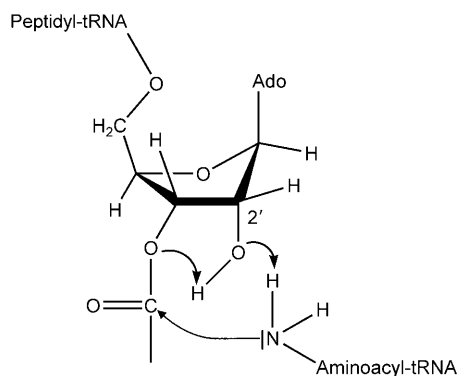


# Bildung der Peptidbindung im Ribosom: die Rolle der 2'-OH-Gruppe des terminalen Adenosins der Peptidyl-tRNA und der Länge der entstehenden Peptidkette

Yiwei Huang und Mathias Sprinzl\*

Das Ribosom ist für die präzise Translation der genetischen Information in Proteine verantwortlich, die für alle Lebewesen essenziell sind. Das Peptidyltransferasezentrum (PTC) in der großen ribosomalen Untereinheit katalysiert die Bildung der Peptidbindung. Die Reaktion der  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle mit der Carbonylgruppe der Peptidyl-tRNA in der P-Stelle resultiert in einem Transfer des entstehenden Peptids von der Peptidyl-tRNA auf die Aminoacyl-tRNA und der Verlängerung des Peptids um eine Aminosäure. Strukturelle und biochemische Untersuchungen des Ribosoms führten zum Versuch, den katalytischen Mechanismus der Bildung der Peptidbindung vorherzusagen.<sup>[1–4]</sup> Eine der jüngsten Hypothesen ist die von Weinger et al. vorgeschlagene Substrat-assistierte Katalyse, in der die 2'-OH-Gruppe des 3'-terminalen Adenosins der Peptidyl-tRNA an einem Proton-Shuttle während der Bildung der Peptidbindung beteiligt ist (Abbildung 1). Eine fast  $10^6$ -mal langsamere Bildung der Peptidbindung mit an der A-Stelle gebundenem Puromycin wurde festgestellt, wenn die 2'-OH-Gruppe in der P-Stelle gebundener Peptidyl-tRNA entfernt oder durch Fluor ersetzt wird.<sup>[5]</sup> Die Struktur des 70S-Ribosoms aus *Thermus thermophilus* mit dem gesamten PTC einschließlich einer an der A-Stelle gebundenen Aminoacyl-tRNA zeigte, dass sich die 2'-OH-Gruppe von A76 der



**Abbildung 1.** Vorgeschlagener Mechanismus für die Beteiligung der 2'-OH-Gruppe des 3'-terminalen Adenosinrests (Ado = Adeninrest) der Peptidyl-tRNA am Peptidyltransfer.

[\*] Dr. Y. Huang, Prof. Dr. M. Sprinzl  
Laboratorium für Biochemie  
Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30  
95447 Bayreuth (Deutschland)  
Fax: (+49) 921-55-4396  
E-Mail: Mathias.Sprinzl@uni-bayreuth.de

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201005245> zu finden.

Peptidyl-tRNA im Abstand einer Wasserstoffbrücke von der  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA befindet, und stützt so diesen Mechanismus.<sup>[5]</sup> Kurze synthetische Oligonukleotide wurden normalerweise als mRNA in biochemischen In-vitro-Experimenten und in der Röntgenstrukturbestimmung genutzt.<sup>[3,5]</sup> Außerdem wurden in vielen Fällen tRNA-Fragmente oder Substratanaloga als Modelle für Aminoacyl- und Peptidyl-tRNA verwendet. Im Unterschied dazu stehen Untersuchungen, in denen die vollständige Peptidyl-tRNA-2'dA und Vollängen-mRNA bei In-vitro-Translationsexperimenten genutzt wurden und in denen keine signifikante Inhibition der Peptidbindungsbildung während der Translation eines internen Codons an Position 155 einer 310 Aminosäuren langen Polypeptidkette der Esterase 2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Est2) durch Entfernen der 2'-OH-Gruppe der Peptidyl-tRNA in der P-Stelle beobachtet wurde.<sup>[6]</sup> Der Hauptunterschied zwischen der Translation eines internen Codons einer Vollängen-mRNA und einem Modellexperiment mit einer kurzen, synthetischen mRNA liegt in der Besetzung des Peptidausgangskanals der 50S-Untereinheit. Es ist dokumentiert, dass die Länge der entstehenden Peptidkette die Zugänglichkeit des PTC für Antibiotika verändert und den Ausgang von Vernetzungs-Experimenten im PTC beeinflusst.<sup>[7]</sup>

Wir nehmen an, dass das Fehlen der 2'-OH-Gruppe von A76 der Peptidyl-tRNA die Konformation des Peptidondonors beeinflussen kann, wenn die entstehende Peptidkette noch kurz und nicht im Peptidausgangskanal verankert ist. Dies könnte die Unterschiede zwischen den Ergebnissen des Modellexperiments mit aufgereinigten Komponenten der Translationsmaschinerie und denjenigen mit dem kompletten Translationssystem erklären.<sup>[3,6]</sup>

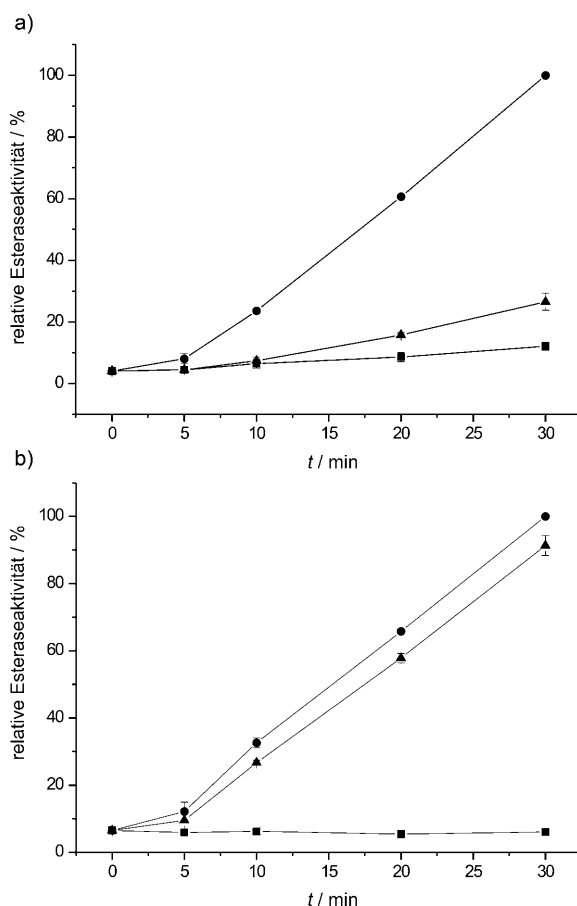
Um zu demonstrieren, dass der durch die Entfernung der 2'-OH-Gruppe von A76 der Peptidyl-tRNA verursachte Effekt von der Länge der Peptidkette abhängt, wurde ein RF1-abhängiges Nonsense-Codon UAG am 5'-Ende der Est2-mRNA in der für die N-terminalen Aminosäuren 2, 4, 6, 8, 10, 14, 26 und 155 codierenden Region eingeführt. Anschließend wurde die Suppression dieser Codons durch die Suppressor-tRNAs  $tRNA^{Ser(CUA)}\text{-2'dA}$  und  $tRNA^{Ser(CUA)}\text{-A}$  in der In-vitro-Translation der kompletten Est2-mRNA verglichen, indem die Esteraseaktivität gemessen wurde. Falls der Mechanismus der Substrat-assistierte Katalyse durch die 2'-OH-Gruppe der Peptidyl-tRNA korrekt ist, sollte der Ersatz der  $tRNA^{Ser(CUA)}\text{-A}$  durch  $tRNA^{Ser(CUA)}\text{-2'dA}$  einen ähnlichen Effekt an allen Positionen haben, und die In-vitro-Synthese von Est2 mit einem Nonsense-Codon sollte unabhängig von der Position des UAG-Codons in der mRNA unterbunden werden.

tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA wurde wie beschrieben vorbereitet<sup>[6,8]</sup> und zweimal mit einem Überschuss an Periodat behandelt, um alle verbleibenden tRNAs, die mit Ribose enden, zu oxidieren. tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA wurde durch Seryl-tRNA-Synthase aus *E. coli* bis zu 270 pmol/A<sub>260</sub> aminoacyliert.

Est2 wurde in einem gekoppelten In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem in Gegenwart von tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A oder tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA sowie mRNA mit UAG-Stoppcodons in unterschiedlichen Positionen hergestellt. Wenn die ribosomale A-Stelle einem Stoppcodon begegnet, findet vorzeitige Termination der Translation, eine Verschiebung des Leserahmens oder Suppression statt.<sup>[9,10]</sup> Um die Suppressionseffizienz in Gegenwart des Suppressors tRNA<sup>Ser(CUA)</sup> zu erhöhen, wurde der Peptidylfreisetzungsfaktor 1 (RF1) aus dem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem entfernt, indem ein Antikörper gegen RF1 hinzugegeben wurde. Dies resultierte in fast kompletter Suppression vorzeitiger Termination und in effizientem Einbau von Serin an UAG-codierten Positionen.<sup>[11]</sup> Dennoch kann in Abwesenheit des Suppressors tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>, neben Termination und Verschiebung des Leserahmens, Suppression mit endogener Aminoacyl-tRNA, wie Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup> (Codon UAY), auftreten.<sup>[12]</sup> Da der Ersatz von Aminosäuren in der N-terminalen Region von Est2 nicht nachteilig für die Esteraseaktivität ist, kann eine kleine Menge aktiven Enzyms auch in der Bedingung ohne Suppressor-tRNA detektiert werden (Abbildungen 2 und 3). Wenn Serin155, das in der katalytischen Triade von Est2 essenziell ist,<sup>[13]</sup> durch ein UAG-Codon ersetzt wurde, konnte in Abwesenheit von tRNA<sup>Ser(CUA)</sup> dennoch keine Esteraseaktivität nachgewiesen werden. Aktive Esterase kann nur durch die Suppression von UAG-155 durch Ser-tRNA<sup>Ser(CUA)</sup> synthetisiert werden.<sup>[6]</sup> Die kinetischen Messungen der In-vitro-Translation der Esterase mit einem Stoppcodon an Position 2 oder 155 der Aminosäuresequenz von Est2 zeigten, dass sich die Peptidsynthese auch nach 30-minütiger Inkubation immer noch in der linearen Phase befindet (Abbildung 2).

In Gegenwart von tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A trat die Suppression des Nonsense-Codons UAG effizient an allen getesteten Positionen auf, und aktive Esterase wurde in hohem Maße hergestellt. Verglichen mit Experimenten ohne Suppressor-tRNA wurde in Gegenwart von tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A eine 6- bis 26-fache Zunahme der Esteraseaktivität detektiert, wenn sich UAG-Codons an Positionen befanden, die für N-terminale Aminosäuren codieren. Dieser Effekt variierte mit der Position von UAG-Codons in der 5'-Region von Est2-mRNA. (Abbildung 3).

Wenn tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A in der In-vitro-Translation durch tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA ersetzt wurde, fand die Suppression des UAG-Codons ebenfalls statt. Dennoch war die Suppression des UAG-Stoppcodons in den ersten zehn Aminosäuren nach dem Startcodon AUG von Est2-mRNA durch tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA weniger effizient als die durch tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A. In diesen Positionen war die Esteraseaktivität mit tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA 50–80 % niedriger als mit tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A. In anderen Worten erleichtert die Gegenwart der 2'-OH-Gruppe von A76 der tRNA<sup>Ser(CUA)</sup> die Bildung der Peptidbindung und den Einbau der ersten zehn Aminosäuren von Est2 (Abbildung 3). Es gibt einen kleinen Unterschied in der Suppressionseffizienz zwischen tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A und tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA, wenn das

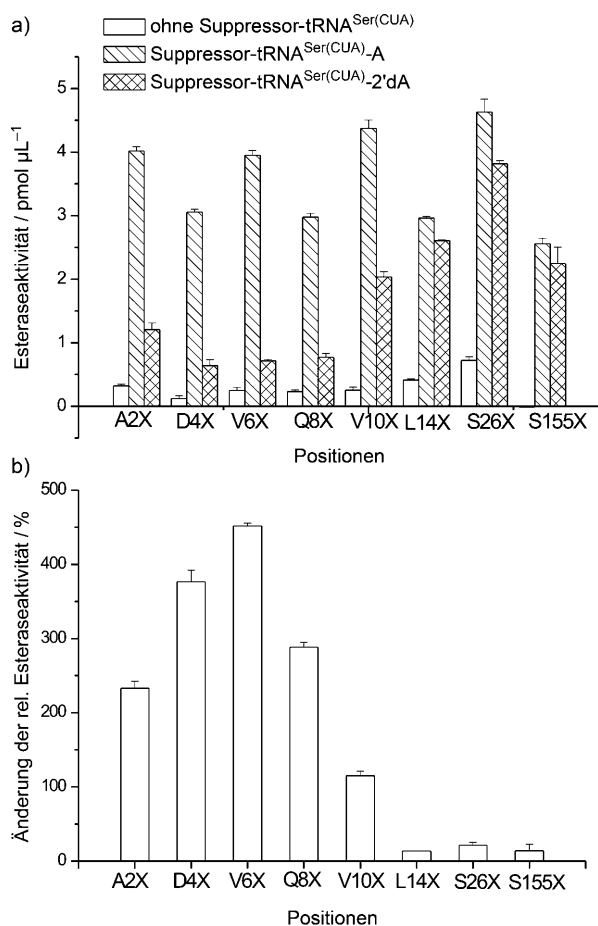


**Abbildung 2.** Kinetiken der In-vitro-Synthese aktiver Est2; Fehlerbalken resultieren aus Standardabweichungen ( $m = 3$ ). a) In-vitro-Synthese von Est2A2X. b) In-vitro-Synthese von Est2S155X. Die Aktivität der Est2, entnommen zu den angegebenen Zeitpunkten, wurde photometrisch gemessen.<sup>[9]</sup> ■ ohne tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>, ● mit tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A, ▲ mit tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA.

UAG-Stoppcodon für die Positionen 14, 26 oder 155 der Est2-Sequenz codiert. In solchen Fällen wurde eine nur etwa 10 % höhere Esteraseaktivität mit tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A detektiert, ein Befund, der mit unseren vorangehenden Untersuchungen übereinstimmt.<sup>[6]</sup>

Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen unsere früheren Erkenntnisse, dass die 2'-OH-Gruppe von A76 der Peptidyl-tRNA nicht essenziell für die Bildung der Peptidbindung ist, wenn komplette tRNA und Vollängen-mRNA verwendet werden. In den hier dargestellten Experimenten zeigen wir, dass nach der Anfangsphase der Translation, wenn die entstehende Polypeptidkette länger als zehn Aminosäuren ist, die Suppression des Nonsense-Codons UAG durch tRNA<sup>Ser(CUA)</sup> kaum von der Abwesenheit der 2'-OH-Gruppe an A76 beeinflusst wird. Wenn das UAG-Stoppcodon für die Positionen 2–10 der Est2-Sequenz codiert, wird die Peptidsynthese durch die 2'-OH-Gruppe von A76 der tRNA<sup>Ser(CUA)</sup> dennoch um das 1- bis 4.5-Fache erhöht.

Weinger et al. zeigten, dass die Bildung von fMet-Lys-Puromycin etwa 10<sup>6</sup>-mal schneller ist, wenn sich fMet-Lys-tRNA<sup>Lys</sup>-A anstelle von fMet-Lys-tRNA<sup>Lys</sup>-2'dA in der ribosomalen P-Stelle befindet. Der Mechanismus der Substrat-assistierten Katalyse, in dem die 2'-OH-Gruppe des N-ter-



**Abbildung 3.** Suppression der UAG-Stopp-codons an den Positionen 2, 4, 6, 8, 10, 14, 26 und 155 von Est2-mRNA durch tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A oder tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA; Fehlerbalken resultieren aus Standardabweichungen ( $m = 3$ ). Die Buchstaben stehen für die ursprünglich vorhandene Aminosäure in Est2, die von der tRNA<sup>Ser(CUA)</sup> durch Serin ersetzt wurde. a) Suppressionsaktivität durch Präsenz von tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A verglichen mit tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA mit Stoppcodons an verschiedenen Positionen; b) Verstärkung der Suppressionsaktivität in Gegenwart von tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A gegenüber tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA.

minimalen Adenosinrestes der in der P-Stelle befindlichen Peptidyl-tRNA an einem Proton-Shuttle teilnimmt, indem sie ein Proton von der hereinkommenden  $\alpha$ -Aminogruppe akzeptiert und dieses auf die ausgehende desacylierte tRNA überträgt, wurde aus diesem Experiment abgeleitet. Die Befunde der hier vorgestellten Arbeit stützen diesen Mechanismus nicht. Auch wenn sich das UAG-Stopp-codon am 5'-Ende der mRNA in der Nähe des Startcodons befindet, konnte mit tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-A nur eine 1- bis 4,5-fache Zunahme der Esteraseaktivität gegenüber der Aktivität bei Einsatz von tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA beobachtet werden (Abbildung 3). Der Unterschied in der Aktivität der Suppression durch tRNA<sup>Ser(CUA)</sup>-2'dA, 1) wenn UAG in einer Position nahe dem 5'-Ende der mRNA liegt und für N-terminale Aminosäuren codiert, und 2) wenn es in der Mitte der mRNA liegt, kann daran liegen, dass die kurze, weniger als zehn Aminosäuren lange entstehende Peptidkette noch nicht den Peptidausgangskanal erreichen kann. Frühere Experimente belegen, dass an den Eingang des Peptidausgangskanals gebundenes

Erythromycin nur die Synthese von sechs bis acht Aminosäuren langen Peptiden ermöglicht. Danach ist die Peptidelongation inhibiert, und die Peptidyl-tRNA dissoziiert unreif vom Ribosom, indem sie abfällt.<sup>[7]</sup>

Die Ribose von A76 der Peptidyl-tRNA könnte flexibler sein, wenn die entstehende, kurze Peptidkette noch nicht im Peptidausgangskanal lokalisiert ist.<sup>[14]</sup> In einem solchen Fall könnte die Gegenwart einer 2'-OH-Gruppe des A76 der Peptidyl-tRNA einen größeren unterstützenden Effekt auf die Peptidbindung haben, als dies der Fall ist, wenn die Peptidyl-tRNA durch Wechselwirkungen mit dem Peptidausgangskanal zusätzlich im PTC verankert ist. Wenn das entstehende Peptid den Peptidausgangskanal erreicht, sind die Strukturen der Substrate im PTC ausreichend definiert. Dies lässt darauf schließen, dass das Ribosom die Bildung der Peptidbindung nicht durch die Einbeziehung funktioneller Gruppen in die chemische Katalyse erreicht, sondern dadurch, dass es einen Rahmen zur präzisen Positionierung der Peptidyl- und Aminoacyl-tRNA zur Verfügung stellt.<sup>[15]</sup>

Die strukturelle Forschung am Ribosomkomplex mit einer im Peptidausgangskanal befindlichen, entstehenden Peptidkette und langer mRNA kann uns mehr Hinweise auf den Mechanismus der Bildung der Peptidbindung geben.

Eingegangen am 22. August 2010,  
veränderte Fassung am 27. September 2010  
Online veröffentlicht am 29. März 2011

**Stichwörter:** mRNA · Peptide · Ribosomen · Translation · tRNA

- [1] N. Polacek, A. S. Mankin, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *40*, 285–311.
- [2] W. Wintermeyer, F. Peske, M. Beringer, K. B. Gromadski, A. Savelsbergh, M. V. Rodnina, *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 733–737.
- [3] J. S. Weinger, K. M. Parnell, S. Dorner, R. Green, S. A. Strobel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1101–1106.
- [4] N. S. Sato, N. Hirabayashi, I. Agmon, A. Yonath, T. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15386–15391.
- [5] R. M. Voorhees, A. Weixlbaumer, D. Loakes, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 528–533.
- [6] M. Koch, Y. Huang, M. Sprinzl, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7352–7355; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7242–7245.
- [7] T. Tenson, M. Lovmar, M. Ehrenberg, *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 1005–1014.
- [8] B. E. Nordin, P. Schimmel, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 20510–20517.
- [9] K. Fearon, V. McClendon, B. Bonetti, D. M. Bedwell, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 17802–17808.
- [10] A. J. Herr, J. F. Atkins, R. F. Gesteland, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 343–372.
- [11] D. E. Agafonov, Y. Huang, M. Grote, M. Sprinzl, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 2156–2160.
- [12] K. Fearon, V. McClendon, B. Bonetti, D. M. Bedwell, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 17802–17808.
- [13] G. De Simone, S. Galdiero, G. Manco, D. Lang, M. Rossi, C. Pedone, *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 761–771.
- [14] J. L. Hansen, T. M. Schmeing, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11670–11675.
- [15] A. Bashan, I. Agmon, R. Zarivach, F. Schlutzen, J. Harms, R. Berisio, H. Bartels, F. Franceschi, T. Auerbach, H. A. Hansen, E. Kossoy, M. Kessler, A. Yonath, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 91–102.