakraborty, K. H. Nierhaus, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 20473–20478.
- [11] H. R. Bourne, D. A. Sanders, F. McCormick, *Nature* **1991**, 349, 117–127.
- [12] M. S. Rohrbach, J. W. Bodley, *Biochemistry* **1976**, 15, 4565–4569.
- [13] O. G. Baca, M. S. Rohrbach, J. W. Bodley, *Biochemistry* **1976**, 15, 4570–4574.
- [14] J. Neuhaus, P. Nygaard in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology* (Hrsg.: F. Neidhart, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, H. E. Umbarger), American Society of Microbiology, Washington, **1987**, S. 445–473.
- [15] C. G. Kurland, *Trends Biochem. Sci.* **1987**, 12, 126–128.
- [16] A. P. Potapov, F. J. Triana-Alonso, K. H. Nierhaus, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 17680–17684.
- [17] H. Echols, M. F. Goodman, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, 60, 477–511.
- [18] K. H. Nierhaus, *Nature* **1996**, 379, 491–492.
- [19] A. Wagner, I. Simon, M. Sprinzl, R. S. Goody, *Biochemistry* **1995**, 34, 12535–12542.
- [20] G. Romero, V. Chau, R. L. Biltonen, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 6167–6174.
- [21] K. Abel, F. Jurnak, *Structure* **1996**, 4, 229–238.

Die Stellung von Literaturverweisen

Mancher Autor hat schon sich oder uns gefragt, warum wir in der deutschen Ausgabe der *Angewandten Chemie* Hinweise auf Literaturzitate **vor** und in der englischen Ausgabe **hinter** Satzzeichen platzieren. Eine deshalb eingeleitete „Nachforschung“ hat nun ergeben, daß auch in deutschsprachigen Empfehlungen zur Gestaltung wissenschaftlicher Texte der Platzierung hinter dem Satzzeichen der Vorzug gegeben wird.^[1] Aus diesem Grund und um uns und den Autoren das Leben zu erleichtern, werden wir daher **ab Januar 1997** auch in der deutschen Ausgabe die Literaturverweise **hinter** die Satzzeichen stellen. Unsere Autoren bitten wir, ab sofort bei eingereichten Manuskripten diese neue Gestaltung bereits zu berücksichtigen.

Vielen Dank

Die Redaktion

[1] *Rechtschreibung der deutschen Sprache und der Fremdwörter* (Duden Band 1), 19. Aufl., Bibliographisches Institut, Mannheim, **1986**, S. 73; H. F. Ebel, C. Bliefert, *Schreiben und Publizieren in den Naturwissenschaften*, 3. Aufl., VCH, Weinheim, **1994**, S. 227, 369.