

Synthese der Peptidbindung am Ribosom: keine freie benachbarte Hydroxygruppe an der terminalen Ribose der Peptidyl-tRNA erforderlich**

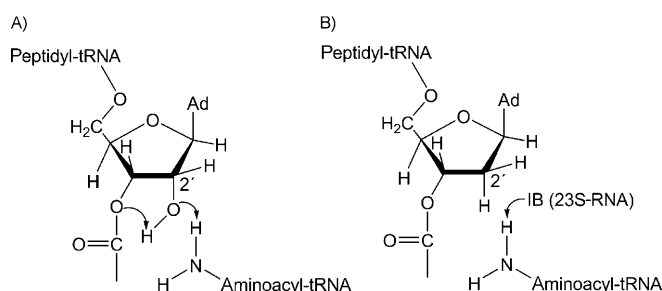
Miriam Koch, Yiwei Huang und Mathias Sprinzl*

Die Synthese einer Peptidbindung ist von zentraler Bedeutung in der Biologie. Zwar wurden im letzten Jahrzehnt große Fortschritte bei der Aufklärung der Ribosomenstruktur erzielt,^[1] der katalytische Mechanismus dieser Reaktion, die im Peptidyltransferasezentrum des Ribosoms abläuft, bleibt jedoch weiterhin unklar.^[2] Derzeit wird Peptidtransfer als eine Entropie-getriebene Reaktion^[3] im proteinfreien aktiven Zentrum erklärt, das durch die 23S-RNA und die gebundenen 3'-Enden der Peptidyl- und Aminoacyl-tRNAs gebildet wird.^[4] Die Peptidbindung entsteht ausgehend von einem nucleophilen Angriff der α -Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA an der Carbonylgruppe der Peptidyl-tRNA unter Bildung eines tetragonalen Übergangszustandes. In diesem Prozess wird ein Proton von der α -Aminogruppe auf die 3'-OH-Gruppe der Peptidyl-tRNA übertragen. Freie benachbarte OH-Gruppen am 3'-Ende der Aminoacyl- und Peptidyl-tRNA sind mögliche Protonendonoren,^[5] dies gab Anlass, die 2',3'-Positionisomere der Aminoacyl- und Peptidyl-tRNAs unter Berücksichtigung der Bindung des Acylrestes am 2'- oder 3'-OH-Rest sowie die Anforderungen an die freien benachbarten OH-Gruppen während der Translation umfassend zu untersuchen.^[6–8]

Für einen erfolgreichen Peptidtransfer durch die Peptidyltransferase müssen sowohl der Aminoacylrest in der A-Stelle als auch der Peptidylrest in der P-Stelle an die 3'-OH-Gruppe des terminalen Adenosinrestes der jeweiligen tRNA gebunden werden. Das Fehlen der benachbarten 2'-OH-Gruppe der Aminoacyl-tRNA beeinflusst den Peptidtransfer nicht; die Rolle der 2'-OH-Gruppe der Peptidyl-tRNA ist hingegen unklar. Die Aktivität der Peptidyltransferase wurde auf zwei Arten bestimmt: 1) durch In-vitro-Versuche unter Verwendung von tRNA-Fragmenten oder Puromycin als Modellen für Aminoacyl- und Peptidyl-tRNAs sowie 2) durch Versuche, in denen kurze Oligonucleotide als mRNA-Ersatz fungierten (auch hier kein vollständiges tRNA-System). Das Fehlen der 2'-OH-Gruppe der Peptidyl-tRNA-Analoga in der P-Stelle bewirkte eine Inhibierung der

Transferase.^[5,9,10] In Versuchen mit kompletter 2'dA-Peptidyl-tRNA und langer mRNA verringerte das Fehlen der 2'-OH-Gruppe die Aktivität der Peptidyltransferase nicht.^[11]

Um diese Abweichung aufzuklären, testeten wir die Aktivität der Suppressor-tRNA^{Ser(CUA)}-2'dA in vitro, indem wir eine komplette mRNA der Esterase 2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* mit einem Nonsens-UAG-Codon-155 und RF2-abhängigen Terminationscodons translatierten. Codon-155 codiert in der nichtmutierten mRNA für ein Serin, das ein essenzieller Bestandteil der katalytischen Triade ist.^[12] Folglich kann nur eine Suppression des UAG-Codons-155 durch Ser-tRNA^{Ser(CUA)} zur Synthese von aktiver Esterase führen. In Abwesenheit von Ser-tRNA^{Ser(CUA)} treten vorzeitige Termination, Leserasterverschiebung oder Suppression mit endogener Aminoacyl-tRNA auf.^[13] Vorzeitige Termination kann fast vollständig durch Entfernen des Terminationsfaktors 1 (RF1) aus dem In-vitro-Translationsansatz unterdrückt werden.^[13] Dieser Versuch, bereits beschrieben für tRNA^{Ser(CUA)}-A, stellt ein Mittel zum Test der Aktivität von tRNA^{Ser(CUA)}-2'dA im Elongationszyklus bereit. Wenn die Annahme einer „Substrat-unterstützten Katalyse“^[10] unter Beteiligung der 2'-OH-Gruppe während des Peptidtransfers (Schema 1 A) richtig ist, sollte der Austausch von tRNA^{Ser(CUA)}-A gegen tRNA^{Ser(CUA)}-2'dA die In-vitro-Synthese von Esterase 2 unterdrücken.



Schema 1. A) Vorgeschlagener Mechanismus für die Beteiligung der 2'-OH-Gruppe am 3'-terminalen Adenosinrest (Ad = Adeninrest) der Peptidyl-tRNA am Peptidyl-Transfer.^[10] B) Die Aktivität der Peptidyl-tRNA-2'dA in der Peptidyltransferasereaktion deutet auf einen alternativen Mechanismus hin.

tRNA^{Ser(CUA)}-2'dA wurde durch den ATP(CTP)tRNA-Nucleotidyl-Transferase(NTase)-katalysierten Austausch von 3'-terminalem Adenosin gegen 2'-Desoxyadenosin in Gegenwart von Pyrophosphat hergestellt.^[14] Um die vollständige Besetzung des 3'-Terminus durch 2'-Desoxyadenosin sicher-

[*] M. Koch, Dr. Y. Huang, Prof. Dr. M. Sprinzl
Laboratorium für Biochemie
Universität Bayreuth
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth (Deutschland)
Fax: (+49) 921-55-2432
E-Mail: mathias.sprinzl@uni-bayreuth.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (Sp 243/12–2).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801511> zu finden.

zustellen, wurde das Produkt der Austauschreaktion mit einem Überschuss an Periodat behandelt, um auf Ribose endende tRNA durch Oxidation zu zerstören. tRNA-2'dA ist resistent gegen Periodat-Oxidation.^[15] Die resultierende tRNA^{Ser(CUA)}-2'dA wurde mithilfe von Elektrophorese auf einem Borat enthaltenden Polyacrylamidgel analysiert. Es traten keine sichtbaren Spuren an tRNA^{Ser(CUA)}-A im Reaktionsprodukt nach Periodatbehandlung auf (siehe Hintergrundinformationen). Die Aminoacylierbarkeit von Periodat-behandelter tRNA^{Ser(CUA)}-A war mehr als 100-mal geringer als jene von tRNA^{Ser(CUA)}-2'dA, die unter identischen Bedingungen mit Periodat behandelt worden war. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass tRNA^{Ser(CUA)}-2'A während der In-vitro-Translation in Gegenwart von löslichen *E.-coli*-Enzymen in tRNA^{Ser(CUA)}-2'dA umgewandelt wird, haben wir Kontrollexperimente durchgeführt, in denen tRNA^{Ser(CUA)}-2'dA mit dem Translationsmix (S30-Extrakt) oder mit gereinigter *E.-coli*-NTase behandelt wurde. Wir konnten keine Bildung von tRNA^{Ser(CUA)}-2'A aus tRNA^{Ser(CUA)}-2'dA feststellen, weder bei Elektrophorese auf Borat-Gelen noch bei Aminoacylierungsversuchen.

Seryl-tRNA-Synthetase aminoacyliert tRNA^{Ser} an der 3'-OH-Gruppe.^[15] Dementsprechend konnte die im Versuch verwendete tRNA^{Ser(CUA)}-2'dA im Translationsmix aminoacyliert werden. Die vollständige In-vitro-Polypeptidsynthese wurde durch die Messung von in Polypeptide eingebautem [¹⁴C]Leucin sichtbar gemacht. Diese Messung erfolgte entweder durch Szintillationszählung der in heißer 10-proz. Trichloressigsäure präzipitierten Proteine oder, alternativ, durch Autoradiographie nach SDS-PAGE. Parallel dazu wurde die Esterase-2-Aktivität in jeder Probe durch Aktivitätsfärbung nach elektrophoretischer Auftrennung auf SDS-Polyacrylamidgelen^[16] oder durch spektroskopische Beobachtung der *p*-Nitrophenylacetat-Hydrolyse bestimmt.^[17] Die Synthese von Proteinen in Gegenwart von verschiedenen Mengen an tRNA^{Ser(CUA)}-A ist in Abbildung 1 gezeigt. Nach der Aktivitätsfärbung wurden die Gele zusätzlich mit Coomassie-Blau gefärbt, um alle Proteine inklusive endogener *E.-coli*-Proteine sichtbar zu machen. Die Menge an aktiver Esterase (violette Banden) hängt von der Konzentration an zugegebener Suppressor-tRNA ab. In Bahn 1 ist keine aktive Esterase sichtbar (Abbildung 1 A), obwohl [¹⁴C]Leucin in das Protein mit der Molekülmasse der Esterase 2 eingebaut wurde (Abbildung 1 B). Offensichtlich kann die Suppression durch endogene tRNA aus dem *E.-coli*-S30-Extrakt erfolgen, aber in diesem Fall fehlt der essenzielle Ser155-Rest, weshalb das Polypeptid keine Esterase-2-Aktivität aufweist.^[13] Die Zugabe von Antikörpern gegen RF1 blockiert die Termination an UAG-Codons und steigert die Wahrscheinlichkeit einer Suppression durch natürliche Suppressor-tRNAs wie Tyr-tRNA^{Tyr} (Codon UAY). Dies ist die wahrscheinlichste Erklärung für die Synthese dieses inaktiven Vollängenproteins. Ser-tRNA^{Ser(CUA)} konkurriert mit natürlicher Suppressor-tRNA für UAG-Codons. Deshalb führt die Konzentrationserhöhung der Suppressor-tRNA^{Ser(CUA)}-A (Abbildung 1, Bahnen 2–5) zu steigenden Mengen an aktiver Esterase 2 und sinkenden Mengen an inaktivem Polypeptid. Allerdings führt eine sehr hohe tRNA^{Ser(CUA)}-A-Konzentration wieder zu inaktivem Protein.^[13]

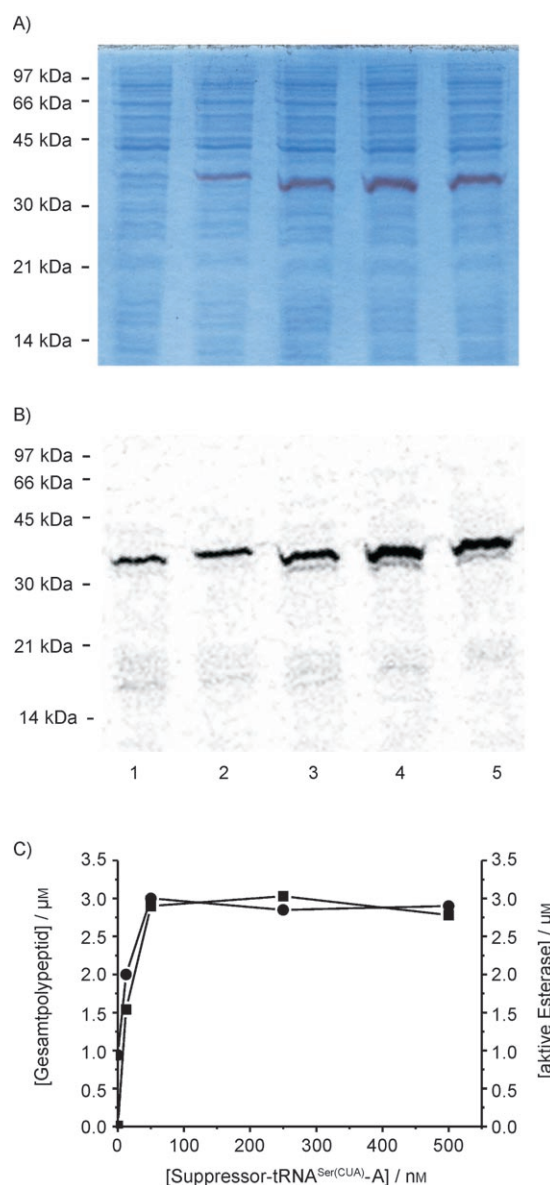


Abbildung 1. Suppression des Amber-Stopcodons durch die tRNA^{Ser(CUA)}-A im In-vitro-Translationssystem, ausgehend vom Plasmid pIVEX-Est2-S155X. Der Translations-Assay wurde in Gegenwart von 0,6 µg RF1-Antikörpern und einer ansteigenden Menge an Suppressor-tRNA^{Ser(CUA)}-A (Bahn 1: 0 nM, Bahn 2: 12,5 nM, Bahn 3: 50 nM, Bahn 4: 250 nM, Bahn 5: 500 nM) durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung des in vitro synthetisierten Proteins enthielt der Translations-Assay 0,5 mM [¹⁴C]Leucin. Dem Reaktionsgemisch nach 30 min entnommene Aliquots wurden durch SDS-PAGE analysiert. Elektropherogramme, die durch Esterase-Aktivitätsfärbung (violette Banden),^[21] gefolgt von einer Coomassie-Blau-Färbung (blaue Banden), erhalten wurden, sind in (A) gezeigt, radioaktive Abbilder des [¹⁴C]Leucin-markierten Gesamtpolypeptides in (B). Die Ausbeuten der In-vitro-Proteinsynthese in Gegenwart von tRNA^{Ser(CUA)}-A (C) wurden bestimmt durch Messung des Einbaus von [¹⁴C]Leucin in heißem, in 10-proz. Trichloressigsäure präzipitierbaren Polypeptid (●) und Messung der Gesamtaktivität der aktiven Esterase in den Proben (■). Weitere experimentelle Details sind in den Hintergrundinformationen enthalten.

Wenn in analogen Experimenten tRNA^{Ser(CUA)}-2'dA anstatt tRNA^{Ser(CUA)}-A eingesetzt wird, findet eine Suppression

des UAG-155-Codons statt, und aktive Esterase wird synthetisiert (Abbildung 2, Bahnen 2–5). Die Menge an in vitro synthetisierter Esterase 2 hängt von der Konzentration an $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-2'dA}$ ab. Ein Vergleich der Ergebnisse aus den

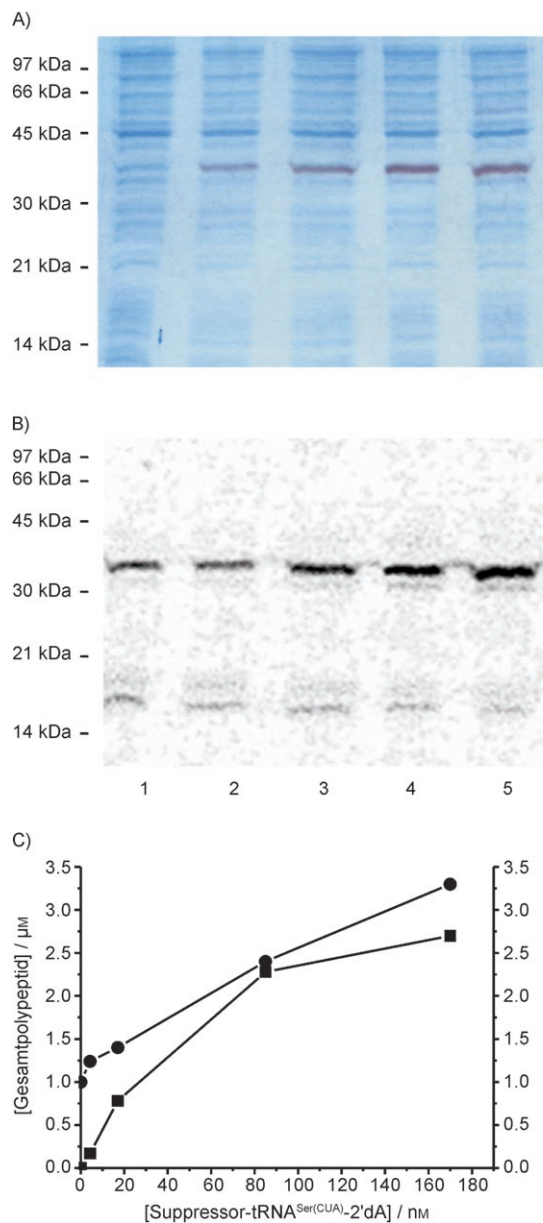


Abbildung 2. Suppression des Amber-Stopcodons durch die $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-2'dA}$ im In-vitro-Translationssystem (Bahn 1: 0 nM, Bahn 2: 4.25 nM, Bahn 3: 17 nM, Bahn 4: 85 nM, Bahn 5: 170 nM). Alle weiteren Angaben sind analog zu denen in der Legende von Abbildung 1.

Abbildungen 1 und 2 ergibt, dass $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-2'dA}$, genauso wie $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-A}$, an allen Reaktionen des Elongationszyklus beteiligt ist. Bahn 1 (Abbildungen 1 und 2) zeigt in beiden Fällen identische Befunde für die Synthese in Abwesenheit der Suppressor- $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}$ an: Es wurde ausschließlich inaktives Polypeptid der Länge der Esterase 2 gebildet (siehe oben). Die Zugabe von $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-2'dA}$ führt hingegen zur Synthese der aktiven Esterase 2 (mit Serin

an Position 155). Gleichzeitig sinkt die Menge an inaktivem Polypeptid (mit einer anderen Aminosäure als Serin an Position 155).^[13] In Abbildung 2 C sind quantitative Daten der Experimente aus Abbildung 2 B dargestellt. Analog dem Fall von $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-A}$ (Abbildung 1 C) verändert sich das Verhältnis von Gesamtprotein und aktiver Esterase 2 mit der Konzentration an $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-2'dA}$.^[13] Unter den gegebenen Bedingungen wurde die effizienteste Suppression von UAG-155 bei 85 nM $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-2'dA}$ erreicht (Abbildung 2 C), verglichen mit 50 nM im Fall von $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-A}$ (Abbildung 1 C).

Die Kinetiken der Polypeptidsynthese, bezogen auf das Gesamtprotein oder die aktive Esterase 2, sind annähernd gleich, unabhängig davon, ob $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-A}$ oder $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-2'dA}$ verwendet werden (Abbildung 3). Die maximale Ausbeute an Esterase 2 wurde in beiden Experimenten nach ungefähr 30 min erreicht.

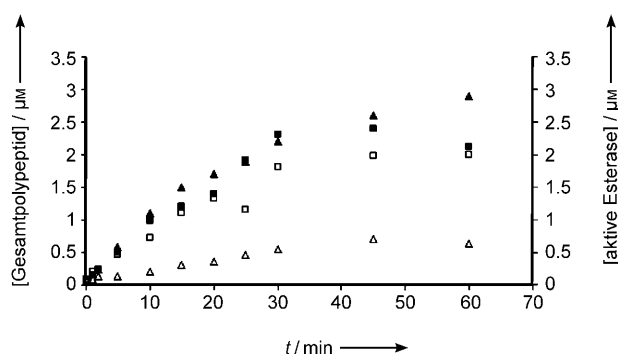


Abbildung 3. Kinetiken der In-vitro-Synthesen von Gesamtpolypeptid (Quadrate) und der aktiven Esterase (Dreiecke) in Gegenwart von 12.5 nM $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-A}$ (ausgefüllte Symbole) oder 17 nM $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-2'dA}$ (offene Symbole), bestimmt durch den Einbau von [^{14}C]Leucin bzw. die Aktivität der Esterase 2. Die Aktivität der Esterase 2 wurde in Proben, die zu den angegebenen Zeitintervallen entnommen wurden, photometrisch ermittelt.^[22] Die spezifische Aktivität der gebildeten Esterase 2 betrug $152 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Eingebautes [^{14}C]Leucin wurde in separat entnommenen Aliquots durch Proteinpräzipitation in heißer Trichloressigsäure und Szintillationszählung ermittelt. Weitere experimentelle Details sind in den Hintergrundinformationen enthalten.

Die vorgestellten Untersuchungen liefern den Beleg, dass $\text{tRNA}^{\text{Ser(CUA)}}\text{-2'dA}$ mit fehlender 2'-OH-Gruppe am 3'-terminalen Adenosinrest in allen Schritten des Elongationszyklus verwendet werden kann. In einem früheren Bericht^[18] war polyA als mRNA für die Synthese von Polylysin in Gegenwart verschiedener tRNA^{Lys} -Analoga eingesetzt worden. Unter Verwendung von $\text{tRNA}^{\text{Lys}}\text{-2'dA}$ konnte keine Bildung von Polylysin detektiert werden, allerdings waren $\text{Lys-tRNA}^{\text{Lys}}\text{-2'dA}$ und $N\text{-Ac-tRNA}^{\text{Lys}}\text{-2'dA}$ in Teilreaktionen bei der Bildung von $\text{Ac-Lys-Lys-Dipeptiden}$ an Ribosomen, die mit polyA besetzt waren, sowohl als Donoren wie auch als Akzeptoren aktiv.^[11] In einer neueren Studie verwendeten Weinger et al.^[10] eine ribosomale Fragmentreaktion,^[19] in der die Freisetzung von fMet-Lys von in der P-Stelle gebundenem fMet-Lys- $\text{tRNA}^{\text{Lys}}\text{-2'dA}$ durch Puromycin bestimmt wurde. Die Autoren wiesen nach, dass die Bildung von fMet-Lys-Puromycin mindestens 10^6 -mal schneller ist, wenn sich in der

P-Stelle fMet-Lys-tRNA^{Lys}-A statt fMet-Lys-tRNA^{Lys}-2'dA befindet. Diese Befunde stimmten mit denen früherer, ähnlicher Experimenten überein, die mit einem an der P-Stelle gebundenen Peptidyl-tRNA-Fragment und einer an der A-Stelle gebundenen Aminoacyl-tRNA durchgeführt worden waren.^[5] Dies resultierte in einer Hypothese, die den Mechanismus des Peptidtransfers in der ribosomalen Peptidyltransferase durch eine „Substrat-unterstützte Katalyse“ erklärte, in der die 2'-OH-Gruppe des in der P-Stelle platzierten Adenosinrestes als ein Protonenshuttle fungiert, das ein Proton der ankommenden α -Aminogruppe aufnimmt und auf die abgehende desacylierte tRNA überträgt (Schema 1 A). Dieser Mechanismus wird jedoch nicht von den Befunden der vorliegenden Arbeit gestützt (Abbildungen 2 und 3). Wie hier demonstriert wurde, inaktiviert das Fehlen der 2'-Hydroxygruppe am Adenosin-76-Rest der Peptidyltransferase nicht die Polypeptidtransferase, und der Peptidtransfer findet immer noch mit guter Geschwindigkeit statt.

Das Fehlen der 2'-OH-Gruppe am Peptidylsubstrat ergab einen starken inhibitorischen Effekt (10^6 -fach), wenn die Peptidyltransferase-Reaktionen mit tRNA-Fragmenten oder Puromycin durchgeführt wurden. Wie hier nun demonstriert werden konnte, hat dieselbe Modifikation am terminalen Adenosinrest eine geringe Auswirkung, wenn die CCA-Enden von Donor- und Akzeptor-tRNAs Teil einer kompletten tRNA-Struktur sind und die Ribosomen eine vollständige mRNA translatieren. Dieser Befund weist auf die Wichtigkeit der präzisen Lokalisation der CCA-Enden der reagierenden tRNAs für eine effiziente Peptidübertragung hin. Der gesamte tRNA-Körper, inklusive Anticodons und CCA-Enden, trägt kooperativ zur korrekten Platzierung der Reaktionspartner im Peptidyltransferasezentrum bei.^[20]

Die vorliegende Arbeit führt weiterhin zu dem Schluss, dass der Protonenübergang von der eintretenden α -Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA zur 3'-OH-Gruppe der Peptidyl-tRNA während der Bildung der Peptidbindung ohne Einbeziehung der 2'-OH-Gruppe der Peptidyl-tRNA stattfindet; vielmehr wird möglicherweise ein Nucleophil durch die 23S-RNA in unmittelbarer Nähe der reagierenden tRNA-Partner bereitgestellt (Schema 1 B). Die Identifizierung dieser Stelle der ribosomalen RNA steht noch aus.

Eingegangen am 31. März 2008

Online veröffentlicht am 8. August 2008

Stichwörter: Peptide · Reaktionsmechanismen · Ribozyme · Transferasen · tRNA

- [1] M. Selmer, C. M. Dunham, F. V. Murphy, A. Weixlbaumer, S. Petry, A. C. Kelley, J. R. Weir, V. Ramakrishnan, *Science* **2006**, *313*, 1935–1942.
- [2] M. Beringer, M. V. Rodnina, *Mol. Cell* **2007**, *26*, 311–321.
- [3] A. Sievers, M. Beringer, M. V. Rodnina, R. Wolfenden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7897–7901.
- [4] T. M. Schmeing, K. S. Huang, S. A. Strobel, T. A. Steitz, *Nature* **2005**, *438*, 520–524.
- [5] K. Quiggle, G. Kumar, T. W. Ott, E. K. Ryu, S. Chladek, *Biochemistry* **1981**, *20*, 3480–3485.
- [6] T. H. Fraser, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 2671–2675.
- [7] S. M. Hecht, *Acc. Chem. Res.* **1977**, *10*, 239–245.
- [8] S. Chládek, M. Sprinzl, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 1–31; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 371–391.
- [9] S. Dorner, C. Panuschka, W. Schmid, A. Barta, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6536–6542.
- [10] J. S. Weinger, K. M. Parnell, S. Dorner, R. Green, S. A. Strobel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1101–1106.
- [11] T. Wagner, F. Cramer, M. Sprinzl, *Biochemistry* **1982**, *21*, 1521–1529.
- [12] G. De Simone, S. Galdiero, G. Manco, D. Lang, M. Rossi, C. Pedone, *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 761–771.
- [13] D. E. Agafonov, Y. Huang, M. Grote, M. Sprinzl, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 2156–2160.
- [14] B. E. Nordin, P. Schimmel, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 20510–20517.
- [15] M. Sprinzl, F. Cramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 3049–3053.
- [16] D. E. Agafonov, K. S. Rabe, M. Grote, Y. Huang, M. Sprinzl, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 2082–2086.
- [17] G. Manco, L. Mandrich, M. Rossi, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37482–37490.
- [18] T. Wagner, M. Sprinzl, *Biochemistry* **1983**, *22*, 94–98.
- [19] B. E. Maden, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 619–624.
- [20] L. Cochella, R. Green, *Science* **2005**, *308*, 1178–1180.
- [21] T. B. Higier, J. Spizizen, *J. Bacteriol.* **1973**, *114*, 1184–1192.
- [22] G. Manco, E. Giosue, S. D'Auria, P. Herman, G. Carrea, M. Rossi, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *373*, 182–192.