

passieren Fehler, die bei manchen Synthetasen durch eine Korrekturfunktion beseitigt werden.

Zum Beispiel heftet die Valyl-tRNA-Synthetase mit einer Häufigkeit von immerhin 1 % die Aminosäure Threonin an tRNA^{Val}. Dies ergäbe eine unerträglich hohe Fehlerrate, wenn sich das Enzym nicht, wie auch andere Synthetasen in vergleichbarer Situation, dagegen schützen könnte. Die Enzyme können über eine schwache Esterase-Aktivität die falsch übertragene Aminosäure entfernen und dann eine neue Beladungsreaktion beginnen. Die Korrektur kann die Ablösung der falschen Aminosäure von der tRNA betreffen, wie im genannten Beispiel, oder die Spaltung eines nicht korrekten Aminoacyl-AMP, wie es für die Isoleucyl-tRNA-Synthetase gezeigt werden konnte.

Translation: Ribosomen und Proteinsynthese

Wie gesagt, überbringen mRNAs die genetische Information von der DNA zum Proteinsynthese-Apparat, und die beladenen tRNAs tragen die Aminosäuren herbei. Im Folgenden geht es um die Verknüpfung der Aminosäuren zu einer geordneten Reihe. Einfach zusammengefasst erfolgt die Übersetzung (Translation) einer linearen Basensequenz in die Folge von Aminosäuren eines Peptids in zwei Schritten:

1. **spezifische Wechselwirkung von Codon** in der mRNA **und Anticodon** in der beladenen tRNA.
2. **Ausbildung der Peptid-Bindung** zwischen den Aminosäuren auf benachbart gelegenen tRNAs.

In Wirklichkeit ist dieser Prozess von geradezu verwirrender Komplexität. Das zeigt sich daran, dass mehr als 100 verschiedene Makromoleküle – Proteine und RNA – an der Proteinsynthese beteiligt sind. Deswegen ist es nicht erstaunlich, dass das Kapitel Proteinsynthese, trotz einer fast 40 Jahre währenden Forschungsgeschichte, noch viele Geheimnisse birgt. Aber die wesentlichen Ereignisse lassen sich gut beschreiben. Im Mittelpunkt jeder Beschreibung steht das Ribosom, wo sich mRNA und beladene tRNAs treffen.

Ribosomen: Eine kurze Beschreibung

Trotz vieler und wichtiger Unterschiede im Detail haben Ribosomen aller Organismen einige gemeinsame Eigenschaften:

- **Zusammensetzung aus zwei Untereinheiten:** eine „kleine“ Untereinheit, wo sich mRNA und tRNAs treffen, und eine „große“ Untereinheit, wo die Verknüpfung von Aminosäuren vermittelt wird.
- **Aufbau jeder Untereinheit** aus 1–3 RNA-Molekülen und aus vielen verschiedenen Protein-Bausteinen mit einem Gewichtsverhältnis von ungefähr 60% RNA und 40% Protein.

Unter guten Lebensbedingungen besitzt eine Bakterienzelle mehr als 20 000 Ribosomen, die insgesamt etwa ein Viertel ihrer Trockenmasse ausmachen.

Die Untersuchung von Ribosomen beginnt einfach und zwar mit der Zentrifugation eines Bakterienextraktes durch einen Sucrose-Gradienten (S. 30). Bei niedrigen Konzentrationen von Magnesium-Salzen (etwa 1 mM) lassen sich große und kleine Untereinheiten gut voneinander trennen. Sie sedimentieren im Schwerfeld der Ultrazentrifuge mit

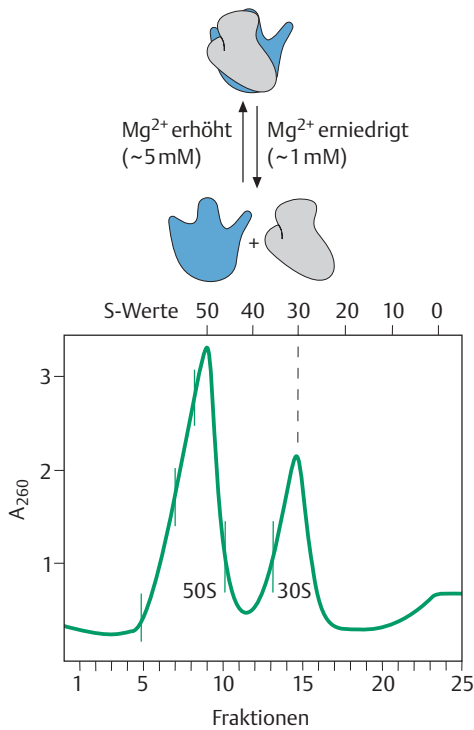


Abb. 4.19 Trennung von ribosomalen Untereinheiten. Die Zentrifugalkraft wirkt von rechts nach links, wo sich der Boden des Zentrifugationsröhrchens befindet. Nach Beendigung des Laufes wird der Inhalt des Röhrchens in 25 gleich großen Fraktionen gesammelt. Dabei lässt man den Sucrose-Gradienten durch eine Quarzküvette laufen und registriert fortlaufend die Absorption des UV-Lichtes bei 260 nm (A_{260}). Die Zahlen oben geben die S-Werte von Partikeln an, die bis zu den entsprechenden Positionen unter den gegebenen Zentrifugationsbedingungen wandern.

50S bzw. mit 30S. Deswegen spricht man auch von der bakteriellen 50S-Untereinheit und von der 30S-Untereinheit. Bei höheren Konzentrationen von Magnesium-Salzen (etwa 5 mM) vereinigen sich beide Untereinheiten zum 70S-Ribosom (Abb. 4.19 und Abb. 4.20).

Die kleine Untereinheit des bakteriellen Ribosoms besitzt die 16S rRNA (aufgebaut aus 1542 Nucleotiden) und je ein Exemplar von 21 verschiedenen Proteinen, den ribosomalen Proteinen S1 bis S21 (*S, small*). Die große Untereinheit besteht aus zwei RNA-Arten: 23S rRNA (aus 2904 Nucleotiden) und 5S rRNA (aus 120 Nucleotiden) sowie 31 Proteine, die ribosomalen Proteine L1 bis L36 (*L, large*). Die Nummerierung der Proteine stammt aus der Frühzeit der Ribosomen-Forschung (um 1975), als die Identität einzelner Proteine noch unsicher war. Deswegen stimmt die Nummerierung und die Zahl der ribosomalen Proteine in der großen Untereinheit nicht überein. Von Interesse ist hier, dass auch die große Untereinheit je ein Exemplar eines jeden Proteins enthält, mit Ausnahme eines Proteins L7/L12, das in vier Exemplaren vorkommt.

Die dreidimensionalen Strukturen der meisten ribosomalen Proteine sind bekannt. Ebenso weiß man viel über die räumliche Anordnung der ribosomalen RNA-Moleküle, deren Kennzeichen die Fähigkeit zur Ausbildung ausgedehnter Sekundärstrukturen ist, wie die Abb. 4.21 am Beispiel der 16S rRNA zeigt.

Ein sehr wichtiges Ziel der Ribosomen-Forschung war die Aufklärung der molekularen Architektur intakter Ribosomen. Nach jahrelangen Bemühungen sind in den Jahren 1999 und 2000 die ersten Röntgenstruktur-Analysen kristallisierter Ribosomen gelungen (Plus 4.1 und Plus 4.2). Aber bereits die älteren Ergebnisse der hochauflösenden Elektronenmikroskopie vermitteln interessante Einblicke in den Aufbau von

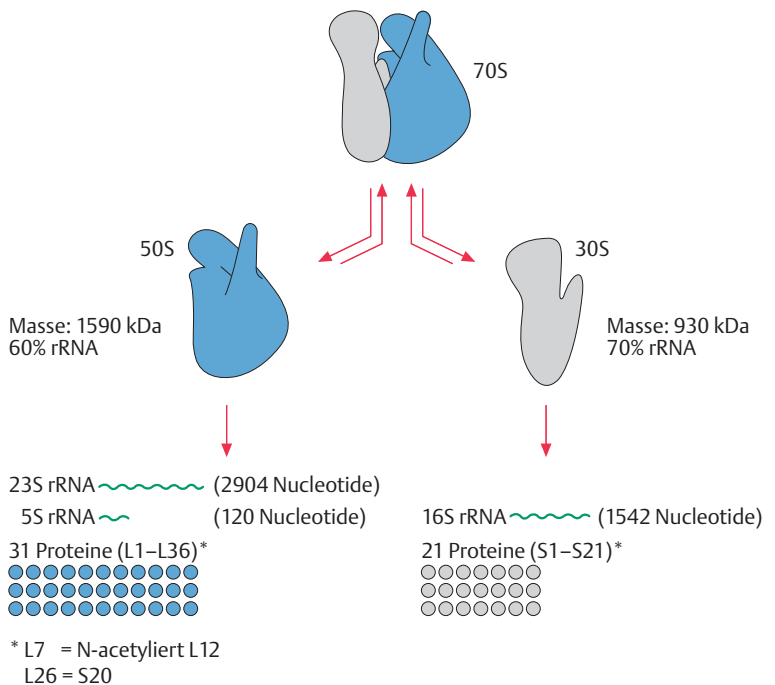


Abb. 4.20 Bestandteile von bakteriellen Ribosomen. In Lösungen mit niedrigen Magnesium-Salzkonzentrationen zerfällt das Ribosom in seine Untereinheiten. Unter denaturierenden Bedingungen lässt sich dann jede Untereinheit in die Bestandteile, rRNA und Proteine, zerlegen. Die Proteine L7 und L12 sind identisch, aber L12 trägt eine Acetylgruppe an der aminoterminalen NH_2 -Gruppe. Die Proteine L26 und S20 sind identisch. Unter geeigneten Bedingungen können sich die getrennten Bestandteile wieder zum intakten Ribosom zusammenfügen (Rekonstitution).

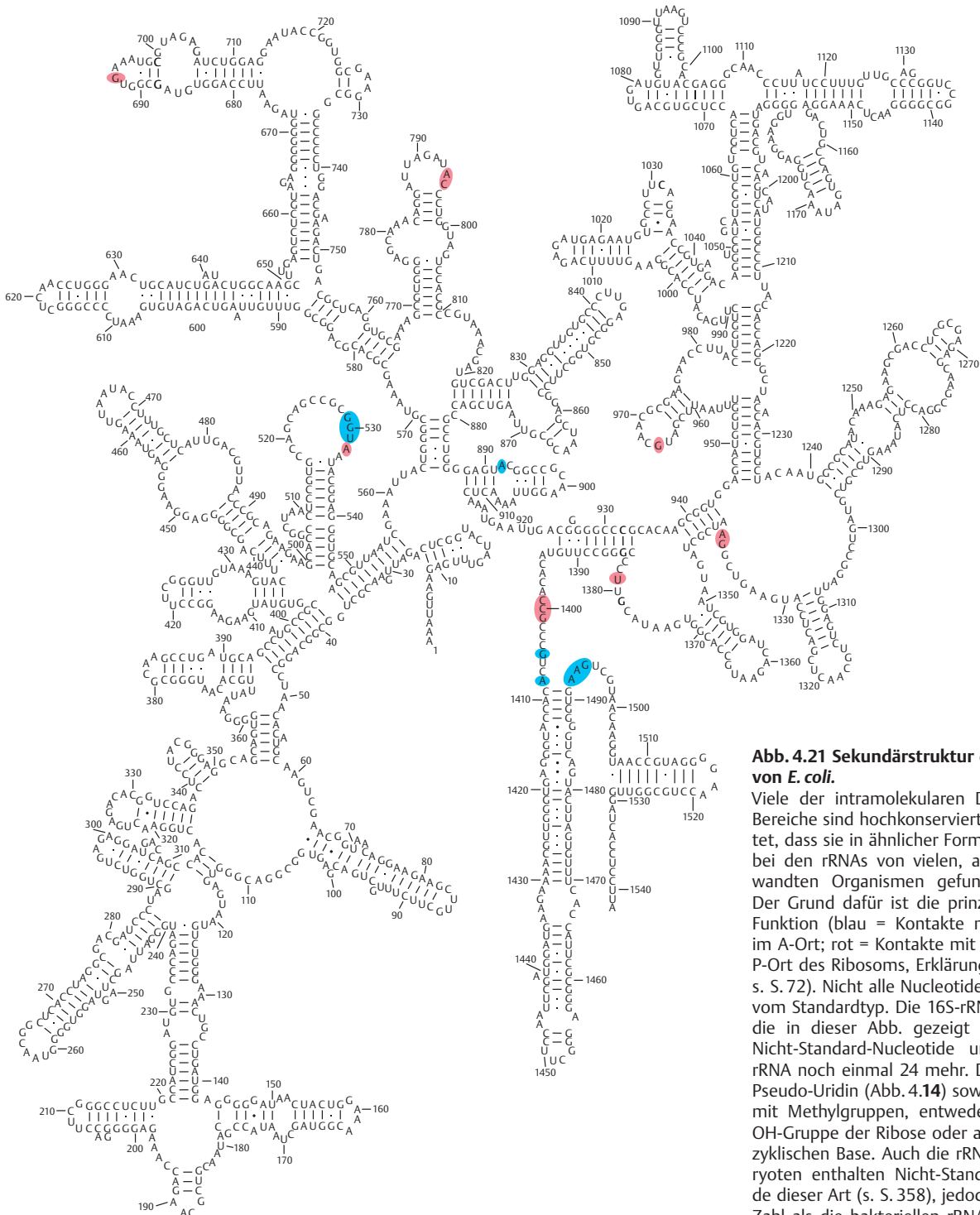


Abb. 4.21 Sekundärstruktur der 16S rRNA von *E. coli*.

Viele der intramolekularen Doppelstrang-Bereiche sind hochkonserviert. Dies bedeutet, dass sie in ähnlicher Form und Position bei den rRNAs von vielen, auch nichtverwandten Organismen gefunden werden. Der Grund dafür ist die prinzipiell gleiche Funktion (blau = Kontakte mit der tRNA im A-Ort; rot = Kontakte mit der tRNA im P-Ort des Ribosoms, Erklärung der Begriffe s. S. 72). Nicht alle Nucleotide in rRNA sind vom Standardtyp. Die 16S-rRNA von *E. coli*, die in dieser Abb. gezeigt wird, hat elf Nicht-Standard-Nucleotide und die 23S-rRNA noch einmal 24 mehr. Dazu gehören Pseudo-Uridin (Abb. 4.14) sowie Nucleotide mit Methylgruppen, entweder an der 2'-OH-Gruppe der Ribose oder an der heterozyklischen Base. Auch die rRNAs von Eukaryoten enthalten Nicht-Standard-Nucleotide dieser Art (s. S. 358), jedoch in größerer Zahl als die bakteriellen rRNAs. Die Nicht-Standard-Nucleotide kommen vor allem in funktionell wichtigen Bereichen vor (s. Abb. 4.26) und scheinen die ribosomalen Funktionen zu beeinflussen [nach 18].

Plus 4.1 3D-Struktur des Ribosoms

Die Strukturanalyse gibt durch Beugung von Röntgenstrahlen einen genauen Eindruck von der räumlichen Lage der Atome in einem biologischen Makromolekül. Die Voraussetzung für diese Untersuchung ist, dass die betreffenden Moleküle in Form eines Kristalls genau ausgerichtet sind. Jahrzehntelange Bemühungen um eine geeignete Kristallisation von Ribosomen wurden erst in den Jahren 1995–1999 von Erfolg gekrönt. Im Sommer 1999 veröffentlichten fast gleichzeitig vier Forschergruppen die ersten Röntgenstruktur-Analysen der kleinen ribosomalen Untereinheit von Bakterien. T. A. Steitz und Mitarb. beschrieben im Sommer 2000 in zwei klar, ja geradezu spannend geschriebenen Artikeln im Detail die komplette Struktur einer großen ribosomalen Untereinheit mit gutem Einblick in den Mechanismus der Verknüpfung von Aminosäuren zur Polypeptid-Kette. Der Weg dorthin verlief keineswegs geradlinig. Er war durch Versuch und Irrtum, vergebliche Mühen, Konkurrenzen und Rivalitäten gekennzeichnet. Einen guten Eindruck von den jahrzehntelangen Bemühungen vermittelt der Aufsatz von P. B. Moore und T. A. Steitz im Band 72 der Annual Reviews of Biochemistry (2003).

Das Ergebnis ist ein Ereignis in der Geschichte der molekularen Biologie: die Aufklärung der Struktur des bis dahin größten asymmetrischen Objektes. Man bedenke, dass das bakterielle 70S-Ribosom eine molekulare Masse von 2,5 Millionen Dalton hat. Wir haben einen guten Eindruck von der Lage aller 54 Proteine und aller rRNA-Nucleotide.

Die äußere Form der kristallisierten Ribosomen entspricht im wesentlichen der Abb. 4.22, die wir einer ganz anderen Methode verdanken, der Kryo-Elektronenmikroskopie. Auch wenn die Röntgenstruktur-Analysen am Ende die Informationen über die genaue Lage aller etwa 100 000 Atome in RNA und in den Proteinen liefern, bleibt der Platz der Kryo-Elektronenmikroskopie in der Ribosomen-Forschung erhalten. Bei dieser Methode werden Ribosomen in Sekundenschnelle eingefroren, was eine Untersuchung von Formveränderungen im Verlauf der Protein-Biosynthese ermöglicht. Denn es steht außer Frage, dass das aktive Ribosom eine dynamische Struktur besitzt: Die Anordnung seiner Bausteine ändert sich mit der schrittweisen Übersetzung der Nucleotid-Folge auf der mRNA und der Verknüpfung von Aminosäuren in der wachsenden Polypeptid-Kette.

Die Röntgenstruktur-Bilder zeigen, dass hauptsächlich drei Arten von Wechselwirkungen die 3D-Struktur des Ribosoms bestimmen: 1. Wechselwirkungen auch zwischen entfernten Bereichen in der RNA; 2. Mg^{++} -Brücken; 3. Beziehungen zwischen den Proteinen und RNA. Dazu einige Sätze.

Die ribosomale RNA ist kompliziert im Raum gefaltet, was schon die zweidimensionale Struktur der Abb. 4.21 vermuten lässt. Die Sekundärstrukturen (Abb. 4.21) nehmen spezifische Lagen im Raum ein, so dass eine 3D-Struktur entsteht, die insgesamt schon die Form der ribosomalen Untereinheiten einnimmt.

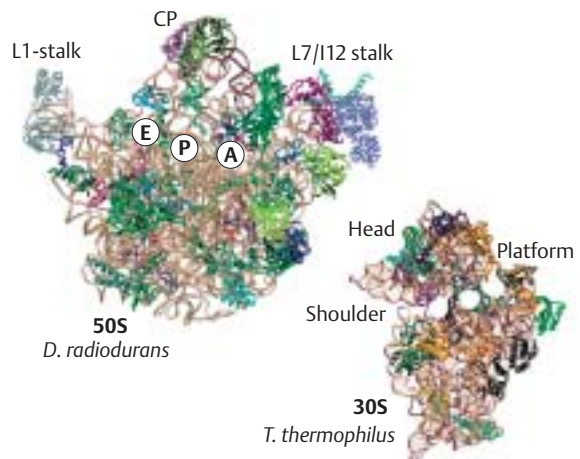
Magnesiumsalze stabilisieren die kompakte 3D-Struktur durch Bindung an Phosphatgruppen in entfernt liegenden

Sekundärstrukturen, die dadurch in räumliche Nähe kommen. Auch monovalente Ionen werden in Ribosomen gefunden und dienen zur Neutralisierung von negativ geladenen Phosphaten, was wiederum die Stabilität fördert. Schließlich die wichtigen Beziehungen zwischen RNA und den ribosomalen Proteinen: Die einzelnen Proteine erkennen die zugehörigen RNA-Abschnitte an ihrer Form. Gestreckte und flexible Proteinabschnitte dringen tief in das Gewirr der RNA-Strukturen im Innern des Ribosomes, während die eher globulären Bereiche der Proteine auf der Oberfläche bleiben.

Einen Eindruck von der komplizierten Struktur bakterieller Ribosomen vermittelt die Abbildung in diesem Kasten. Dieses Bild wurde freundlicherweise von Professor Ada Yonath, Weizmann-Institut, Israel, zur Verfügung gestellt. Es stammt aus ihrer Publikation „Ribosomal tolerance and peptide bond formation“ (Biological Chemistry Vol. 384, 1411–1419; 2003). Die ribosomalen Proteine sind bunt gezeichnet und die rRNA-Moleküle braun. Die Bindestellen für tRNA (E, P und A; s. Abb. 4.28) und einige markante Positionen sind markiert.

Das vermutlich wichtigste Ergebnis aller Untersuchungen:

- In den Bereichen des Ribosoms, wo die entscheidenden Reaktionen erfolgen, befinden sich keine Proteine – weder dort, wo sich Codon und Anticodon auf der kleinen Ribosomen-Untereinheit treffen, noch im Peptidyltransferase-Zentrum der großen Untereinheit, wo die Verknüpfung der Aminosäuren erfolgt.
- Jedoch liegen in beiden Bereichen geeignet gelegene Nucleotide der rRNA. Diese Nucleotide stabilisieren die Bindungen der beteiligten Moleküle. Das ist besonders bemerkenswert für die enzymatische Reaktion bei der Verknüpfung von Aminosäuren, eine Reaktion, die von passend im Raum liegenden Nucleotiden der 23S-rRNA ermöglicht wird. Kurz, die 23S-rRNA wirkt als Enzym, als Ribozym.
- Oder allgemeiner: Das **Ribosom ist ein Ribozym** (so der apodiktische Titel eines Aufsatzes von T. A. Steitz und P. B. Moore aus dem Jahre 2003 in der Zeitschrift Trends in Biochemical Sciences, Band 28, S. 411–418).



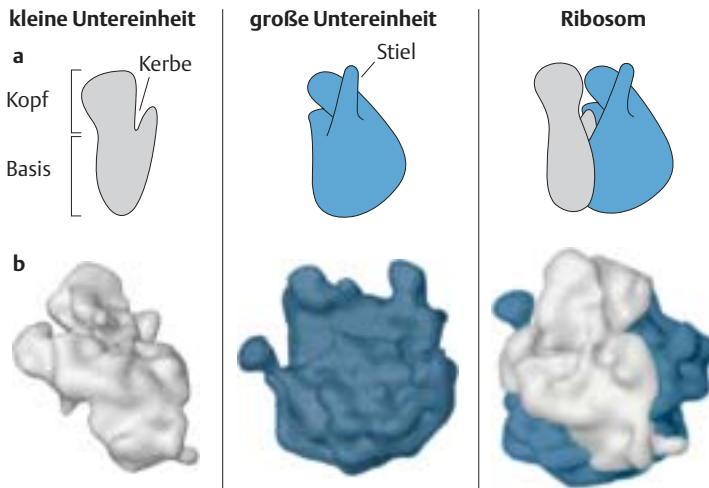


Abb. 4.22 Ribosomen-Formen.

a Seitenansicht von Ribosomen und Ribosomen-Untereinheiten, gezeichnet auf der Basis von elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Jahres 1975.

b Wir denken uns die Strukturen oben um 90° nach vorn gedreht. Die Abbildungen sind Ergebnisse der Kryo-Elektronenmikroskopie aus der Zeit um 1995. Auch wenn die Bilder der Kryo-Elektronenmikroskopie nicht in allen Einzelheiten mit denen der Röntgenstruktur-Analysen übereinstimmen, geben sie doch einen guten Eindruck von der allgemeinen Form – charakterisiert durch ihre Asymmetrie [nach 13,14].

Plus 4.2 Ribosomen in Eukaryotenzellen

Die Ribosomen in Tier- und Pflanzenzellen sind größer und komplizierter als die Ribosomen von Bakterien. Ein intaktes eukaryotisches Ribosom sedimentiert mit 80S und besteht aus einer großen 60S-Untereinheit und einer kleinen 40S-Untereinheit. Über die Zusammensetzung aus rRNA und Proteinen informiert die Tabelle, aus der hervorgeht, dass eukaryotische Ribosomen insgesamt 4 rRNA-Arten und über 80 ribosomale Proteine enthalten.

Untereinheit	RNA	Nucleotide	Proteine
60S	28S rRNA	4718	49 Polypeptide
	5,8S rRNA	160	
	5S rRNA	120	
40S	18S rRNA	1874	33 Polypeptide

Die Werte stammen von Ribosomen aus Säugetierzellen.

Ribosomen. Die Abb.4.22 vergleicht die elektronenmikroskopischen Darstellungen eines 70S-Ribosoms aus den Jahren 1975 und 1995. Schon das alte Modell gibt einen Eindruck von der Asymmetrie der Ribosomen-Struktur, aber das neue Modell zeigt viele zusätzliche Details wie Kerben, Rinnen und Kanäle zur Aufnahme der tRNAs, der mRNA und der wachsenden Protein-Kette. Viele der komplizierten Beziehungen zwischen Struktur und Funktion müssen noch im Detail erforscht werden. Deswegen werden Untersuchungen über die Mechanismen der Proteinsynthese auch in der Zukunft noch interessante und molekularbiologisch wichtige Ergebnisse liefern. In diesem Kapitel soll und kann es nur um eine allgemeine Einführung gehen. Deren Zweck ist es, die grundlegenden Kenntnisse zu vermitteln, die zum Verständnis der molekularen Genetik notwendig sind. Wer sich für die Einzelheiten interessiert, mag die Übersichtsartikel von Moore und Steitz (2003) und Ramakrishnan (2002) lesen (s. Literatur am Ende dieses Kapitels).

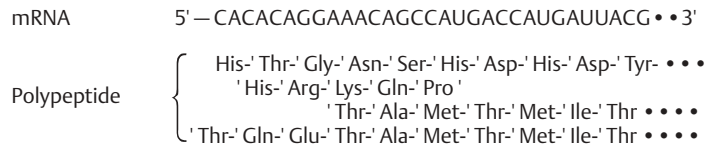


Abb. 4.23 Ungeordnete Peptid-Synthese.

Proteinsynthese: Genauigkeit des Starts

In der Praxis des Labors wird die Proteinsynthese am einfachsten mit radioaktiv markierten Aminosäuren untersucht. Die gebildeten Polypeptid-Ketten können durch Zusatz von Säure (z. B. 5% Trichloressigsäure) ausgefällt und auf feinporigen Nitrocellulose-Filtern aufgefangen werden. Freie Aminosäuren und Aminoacyl-tRNAs laufen durch die Poren des Filters. Folglich ist die filtergebundene Radioaktivität ein direktes Maß für die Menge an polymerisierten Aminosäuren. Mit diesem einfachen Versuch gelingt der Nachweis, dass isolierte Ribosomen – in Gegenwart eines Gemisches von Aminoacyl-tRNAs und einer mRNA – beträchtliche Mengen an Aminosäuren zu Polypeptid-Ketten verknüpfen können. Aber Untersuchungen ergeben eine vollständig ungeordnete Proteinsynthese. Sie beginnt irgendwo auf der mRNA und schreitet dann **in einem zufällig eingeschlagenen Dreiertakt** der Triplets auf der mRNA weiter. Es entsteht ein Gemisch verschieden langer und verschieden zusammengesetzter Polypeptide (Abb. 4.23).

Dieses *in vitro* gemessene Ergebnis kann nicht der Situation in der Zelle entsprechen. Und einige wichtige Fragen liegen auf der Hand:

- Wie kommt die Translation in den Takt, der zum richtigen Protein führt?
- Gibt es eine Stelle auf der mRNA, die den Startpunkt der Proteinsynthese bestimmt?

Den ersten Hinweis für einen definierten Startpunkt gab die Beobachtung, dass eine überdurchschnittlich große Zahl von Proteinen in *E. coli* **am aminoterminalen Ende die Aminosäure Methionin** trägt. Dann fanden im Jahre 1964 drei Forschergruppen zur etwa gleichen Zeit **eine besondere Form der Methionyl-tRNA**, die für die Startgenauigkeit verantwortlich ist.

Es gibt **zwei verschiedene methioninspezifische tRNA-Arten** in etwa gleich großen Mengen in *E. coli*-Zellen, $tRNA_f^{Met}$ und $tRNA_m^{Met}$. Beide tRNA-Arten werden durch dieselbe Methionyl-tRNA-Synthetase beladen. Aber das Methionin an der $tRNA_f^{Met}$ wird in Bakterienzellen durch ein spezielles Enzymsystem modifiziert, das einen Formyl-Rest an die Amino-Gruppe im Methionin anheftet (Abb. 4.24). So entsteht fMet-tRNA. Das Methionin an der „gewöhnlichen“ $tRNA_m^{Met}$ wird nicht formyliert. Ebenso erhält keine Aminosäure an einer der anderen Aminoacyl-tRNAs einen Formyl-Rest.

Die $tRNA_f^{Met}$ unterscheidet sich durch einige Merkmale von anderen tRNA-Arten: Das 5'-Nucleotid im Akzeptor-Arm bildet kein Basenpaar, der Anticodon-Arm enthält drei GC-Basenpaare und der Adenin-Baustein an Position 37, gleich hinter dem Anticodon, ist nicht modifiziert, wie in den meisten anderen tRNA-Arten (s. Abb. 4.13). Das mag der $tRNA_f^{Met}$ eine besondere Flexibilität bei der Wechselwirkung von Anti-

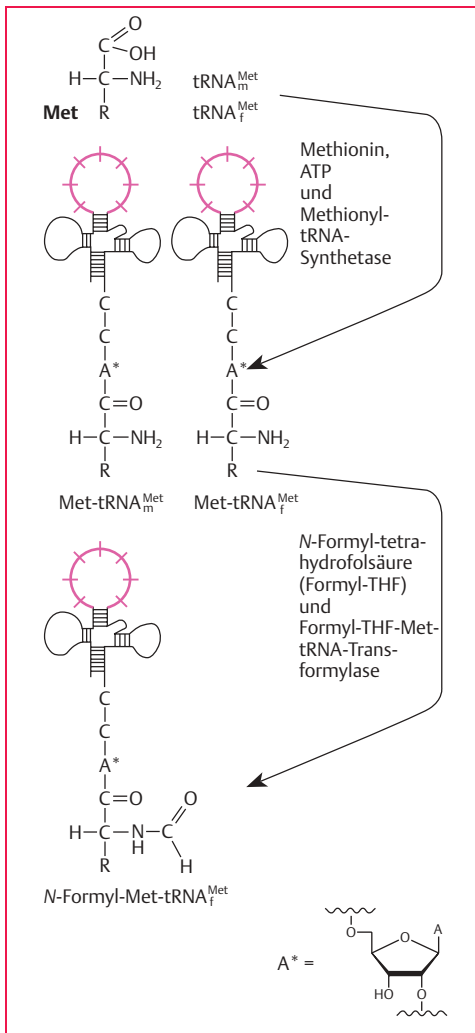


Abb. 4.24 Zwei funktionell verschiedene methioninspezifische tRNA-Arten.

codon und Codon und eine eigene Art zur Bindung an das Ribosom verleihen.

Die Funktion **fMet-tRNA als Initiator für die Proteinsynthese** hat eine Reihe von Konsequenzen:

1. Wir können schließen, dass jeder Translationsabschnitt auf der mRNA mit einem Codon beginnen muss, welches komplementär zum Anticodon der tRNA^{Met} ist. Tatsächlich ist **das Methionin-Codon AUG das universelle Start-Codon** für die Proteinsynthese. Mehr als 80–90% der Translationsabschnitte auf bakteriellen und fast alle auf eukaryotischen mRNAs beginnen mit AUG (Plus 4.3). Etwa 10–15% der Translationsabschnitte von Bakterien haben GUG und einige wenige UUG am Anfang.
2. Der Formyl-Rest versiegelt gleichsam die Amino-Gruppe der ersten Aminosäure, so dass eine Syntheserichtung vorgegeben ist. Die Synthese eines Proteins beginnt am Amino-Ende und setzt sich dann in Richtung Carboxy-Ende fort. Aminosäuren werden also **an das Carboxy-Ende einer wachsenden Polypeptid-Kette angeheftet**. Diese Schlussfolgerung werden wir im Folgenden bestätigt sehen, wenn wir die Einzelschritte bei der Proteinsynthese kennenlernen.
3. Fertige Proteine tragen keinen Formyl-Rest an ihrer aminoterminalen Aminosäure, denn er wird noch während der laufenden Synthese durch das Enzym **Polypeptid-Deformylase** entfernt. Ebenso tragen bei weitem nicht alle Proteine ein endständiges Methionin. Auch hier erfolgt die Abtrennung an der noch unfertigen, wachsenden Polypeptid-Kette, und zwar durch das Enzym **Methionin-Aminopeptidase**.

Plus 4.3 Initiations-tRNA auch in Eukaryotenzellen

Auch in Eukaryoten kommen zwei funktionell verschiedene Arten von tRNA^{Met} vor. Die eine bindet sich an das AUG-Triplett, das den Beginn einer Kodierungssequenz auf der mRNA kennzeichnet und bringt dadurch den Proteinsynthese-Apparat in den richtigen Takt. Die andere tRNA^{Met} dient zum Einbau einer internen Aminosäure in die wachsende Polypeptid-Kette, wie alle anderen tRNA-Arten auch. Im Unterschied zum bakteriellen System ist das Methionin auf der Initiations-tRNA in Eukaryoten **nicht** durch eine Formyl-Gruppe modifiziert. Eine Formylierung des Methionins ist also nicht für die phasengerechte Initiation der Proteinsynthese notwendig.

Initiation der Translation

Die Initiations-tRNA ist eine wesentliche Voraussetzung für die geordnete Einleitung der Translation. Zusätzlich ist eine Gruppe von Proteinen, Initiationsfaktoren genannt, notwendig. Wie wir später sehen werden, benötigen Eukaryotenzellen eine große Zahl solcher Faktoren (S. 443). Aber die Verhältnisse sind sehr viel einfacher bei Bakterien, denn Bakterien kommen im Wesentlichen mit **drei Initiationsfaktoren** aus: IF1, IF2 und IF3 (Tab. 4.4). Die Faktoren bestimmen die Reaktionen, die schließlich zum Start der Proteinsynthese führen:

- Die Faktoren treffen sich mit der mRNA an der kleinen Ribosomen-Untereinheit. IF1 verhindert die vorzeitige Anlagerung der großen Untereinheit. IF3 verdrängt Nicht-Initiator-tRNAs vom Ribosom und fördert damit die Anlagerung der fMet-tRNA.

Tab. 4.4 Initiationsfaktoren von *E. coli*

Faktor	Größe (Zahl der Aminosäuren)	Funktion
IF1	71	stimuliert die Aktivität von IF2 und IF3; hält die Ribosomen-Untereinheiten getrennt
IF2	889	bindet an fMet-tRNA und leitet sie zum P-Ort am Ribosom; spaltet gebundenes GTP (GTPase-Aktivität)
IF3	181	fördert die Ablösung von Nicht-Initiator-tRNAs vom Ribosom; erhöht die Spezifität der Bindung von fMet-tRNA

Abb.4.25 Bildung des Initiationskomplexes.

Die Rechtecke kennzeichnen die Initiationsfaktoren. IF2 trägt GTP (geschlossene Punkte). Nach Bindung der 50S-Untereinheit wird IF2 abgelöst und GTP in GDP und anorganisches Phosphat gespalten.

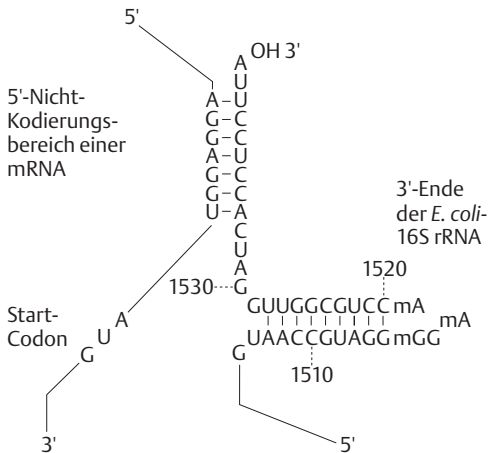
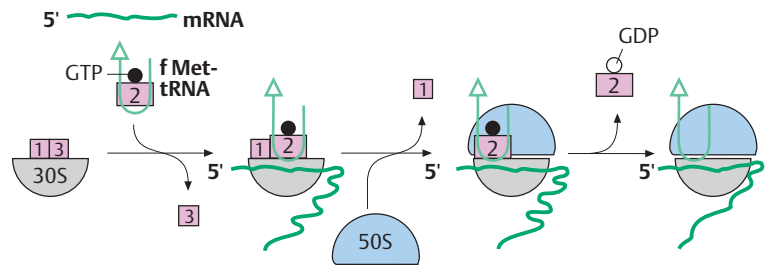


Abb.4.26 Struktur und Funktion der Ribosomen-Bindungsstelle im 5'-Nicht-Kodierungsbereich prokaryotischer mRNA. Dargestellt sind die etwa 40 Nucleotide am 3'-Ende der 16S-rRNA. Die Haarnadelschleife weist auf eine ausgeprägte Sekundärstruktur des ribosomalen RNA-Moleküls hin (Abb. 4.21). Hier kommen modifizierte Purine (N⁶-Methyladenin und 7-Methylguanin) in der rRNA-Sequenz vor.

Ein Abschnitt aus der 5'-Nicht-Kodierungssequenz der mRNA geht Basenpaarungen mit einer Folge von sieben Nucleotiden der 16S-rRNA ein, der sogenannten Shine-Dalgarno-Sequenz. In anderen mRNA-Molekülen ist die Komplementarität weniger stark ausgeprägt, so dass nur drei bis sechs Basenpaare gebildet werden können. Auf jeden Fall hat die Wechselwirkung zwischen der Shine-Dalgarno-Sequenz und der 16S-rRNA zur Folge, dass das Initiationscodon AUG in die Nähe des P-Orts auf der kleinen ribosomalen Untereinheit zu liegen kommt. Die genaue Positionierung im P-Ort erfolgt erst nach Einführen der Initiations-tRNA und Codon-Anticodon-Bindung.

- Das Protein IF2 wird zunächst durch gebundenes GTP aktiviert, bevor es spezifisch an fMet-tRNA binden kann. In diesem Komplex gelangt die Initiations-tRNA an das Ribosom.
- Als nächstes verlassen IF1 und IF3 die kleine Ribosomen-Untereinheit. Damit kann die Anlagerung der großen Untereinheit erfolgen. Im Zuge dieses Vorgangs wird GTP gespalten und IF2-GDP freigesetzt (Abb. 4.25).

Man bezeichnet das Ribosom mit gebundener mRNA und gebundener fMet-tRNA oft als **Initiationskomplex**. Die Stabilität des Komplexes und damit die Effizienz der Translation werden stark von Nucleotid-Sequenzen in der Umgebung des Start-Codons AUG beeinflusst. Zum Verständnis muss hier darauf hingewiesen werden, dass mRNAs nie direkt mit dem Start-Codon beginnen, sondern immer einen Abschnitt haben, der dem AUG vorgeschaltet ist, den **5'-Nicht-Kodierungsbereich** (Abb. 4.26).

Eine wichtige Funktion dieses mRNA-Bereiches betrifft die Einleitung der Translation. Der Abschnitt, der 4–14 Nucleotide vor dem AUG-Codon im Nicht-Kodierungsbereich liegt, geht Basenpaarungen mit komplementären Sequenzen am 3'-Ende der 16S rRNA ein (Abb. 4.21 und Abb. 4.26). Die Länge des komplementären Abschnitts und sein Abstand vom AUG-Codon bestimmen die Stabilität des Initiationskomplexes. Die ribosomalen Proteine S1 und S21 tragen dazu bei.

Auf die Bedeutung der Basenpaarung zwischen mRNA und 16S-rRNA haben erstmals J. Shine und L. Dalgarno (1975) aufmerksam gemacht. Deswegen spricht man auch von der **Shine-Dalgarno-Sequenz** der mRNA (Abb. 4.26).

Elongation: Die programmierte Verknüpfung von Aminosäuren

Nach Ausbildung der stabilen Wechselwirkung zwischen dem AUG-Start und dem Anticodon des fMet-tRNA-Initiationskomplexes ist der Start für die Proteinsynthese festgelegt. Die geordnete Verknüpfung von Aminosäuren kann jetzt im Takt der Triplet- oder Codon-Folgen auf der mRNA erfolgen.

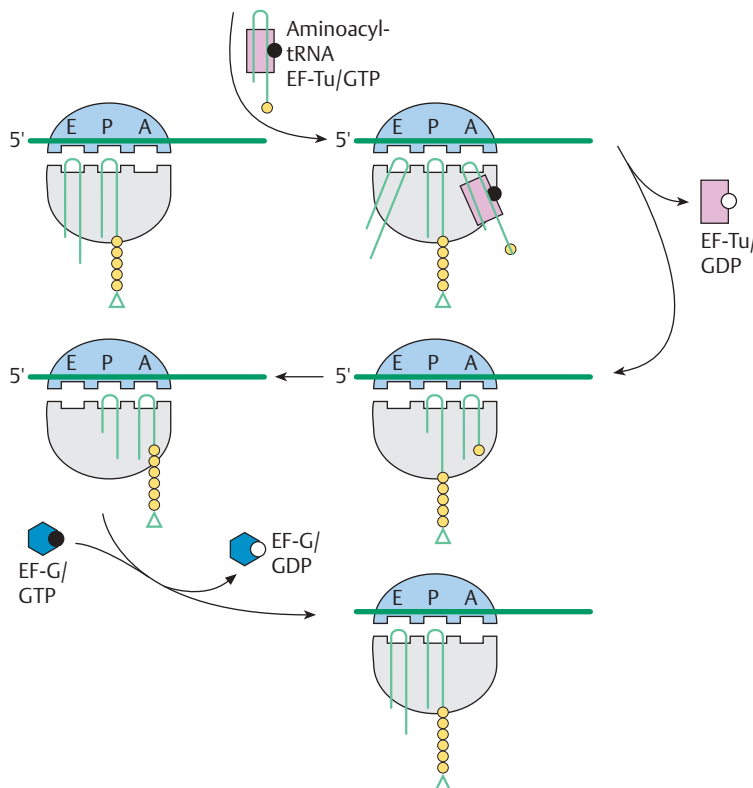
Für ein besseres Verständnis der folgenden Ereignisse ist die Unterscheidung von zwei Bindungsstellen für beladene tRNAs auf dem Ribosom nützlich:

- Aminoacyl- oder Erkennungsort: **A-Ort**,
- Peptidyl- oder Bindungsort: **P-Ort**.

Zu Beginn der Proteinsynthese befindet sich die Initiations-tRNA im P-Ort. Das nächstfolgende Triplet auf der mRNA liegt im A-Ort des Ribosoms. Dorthin gelangt nun die Aminoacyl-tRNA, deren Anticodon zum Codon im A-Ort passt. Für diese Reaktion müssen Aminoacyl-tRNAs durch Bindung an einen **Elongationsfaktor** (EF) vorbereitet werden. Der bakterielle Faktor hat die Bezeichnung **EF-Tu**. Er muss durch GTP-Bindung aktiviert werden.

Als Komplex mit EF-Tu/GTP gelangt die Aminoacyl-tRNA an den A-Ort des bakteriellen Ribosoms. Dort wird GTP gespalten und EF-Tu/GDP verlässt das Ribosom, während gleichzeitig der nächste Schritt erfolgt: N-Formyl-Methionin wird von der tRNA abgelöst und über seine Carboxy-Gruppe mit der Amino-Gruppe der neuen Aminosäure – unter Ausbildung einer Peptid-Bindung – verknüpft (S. 38). Jetzt liegt vorübergehend eine Dipeptidyl-tRNA im A-Ort, während sich die unbeladene tRNA im sogenannten Ausgangs- oder **Exit-Ort** (E-Ort) befindet.

Darauf folgt die Translokation: das Ribosom bewegt sich relativ zur mRNA um die Länge eines Triplets. Diese Reaktion erfordert einen besonderen **Elongationsfaktor mit der Bezeichnung EF-G** bei Bakterien. Auch dieser Elongationsfaktor benötigt für seine Aktivität gebundenes GTP, das bei der Translokation in GDP gespalten wird. Am Ende befindet sich die Peptidyl-tRNA im P-Ort. Der A-Ort ist frei geworden und ein neuer Zyklus im Ablauf der Proteinsynthese kann beginnen (Abb. 4.27):



4.27 Kettenverlängerung (Elongation): die Bindung von Aminoacyl-tRNA, die Peptidyl-Transfer-Reaktion und die Translokation. Kleine Ribosomen-Untereinheit (blau) mit dem A-Ort, dem P-Ort und dem E-Ort. Große Ribosomen-Untereinheit (grau) mit dem Peptidyl-Transferase-Zentrum: Methionin (grünes Dreieck) am aminoterminalen Ende der wachsenden Polypeptidkette (gelbe Kreise, andere Aminosäuren). Aktive Faktoren tragen GTP (dunkle Kreise), nicht-aktive Faktoren GDP (offene Kreise). Beachte, dass sich immer mindestens zwei tRNAs am Ribosom befinden.

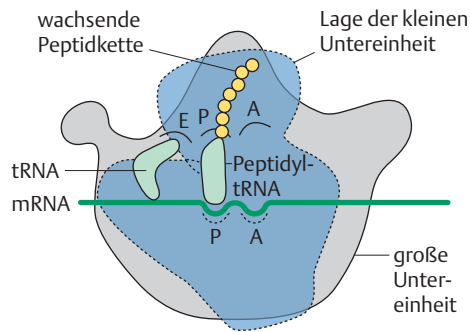


Abb. 4.28 mRNA und tRNAs am Ribosom
[nach 16].

- Am A-Ort befindet sich ein neues mRNA-Codon für die Bindung der passenden Aminoacyl-tRNA im Komplex mit EF-Tu/GTP. Wenn Codon und Anticodon passen, wird GTP gespalten und EF-Tu/GDP verlässt das Ribosom. Zur gleichen Zeit wird die unbeladene tRNA am E-Ort abgestoßen. Am Ende dieses Schrittes befinden sich zwei tRNAs am Ribosom: die Aminoacyl-tRNA im A-Ort und die Peptidyl-tRNA im P-Ort.
- Der nächste Schritt ist die **Peptidyl-Transferase-Reaktion**: Eine Peptid-Bindung zwischen der Carboxy-Gruppe der wachsenden Peptidkette und der Amino-Gruppe der neuen Aminosäure wird geknüpft. Die Reaktion erfordert **Strukturelemente der 23S-rRNA** zur korrekten Anordnung der CCA-Enden der tRNAs und zur Steuerung der Peptid-Bindungsreaktion. Am Ende liegt die Peptidyl-tRNA im A-Ort, während die entladene tRNA in den E-Ort gelangt.
- Der dritte Schritt ist die Translokation, gesteuert durch einen aktiven Komplex EF-G/GTP: Bewegung des Ribosoms um die Länge eines Triplets. Wieder befinden sich zwei tRNAs am Ribosom: die Peptidyl-tRNA im P-Ort und die entladene tRNA im E-Ort (Abb. 4.28).

Der E-Ort spielt nicht einfach nur eine passive Rolle beim Entlassen der leeren tRNA, sondern eine tRNA am E-Ort ist für die Genauigkeit der Codon-Anticodon-Bindung am A-Ort verantwortlich, damit auch für die Einhaltung des Leseraster-Taktes.

Der Syntheszyklus von drei Schritten wiederholt sich fortlaufend mit einer Geschwindigkeit von 10–20 Polymerisationsreaktionen in der Sekunde.

Die Grundzüge des Proteinsynthese-Zyklus sind in den Jahren von 1965–1975 erforscht worden. Damals war bereits bekannt, dass es außer den beiden Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G noch einen weiteren Faktor in Bakterien gibt, EF-Ts (Tab. 4.5). Dieser Faktor ist für die Regeneration von EF-Tu notwendig.

Wie in der Abb. 4.27 gezeigt, verlässt ein EF-Tu/GDP-Komplex das Ribosom. Damit EF-Tu sich wieder an Aminoacyl-tRNA binden und seine Funktionen am Ribosom erfüllen kann, muss das GDP durch GTP ersetzt

Tab. 4.5 Elongationsfaktoren in *E. coli*

Faktor (neue Bezeichnung)	Größe (Zahl der Aminosäuren)	Funktion
EF-Tu* (EF1A)	393	Bindung von Aminoacyl-tRNA und Leitung zum A-Ort; GTP-Spaltung (GTPase-Aktivität), aktiviert durch Bindung an das Ribosom
EF-G (EF2)	703	GTPase; Ablösen der leeren tRNA aus dem E-Ort; Translokation
EF-Ts (EF1B)	282	Austausch von GDP durch GTP am EF-Tu und damit Regeneration eines aktiven EF-Tu

* In *E. coli* gibt es zwei EF-Tu-Proteine. Sie haben gleiche Größe, unterscheiden sich aber durch die carboxyterminale Aminosäure. Die häufigere Form trägt Gly, die seltenere Ser am Carboxy-Ende. Es ist nicht bekannt, ob die beiden Formen von EF-Tu unterschiedliche Funktionen haben. Die dreidimensionale Strukturen von EF-Tu/GTP, gebunden an tRNA, und von EF-G/GDP sind bekannt [19].

werden. Diese Reaktion verläuft spontan nur sehr langsam, aber wird durch EF-Ts stark beschleunigt. Das Recycling von EF-Tu ist in der Abb. 4.29 skizziert.

Wie vorher erwähnt, machen Ribosomen den erstaunlichen Anteil von 25% des Trockengewichtes von Bakterien aus. Es ist deswegen nicht überraschend, dass auch die Elongationsfaktoren in großen Mengen in Bakterien vorkommen: etwa 5% aller löslichen Proteine sind EF-Tu und immerhin 0,5% sind EF-Ts oder EF-G. Die große Menge an EF-Tu hat zur Folge, dass so gut wie keine freien Aminoacyl-tRNAs vorkommen. Sie liegen als „ternäre“ Komplexe mit EF-Tu/GTP vor.

Termination

Das Ende von Kodierungsregionen in mRNAs wird durch eines der drei **Stop-Codons** angegeben: **UAG, UAA und UGA**. Nicht selten beenden nicht nur ein, sondern zwei oder auch mehrere Stop-Codons den Triplet-Takt einer Kodierungsregion.

Normale Zellen enthalten keine tRNAs mit Anticodons, die komplementär zu den Stop-Codons sind. Deswegen halten Ribosomen an Stop-Codons an und die Synthese von Proteinen wird unterbrochen. In Gegenwart der **Terminationsfaktoren, RF1, RF2 und RF3**, wird die Peptidkette von der Peptidyl-tRNA gelöst und damit das fertige Protein freigesetzt (Abb. 4.30).

Die Faktoren RF1 und RF2 nehmen den Platz einer Aminoacyl-tRNA am A-Ort des Ribosoms ein, denn sie haben eine ähnliche räumliche Form wie die beladene tRNA. Das erklärt auch die Spezifität der Faktoren: Faktor RF1 erkennt die Stop-Codons UAG und UAA und Faktor RF2 die Codons UGA und UAA. Der Faktor RF3 hat eine Hilfsfunktion. Er ist mit den Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G verwandt und bindet GTP, das dann bei der Aktivierung von RF1 und RF2 gespalten wird (Tab. 4.6).

Zur Termination gehört das Recycling von Ribosomen:

- RF1 oder RF2 werden unter dem Einfluss von RF3 vom Ribosom gelöst.

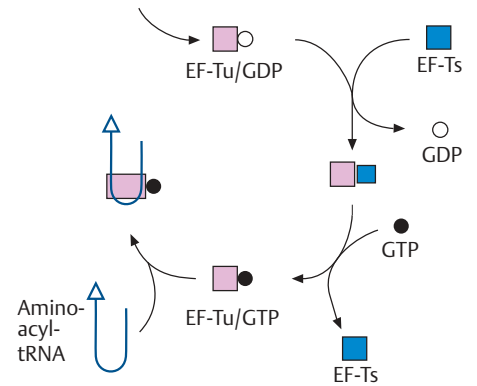


Abb. 4.29 Funktion von EF-Ts: Recycling von EF-Tu/GDP. Die dreidimensionale Struktur von EF-Tu/EF-Ts-Komplexen ist bekannt.

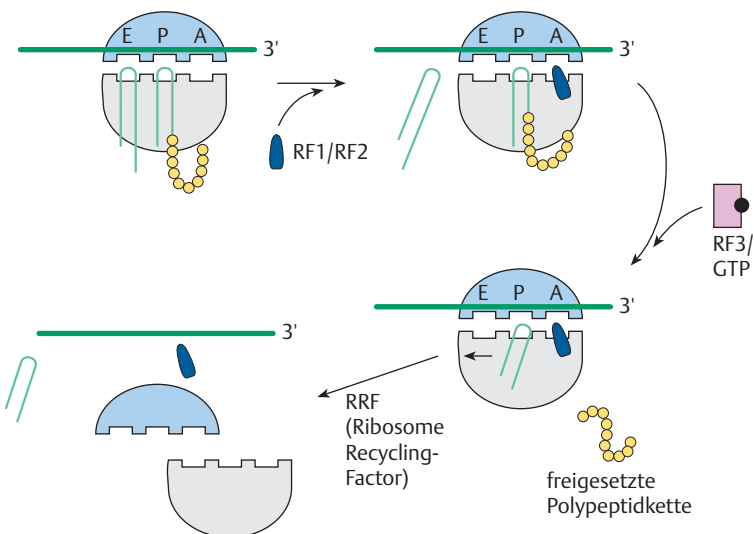


Abb. 4.30 Termination der Proteinsynthese [nach 20].

Tab. 4.6 Terminationsfaktoren

Faktor	Größe (Zahl der Aminosäuren)	Funktion
RF1	323	Erkennung der Stop-Codons UAA und UAG
RF2	329	Erkennung der Stop-Codons UAA und UGA
RF3	528	Stimulierung der Freisetzung von Polypeptid-Ketten GTP-Spaltung (GTPase)

RF = *release factor*

- Ein spezieller **Ribosomen-Recycling-Faktor** (RRF), zusammen mit EF-G, trägt zur Entlassung der leeren tRNA und der mRNA bei und vermittelt die Trennung der Ribosomen-Untereinheiten.
- Die kleine Ribosomen-Untereinheit bindet den **Initiationsfaktor IF3** (Tab. 4.4) als Vorbereitung für die Ausbildung eines neuen Initiationskomplexes.

Stop-Codons liegen so gut wie nie direkt am Ende einer mRNA. Auf ein Stop-Codon folgt ein mehr oder weniger langes Stück, der **3'-Nicht-Kodierungsbereich**. Er bestimmt unter anderem die Stabilität der mRNA, also die Zeit zwischen der Synthese der mRNA und ihrem Abbau.

Man bezeichnet einen mRNA-Abschnitt oder einen entsprechenden DNA-Abschnitt, der nicht durch ein Stop-Codon unterbrochen wird, als **offenes Leseraster**, *Open Reading Frame* (ORF). Ein offenes Leseraster wird also eingerahmt am 5'-Ende durch das Start-Codon AUG (oder im DNA-Code: ATG) und am 3'-Ende durch eines der drei Stop-Codons. Bakterielle mRNAs enthalten oft mehrere offene Leseraster (Abb. 4.31). Man spricht dann von polygenischen mRNAs. Eukaryotische mRNAs sind monogenisch: sie enthalten **ein** offenes Leseraster.

Abb. 4.31 Schema der mRNA-Struktur von Bakterien.

AUG = Start-Codon

RBS = Ribosomen-Bindungsstelle (Abb. 4.26)

Stop = eines der drei Stop-Codons (UAA, UGA oder UAG)



Geschwindigkeit und Genauigkeit

Die Aufgabe des Ribosoms ist die schrittweise Verknüpfung von Aminosäuren, programmiert durch die Folgen der Triplets auf der mRNA. Dabei müssen die Einzelschritte so schnell wie möglich, aber auch so genau wie möglich erfolgen.

„So schnell wie möglich“. Polypeptid-Ketten werden in *E. coli*-Zellen mit Geschwindigkeiten von 10–20 Synthesezyklen/Sekunde verlängert. Ein durchschnittlich großes Protein aus 500 Aminosäuren kann also in 25–50 Sekunden entstehen. Dazu kommt ein weiteres: Bald nachdem ein Ribosom die Proteinsynthese begonnen und den Startplatz geräumt hat, können neue Ribosomen auf die mRNA aufspringen und eigene Synthesezyklen beginnen. Die Effizienz, mit der neue Ribosomen engagiert werden, hängt unter anderem von der Nucleotid-Sequenz in der

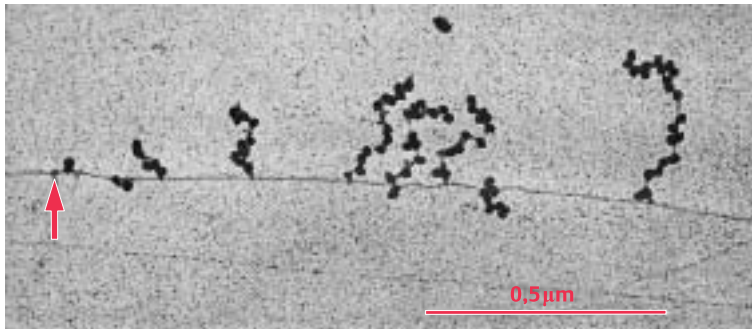


Abb.4.32 Polysomen und die Kopplung von Transkription und Translation bei Bakterien. Quer über das Bild läuft die DNA als durchgehende Linie. Der Pfeil kennzeichnet eine RNA-Polymerase am oder in der Nähe des Promotors. Zuerst entsteht das 5'-Ende der RNA, und neue Nucleotide werden an das 3'-Ende der wachsenden RNA geheftet. Es ist deutlich zu sehen, dass sich Ribosomen schon an die promotornahe und deswegen noch recht kurze RNA binden. Später (rechts) bilden sich – an der noch wachsenden RNA – Polysomen mit 20 oder mehr Ribosomen [aus 12].

Umgebung des Start-Codons ab (Abb.4.26). Jedenfalls sind fast immer mehrere oder viele Ribosomen gleichzeitig mit der Translation einer mRNA beschäftigt. In dichtester Packung kann ein Ribosom dem anderen in Abständen von etwa 80 Nucleotiden folgen. Man spricht von **Polysomen**, wenn eine mRNA mehrere Ribosomen trägt (Abb.4.32).

„So genau wie möglich“. Einbauten von falschen Aminosäuren ereignen sich ein- bis höchstens fünfmal unter 10 000 Polymerisationsschritten. Diese Fehlerrate ist erstaunlich niedrig, wenn man bedenkt, dass der wichtigste Mechanismus bei der Auswahl der richtigen Aminosäure die Wechselwirkung von Codon und Anticodon ist, und dass eine Folge von drei Basenpaaren bei physiologischen Temperaturen nicht stabil ist. Jedoch wird die Wechselwirkung von tRNA und mRNA durch Komponenten des Ribosoms gefestigt. Aber das ist nicht der einzige Grund für die Genauigkeit der Translation. Dazu kommt noch ein Vorgang, den man anschaulich als Korrekturlesen (*proof reading*) bezeichnet. Das findet nach der Bindung des Dreierkomplexes Aminoacyl-tRNA-EF-Tu/GTP an das Ribosom statt. Zwischen der Kontaktaufnahme des Dreierkomplexes mit dem Ribosom und seine feste Bindung an den A-Ort vergeht eine kurze Zeit, bevor das GTP gespalten und EF-Tu/GDP freigesetzt wird. Während dieser Zeit trennen sich Aminoacyl-tRNAs von nichtpassenden Anticodons oder technisch ausgedrückt: sie dissoziieren vom Ribosom um ein Vielfaches bereitwilliger als die passende Aminoacyl-tRNA. Wenn Anticodon und Codon passen, richtet sich die Aminoacyl-tRNA im A-Ort ein, die unbeladene tRNA verlässt ihren E-Ort und die Peptidyl-Transferase kann ihre Funktion ausführen.

Besonderheiten bei Bakterien

Die Abb. 4.32 zeigt ein berühmtes elektronenmikroskopisches Bild, das O. L. Miller und Mitarbeiter im Jahre 1970 veröffentlicht haben. Es ist berühmt, weil es besonders deutlich zeigt, dass viele Ribosomen gleichzeitig auf einer mRNA wirksam sein können, aber mehr noch, weil es zeigt, dass Transkription und Translation bei Bakterien gekoppelt ablaufen. Dieses Ergebnis ist jahrelang fraglos akzeptiert worden, denn die RNA-Synthese beginnt mit dem 5'-Ende und setzt sich mit der Anheftung neuer Nucleotide an das 3'-Ende fort (s. Abb.4.3). Das Start-Codon befindet sich in der Nähe des 5'-Endes, so dass es schon bald nach Beginn der Transkription für den Beginn der Proteinsynthese genutzt werden kann. Mit anderen Worten, Transkription und Translation verlaufen in dieselbe Richtung. Tatsächlich können sich Ribosomen an die noch wachsende mRNA binden, ja, der transkribierenden RNA-Polymerase auf dem Fuß folgen.