

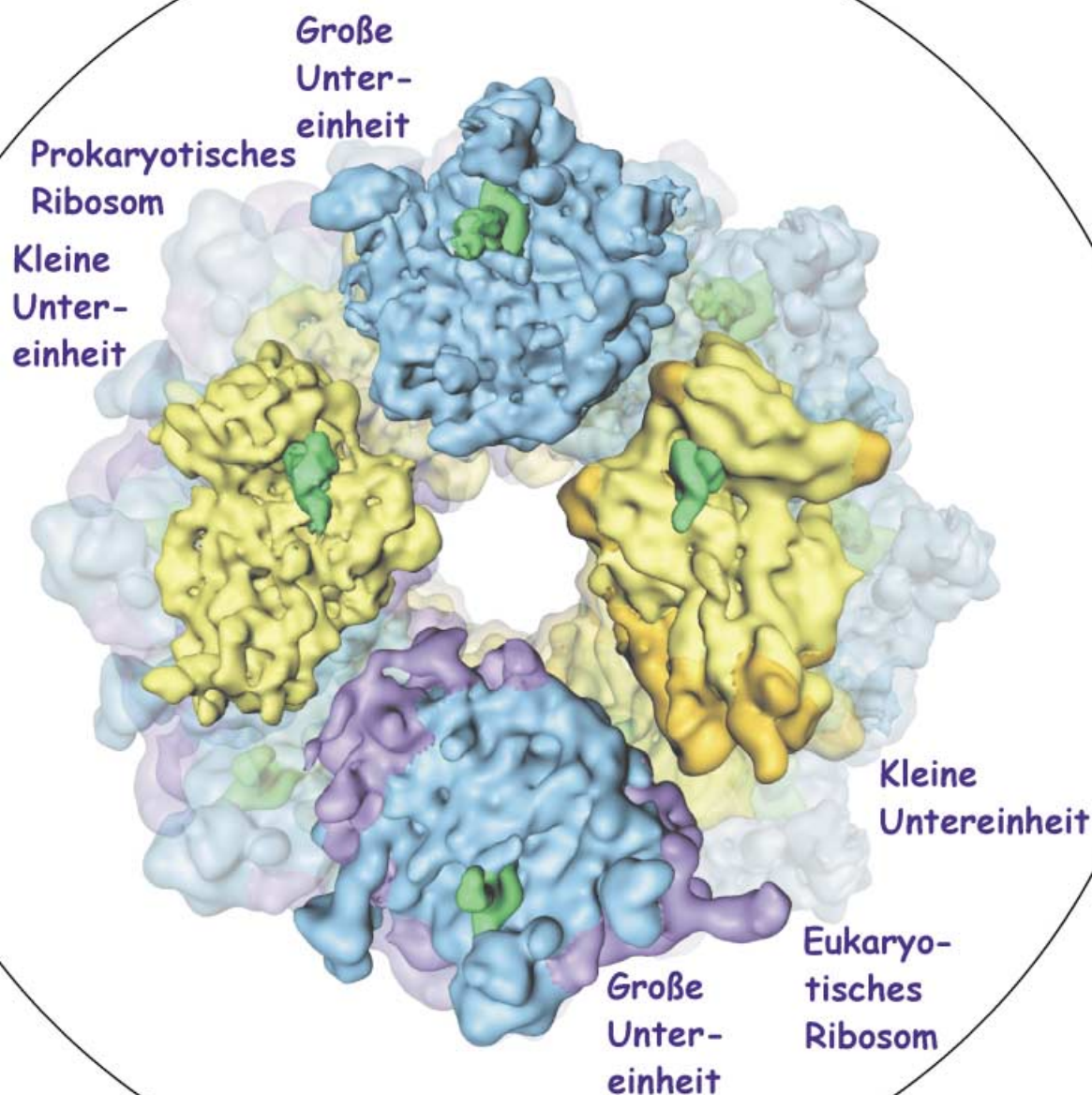
Ribosomenstruktur und Translation

Das Ribosom unter der Lupe

Daniel N. Wilson und Knud H. Nierhaus*

Stichwörter:

Aminosäuren · Proteine · Ribosomen ·
RNA · Translation



Fast zwanzig Jahre lang haben Kristallographen nach der Struktur der Ribosomen gesucht, der größten und kompliziertesten RNA-Protein-Komplexe in der Zelle. Wie alle Ribosomen setzt sich auch das Ribosom einer kleinen Bakterienzelle aus einer großen und kleinen Untereinheit zusammen. Das bakterielle Ribosom umfasst drei RNA-Moleküle mit mehr als 4000 Ribonucleotiden und 54 unterschiedlichen Proteinen. Herausragendes Ereignis der letzten Jahren war das Erreichen der atomaren Auflösung der großen und kleinen Untereinheit sowie das einer 5.5-Å-Struktur des vollständigen 70S-Ribosoms von *Thermus thermophilus*. Damit war es möglich, Kristalle der Untereinheiten mit kleinen Liganden zu tränken, was unser Verständnis der zentralen Funktionen des Ribosoms revolutioniert hat. Zusammen mit den Vorzügen kryoelektronenmikroskopischer Studien von Translationskomplexen entstand eine Sammlung von Momentaufnahmen ribosomaler Funktionen, aus denen ein filmähnlicher Ablauf der Translation abgeleitet werden konnte. Analysen jüngerer Datums von Heferibosomen lassen eine erstaunliche strukturelle Deckung mit den Ribosomen der Prokaryoten erkennen. Dieser Aufsatz soll ein bakterielles Ribosom durch einen Translationszyklus begleiten, wobei insbesondere solche Merkmale hervorgehoben werden, die sich in den Ribosomen aller Organismen wiederfinden.

1. Die Wunder der Translationswelt

Das Ribosom ist ein Übersetzer. Es verwendet die Information, die in der Messenger-RNA (mRNA) enthalten ist, um eine entsprechende Sequenz von Aminosäuren zu produzieren, und verbindet auf diese Weise die Welten der Nucleinsäure (DNA und RNA) mit der der Proteine. Es tut dies, indem es eine Plattform bereitstellt, auf der jedes Codon einer mRNA mit der Aminosäure verbunden wird, für die es codiert. Die physikalische Verbindung zwischen den Welten der RNA und der Proteine stellen die Transfer-RNAs (tRNAs) her. Das eine Ende einer tRNA, das Anticodon, ist komplementär zu dem Codon einer mRNA, während das andere Ende, das CCA-Ende, kovalent mit der Aminosäure verbunden ist, für die das Codon spezifisch ist. Die korrekte Beladung einer tRNA mit der entsprechenden Aminosäure ist deshalb ein Schlüssel für die Genauigkeit der Translation. Diese Aufgaben nehmen Enzyme wahr, die Synthetasen, wobei für jede der 20 Aminosäuren eine Synthetase zuständig ist, die zum einen die Aminosäure erkennt und zum anderen alle tRNAs, die für diese Aminosäure codieren. Das Ribosom hat die Aufgabe, die Abfolge der Codons im richtigen Leserahmen in eine entsprechende Sequenz der Aminosäuren zu übertragen. Dieser Prozess der Translation wird mit einer bemerkenswerten Genauigkeit bei hoher Geschwindigkeit bewältigt: Zehn bis zwanzig Aminosäuren pro Sekunde werden in die wachsende Polypeptidkette von einem Ribosom eingebaut, während ein Fehler bei der Codonerkenntnis etwa alle 3000 Codons eintritt. Um zu verstehen, wie das Ribosom diese erstaunlichen Leistungen vollbringt, ist es notwendig, einen Blick auf die Struktur der Ribosomen zu werfen.

Aus dem Inhalt

1. Die Wunder der Translationswelt	3587
2. Der Pfad der tRNA durch das Ribosom	3590
3. Zusammenfassung und Ausblick	3608

1.1. Gemeinsame strukturelle Merkmale der Ribosomen

Alle Ribosomen bestehen aus zwei ungleich großen Untereinheiten. Bakterielle Ribosomen haben eine relative Sedimentationsgeschwindigkeit von 70S und können in eine große 50S-Untereinheit und eine kleine 30S-Untereinheit getrennt werden. Eukaryotische Ribosomen sind größer: die

der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* z.B. sedimentieren bei 80S und können in eine 60S- und eine 40S-Untereinheit getrennt werden. Jede Untereinheit eines Ribosoms ist ein Ribonucleoproteinpartikel. Im Eubakterium *Escherichia coli* besteht ein Drittel der Masse eines Ribosoms aus Proteinen und die anderen zwei Drittel aus ribosomaler RNA (rRNA). Die 50S-Untereinheit enthält sowohl die 5S-rRNA (120 Nucleotide) als auch die 23S-rRNA (etwa 2900 Nucleotide lang), während die 30S-Untereinheit eine einzige ribosomale RNA enthält, die 16S-RNA mit 1500 Nucleotiden. Die Proteinfraction besteht aus 21 unterschiedlichen Proteinen der kleinen und 33 der großen Untereinheit. Eukaryotische Ribosomen haben längere rRNAs, die durch Insertion zusätzlicher Sequenzen, der Expansionssequenzen (ES), in bestimmte Regionen verlängert werden. Die ES sind zusammen mit 20 bis 30 zusätzlichen ribosomalen Proteinen für den 30-proz. Zuwachs an Größe gegenüber dem *E.-coli*-Ribosom maßgeblich.

Die Gestalt eines 70S-Ribosoms und die seiner Untereinheiten wurden seit 1980 mit unterschiedlichen elektronenmikroskopischen Techniken charakterisiert. Die kleine Untereinheit lässt sich anthropomorphisch durch einen Kopf, einen Hals und einen Körper mit Schultern und Plattform veranschaulichen (Abbildung 1a). Die große ribosomale Untereinheit hat eine kompaktere Struktur, die aus

[*] Prof. Dr. K. H. Nierhaus, Dr. D. N. Wilson
Max-Planck-Institut für molekulare Genetik
Ilhnestraße 73, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-8413-1594
E-mail: nierhaus@molgen.mpg.de

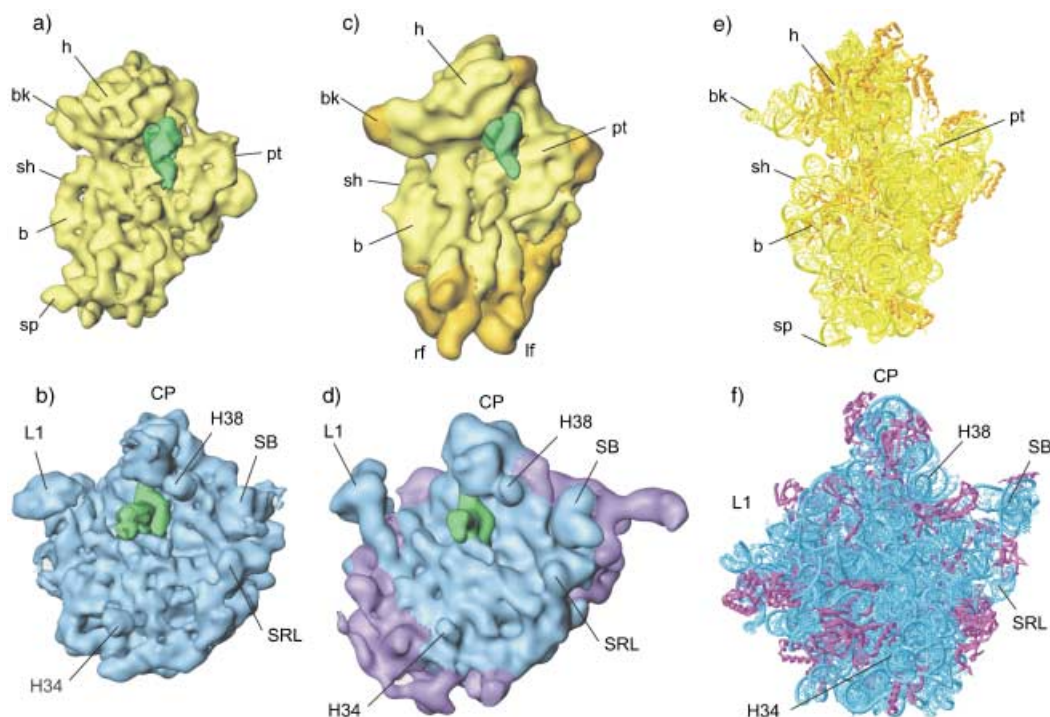
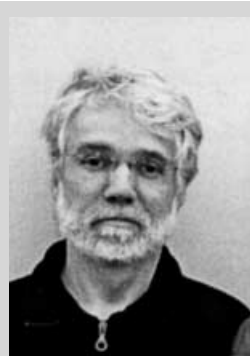


Abbildung 1. Vergleich der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit von Bakterien mit denen eines niedrigeren Eukaryoten. Kryo-EM-Rekonstruktionen der kleinen (a) und großen Untereinheit (b) des Bakteriums *Escherichia coli*, der kleinen (c) und großen Untereinheit (d) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sowie hochaufgelöste Kristallstrukturen der kleinen Untereinheit des Bakteriums *Thermus thermophilus* (e) und der großen Untereinheit der Archaea *Haloarcula marismortui* (f). Die Grenzfläche der Untereinheiten zur anderen Untereinheit wird betrachtet; in den Kryo-EM-Rekonstruktionen ist zusätzlich eine P-tRNA (grün) dargestellt. Zusätzliche Massen der Hefe-80S-Ribosomen, die außerhalb der bakteriellen Ribosomen liegen, sind dunkelgelb (40S-Untereinheit) oder violett (60S-Untereinheit). Orientierungspunkte der kleinen Untereinheit: b, Körper; bk, Schnabel; h, Kopf; lf, linker Fuß; rf, rechter Fuß; pt, Plattform; sh, Schulter; sp, Sporn. Orientierungspunkte der großen Untereinheit: CP, zentraler Höcker; L1, L1-Höcker; SB, Stalk-Basis; St, L7/L12-Stalk; H34, Helix 34; H38, Helix 38; SRL, Sarcin-Ricin-Schleife. Die Kryo-EM-Bilder stammen in leicht veränderter Form von Spahn et al.^[3]

einer runden Basis mit drei Ausläufern besteht, die als L1-Protuberanz, zentrale Protuberanz und L7/L12-Stalk bezeichnet werden (Abbildung 1b). Eine neue Qualität in der Auflösung wurde mit der Einführung der Einzelpartikelrekonstruktion mithilfe von kryoelektronenmikroskopischen Bildern erzielt.^[1] Die allgemeinen strukturellen Merkmale des Ribosoms blieben auch mit der neuen, verbesserten Auflösung erhalten, aber detailliertere Kennzeichen wurden identifiziert, z. B. der Schnabel, die Zehe oder der Sporn der 30S-Untereinheit.

In letzter Zeit erstreckten sich die Kryo-EM-Analysen auch auf die Eukaryotenribosomen und deren Untereinheiten.^[2–5] Diese Rekonstruktionen zeigten ungeachtet der zusätzlichen Größe im Falle von Hefe- und Säugetierribosomen eine ausgesprochen hohe strukturelle Deckung mit ihren bakteriellen Gegenstücken (Abbildung 1c und d). Die Unterschiede, die im Wesentlichen von der zusätzlichen RNA und den Proteinen der Eukaryotenribosomen herrühren (dunklere Partien in Abbildung 1c und d), sind fast ausschließlich an der dem Cytoplasma ausgesetzten Oberfläche zu finden.



Knud H. Nierhaus studierte Medizin und promovierte unter der Anleitung von Prof. Klaus Betke in Tübingen. 1968 wechselte er an das MPI für molekulare Genetik in Berlin. Dort ist er zurzeit Leiter einer Forschungsgruppe, die sich mit unterschiedlichen Aspekten der Translation beschäftigt. Er ist außerplanmäßiger Professor an der Technischen Universität Berlin und Adjunct Professor an der Moskauer Lomonossow Universität. Wichtige Ergebnisse seiner Forschungen umfassen die Entwicklung einer Methode zur Zerlegung und Rekonstitution der großen ribosomalen Untereinheit von *E. coli* und die Entdeckung einer dritten tRNA-Bindungsstelle auf dem Ribosom.



Daniel N. Wilson studierte Biochemie und Molekulare Biologie an der Victoria University in Wellington, Neuseeland, und promovierte in der Arbeitsgruppe von Prof. Warren Tate am Biochemistry Department der University of Otago, Dunedin. In seiner Dissertation beschäftigte er sich mit dem Mechanismus der Translationstermination und recorderender Ereignisse. Nach Abschluss seines Studiums im Jahr 1999 erhielt er ein Alexander von Humboldt-Stipendium. Zurzeit arbeitet er im Labor von Prof. Nierhaus am MPI für molekulare Genetik in Berlin.

Weiteres Merkmal aller Ribosomen ist ein Tunnel, der die große Untereinheit durchzieht; er beginnt am Peptidyltransferase(PTF)-Zentrum an der Seite, die der kleinen Untereinheit gegenüberliegt, und tritt an der Basis der Cytoplasmaseite der großen Untereinheit aus. Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass durch diesen Tunnel die wachsende Polypeptidkette wandert, bevor sie das Cytosol der Zelle erreicht. Der Tunnel hat eine Länge von ungefähr 100 Å und kann zwischen 30 und 35 Aminosäurereste der wachsenden Polypeptidkette aufnehmen.

Falls das Protein für Organellen und Zellkompartimente bestimmt ist, z.B. für das Endoplasmatische Retikulum, Chloroplasten oder Mitochondrien, muss das Ribosom über eine Pore oder einen proteinführenden Kanal an der Oberfläche der Organellenmembran andocken, durch den die wachsende Polypeptidkette dann cotranslational exportiert wird. Ein solcher Komplex von Hefen wurde mit Kryo-EM untersucht. Dabei trug das 80S-Ribosom von *S. cerevisiae* das Porenprotein SEC61, das den Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum betreibt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich die trichterförmige Pore direkt über der Austrittsstelle des Tunnels befindet.^[4–6] Dieser Befund bestätigt die Annahme, dass der Tunnel ein Führungskanal für die wachsende Polypeptidkette ist.

Allein die Gegenwart eines Tunnels in den Ribosomen aller Organismen unterstreicht seine Bedeutung – über die Tunnelfunktion können wir jedoch nur spekulieren. So wird vermutet, dass der Tunnel eine definierte Umgebung für frühe Faltungsschritte der wachsenden Polypeptidkette bereitstellt, oder schlicht einen Schutz gegen Proteasen gewährt, bis hinreichende Proteinfaltung diesen Schutz übernimmt. Der kürzlich gemachte Vorschlag einer aktiveren Rolle für den Tunnel beruht auf der Beobachtung, dass ribosomale Komponenten spezifische Sequenzsignale erkennen und damit Elongation und Termination der Synthese eines Proteins beeinflussen (siehe Übersicht von Tenson und Ehrenberg^[7]).

1.2. Das Ribosom näher betrachtet

In den letzten Jahren wurde eine hohe Auflösung der Kristallstrukturen der kleinen Untereinheit von *Thermus thermophilus* erreicht (3 Å; Abbildung 1e),^[8,9] der großen Untereinheit des Archaeobakteriums *Haloarcula marismortui* (2.4 Å; Abbildung 1f)^[10] und kürzlich der großen Untereinheit des mesophilen Eubakteriums *Deinococcus radiodurans* (3.1 Å).^[11] Einige ausgezeichnete Übersichten, die diese Strukturen mit dem umfangreichen Wissen über funktionelle Aspekte der Proteinsynthese in Beziehung setzten, folgten kurz danach.^[12,13]

Mit den hochaufgelösten Strukturen war es möglich, die Kennzeichen der schlecht aufgelösten Ribosomenstruktur mit bestimmten RNA-Helices und/oder ribosomalen Proteinen zu korrelieren. Zum Beispiel wird der Schnabel der kleinen Untereinheit ausschließlich von der Helix h33 gebildet, der Sporn von h6 und die zentrale Protuberanz von der 5S-rRNA, Teilen der 23S-rRNA sowie den ribosomalen Proteinen L5, L18, L25 und L33. Eine detaillierte

Analyse der Untereinheitenstrukturen offenbarte deutliche Unterschiede hinsichtlich der Beziehung der Domänen der rRNA-Struktur zu den tertiären Domänen. In der 30S-Untereinheit kann die rRNA auf einfache Weise den tertiären Domänen zugeordnet werden: Beispielsweise bildet die 5'-Domäne der 16S-RNA den Körper und den Zeh einschließlich der Schulter der 30S-Untereinheit, die mittlere Domäne bildet die Plattform und die große 3'-Domäne den Kopf, während schließlich die kleine 3'-Domäne der Länge nach die Oberfläche der kleinen Untereinheit durchmisst, und zwar auf der Seite, die der großen Untereinheit gegenüber liegt. Im Unterschied dazu ist die 50S-Untereinheit ein kompliziertes Geflecht der Sekundärstruktur-Domänen, was vielleicht ein Hinweis darauf ist, dass die 50S-Untereinheit – in evolutionären Maßstäben gemessen – älter ist als die kleine Untereinheit und damit einen größeren Zeitraum zur Verfügung hatte, eine solch komplexe Domänenorganisation zu entwickeln.^[14] Eine weitere, nicht notwendigerweise alternative Möglichkeit ist, dass die 30S-Untereinheit vielleicht mehr Flexibilität verlangt, um ihre Funktionen zu erfüllen.

Mit der Kristallstruktur der ribosomalen Untereinheiten wurden auch 20 neue und vollständige Strukturen ribosomaler Proteine für die kleine^[8] und große ribosomale Untereinheit^[10] erschlossen. Ein spezielles Merkmal vieler dieser Proteine ist ihre eigentümliche Struktur, die aus einer globulären Domäne, die normalerweise an der Oberfläche der Untereinheit zu liegen kommt, sowie aus einem langen fadenförmigen Teilstück besteht, das sich weit in die Ribosomenmitte, den ribosomalen RNA-Kern, hineinzieht. Ribosomale Proteine binden häufig an die Verbindungsstücke von rRNA-Helices und verknüpfen auf diese Weise verschiedene Domänen. Nach einer umfassenden Analyse der Protein-RNA-Wechselwirkungen innerhalb der kleinen Untereinheit sind die globulären Proteine in einem frühen Stadium des Aufbauprozesses der Ribosomen beteiligt, während die Proteine mit den langen fadenförmigen Ausdehnungen zumeist später auftreten.^[15]

Eine der großen Überraschungen der Kristallstrukturen war, dass trotz einer Verzehnfachung der Zahl der bekannten RNA-Strukturen fast alle Motive der Sekundärstruktur schon bekannt waren, was darauf hindeutet, dass die Zahl der RNA-Motive deutlich limitiert ist. Ein gemeinsames Merkmal des Ribosoms ist die helicale Natur der rRNA. Regionen, die als Einzelstrang-Schleifen vorhergesagt worden sind, erschienen als leicht irregulär doppelhelicale Verlängerungen von benachbarten Helices in der Kristallstruktur. Des Weiteren scheinen häufig die Enden helicaler Regionen aufeinander gestapelt zu sein und damit lange, gleichsam kontinuierliche helicale Strukturen zu bilden. Innerhalb dieser helicalen Regionen ist der Anteil der Adeninreste signifikant unterrepräsentiert (Tabelle 1).^[16] Dies lässt auf eine essenzielle Rolle von Adenin schließen, die in funktioneller und struktureller Hinsicht auch tatsächlich bestätigt wurde. Die Adeninreste sind die Hauptakteure beim „A-minor“-Motiv, einem häufig auftretenden Merkmal der Ribosomen, das wichtig für die Stabilisierung von rRNA-Tertiärstrukturen ist.^[17] Im Allgemeinen vermittelt ein „A-minor“-Motiv eine Wechselwirkung zwischen einem Adeninrest und der kleinen Furche einer RNA-Helix. Eine derartige Wechselwirkung

Tabelle 1: Häufigkeit und Verteilung der Ribonucleotide innerhalb der Sekundärstrukturmodelle bakterieller 16S- und 23S-rRNAs.^[a]

Nucleotid	G	C	A	U
Gesamthäufigkeit	31.4	22.4	25.7	20.5
Verteilung innerhalb helicaler Regionen	36.6		14.5	
Häufigkeit innerhalb ungepaarter Regionen		12.5	42.6	
Verteilung innerhalb ungepaarter Regionen	30.1	22.3	66.2	41.5
Verhältnis ungepaart/gepaart	0.43	0.29	1.96	0.71

[a] Daten nach Gutell et al.^[16]

wird nicht nur im Ribosom gefunden, sondern wurde früher schon in *Tetrahymena* und dem Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym beobachtet.^[18] Vier Varianten dieses Motivs wurden im Ribosom identifiziert.^[17] Zwei davon, Typ 1 und Typ 2, spielen eine zentrale Rolle hinsichtlich der ribosomalen Funktion, denn sie sind in der Decodierung der genetischen Information und der Peptidbildung involviert. Da die Adeninreste, die an diesen Prozessen beteiligt sind, universell konserviert sind, ist sowohl der Mechanismus der Decodierung als auch der der Peptidbindung in Prokaryoten und Eukaryoten konserviert. Die Einzelheiten dieser Wechselwirkungen werden in den Abschnitten 2.2.2 und 2.3.3 gründlicher diskutiert.

2. Der Pfad der tRNA durch das Ribosom

Die Decodierungsstelle befindet sich auf der kleinen Untereinheit. Hier werden die Codons der mRNA erkannt und mithilfe des komplementären Anticodons auf der tRNA entziffert. Drei Stellen (die A-, P- und E-Stelle) hat das Ribosom für die Bindung der tRNAs zur Verfügung (Abbildung 2): In die A-Stelle bindet die neue Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) entsprechend des Codons, das an dieser Stelle exponiert ist. Die aa-tRNA bringt die neue Aminosäure, um die die wachsende Polypeptidkette verlängert wird, zum Ribosom. In der P-Stelle befindet sich die Peptidyl-tRNA vor der Bildung der Peptidbindung. Der Peptidylrest ist die bis dahin synthetisierte Polypeptidkette. Die E-Stelle schließlich ist die Austrittsstelle der desacylierten oder entladenen tRNA. Während der Translation wandert eine tRNA sequenziell durch jede dieser Stellen; sie startet in der A-Stelle, passiert dann die P-Stelle und erreicht schließlich die E-Stelle, bevor sie das Ribosom verlässt. Eine Ausnahme ist die erste tRNA, die bei der Synthese eines Proteins gebunden wird (die Initiations-tRNA): Sie bindet direkt in die P-Stelle (Abbildung 2a).

Die Initiator-tRNA decodiert das Startcodon, zumeist AUG, und trägt die Aminosäure Formylmethionin in Bakterien oder Methionin in Eukaryoten (einschließlich Archaea). Das Codon, das dem Startcodon folgt, befindet sich in der A-Stelle und bestimmt, welche aa-tRNA als nächste gebunden werden soll (Abbildung 2b). Die aa-tRNA wird in Form eines

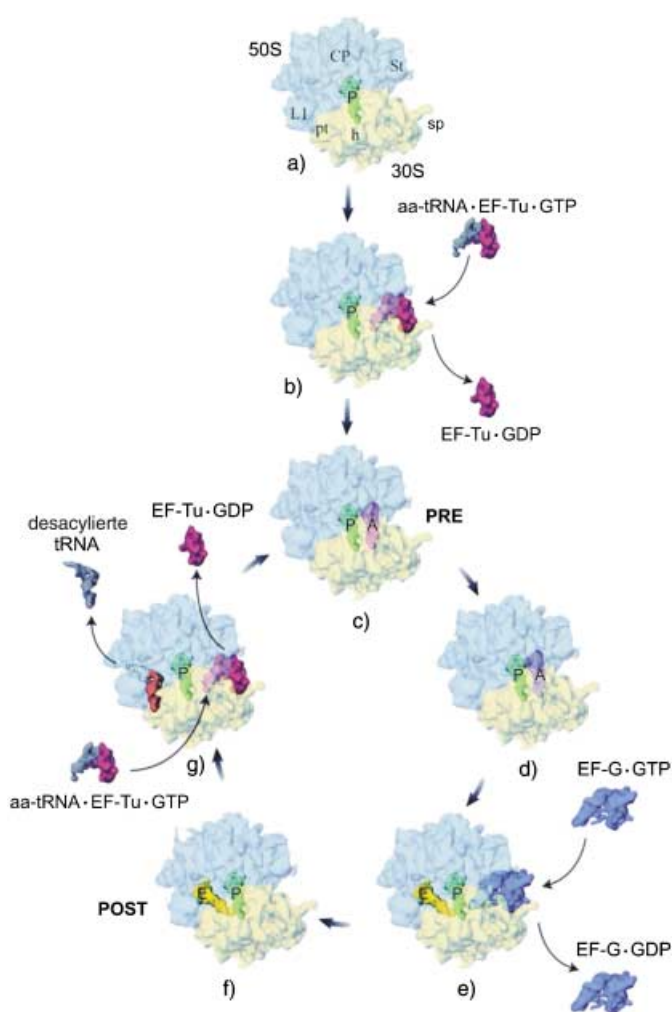


Abbildung 2. Überblick über den Translationszyklus. Durch systematische Kryo-EM-Studien wurden die Positionen der tRNA und der Elongationsfaktoren auf dem 70S-Ribosom in unterschiedlichen Stadien des Elongationszyklus bestimmt (siehe Lit. [19], zit. Lit.). Die kleine 30S-Untereinheit ist gelb, die große 50S-Untereinheit blau dargestellt. Die Positionen ribosomaler Elongationsfaktoren wurden auf ein 3D-Modell des Ribosoms mit 11.5-Å-Auflösung übertragen, um einen schematischen Überblick über den Elongationszyklus zu erhalten. Details sind im Text besprochen. Wiedergabe nach Agrawal et al.^[19]

ternären Komplexes in die A-Stelle geliefert, der aus einem Elongationsfaktor (EF-Tu in Bakterien und EF1α in Eukaryoten), GTP und der aa-tRNA besteht. Nach der GTP-Hydrolyse verlässt der binäre Komplex EF-Tu·GDP das Ribosom und die aa-tRNA dockt in die A-Stelle ein (Abbildung 2c). Der nächste Schritt ist die Bildung der Peptidbindung, wobei der Peptidylrest der P-tRNA auf den Aminoacylrest der A-tRNA übertragen wird. Somit ist der Gesamtprozess als Übertragung der Polypeptidkette auf die neue Aminosäure zu verstehen, und nicht als eine Addition der neuen Aminosäure an die Kette. Die Peptidbindung wird im PTF-Zentrum der großen Untereinheit gebildet. Die Bildung der Peptidbindung hat keine signifikante Veränderung der Positionen der beiden tRNAs zur Folge (Abbildung 2d), obwohl die P-Stelle jetzt eine entladene oder unbeladene tRNA und die A-Stelle eine Peptidyl-tRNA enthält.

Die nun folgende Bewegung des tRNA₂-mRNA-Komplexes auf dem Ribosom (die Translokation) wird durch einen anderen Elongationsfaktor angetrieben (EF-G in Bakterien (Abbildung 2e) und EF2 in Eukaryoten). Im Wesentlichen ist die Rolle der Elongationsfaktoren auf die Beschleunigung des Elongationszyklus beschränkt, der damit eine Geschwindigkeit von 50 ms pro Elongationszyklus *in vivo* erreichen kann. Ohne Elongationsfaktoren ist die Geschwindigkeit mehr als vier Größenordnungen niedriger,^[20] was auf der hohen Energiebarriere (120 kJmol⁻¹ in *E.-coli*-Ribosomen) zwischen dem prä- und dem posttranslokationalen Zustand (PRE bzw. POST; Abbildung 2c und f) beruht.^[21] Die Translokation schiebt die desacylierte tRNA in die E-Stelle und die peptidylierte tRNA in die P-Stelle, während die A-Stelle für die Bindung der nächsten aa-tRNA freigemacht wird (Abbildung 2f). Die Bindung der nächsten A-tRNA ist mit der Freisetzung der E-tRNA gekoppelt (Abbildung 2g). Auf diese Weise wiederholt sich der Zyklus (d.h., er beginnt wieder bei Abbildung 2c) bis ein Stoppcodon in der A-Stelle erscheint. An diesem Punkt entlässt ein Funktionsgeflecht von Terminationsfaktoren die vollständige Polypeptidkette, dissoziiert das Ribosom in seine Untereinheiten und macht sie damit bereit für den nächsten Translationszyklus.

2.1. Initiation der Proteinsynthese: Assoziation und Verbrückung der ribosomalen Untereinheiten

Die Translation von funktionell aktiven Proteinen verlangt, dass die mRNA auf der 30S-Untereinheit so positioniert ist, dass als erstes Codon das Startcodon gelesen werden kann. Eine Initiation vor oder nach dem Startcodon würde entweder verlängerte oder gekürzte Proteine erzeugen, die inaktiv sein können. Ferner muss das Startcodon in einem korrekten Leserahmen platziert werden. Da ein Codon aus drei Nucleotiden besteht, kann sonst der Fall eintreten, dass die mRNA unter Verlust der genetischen Information in einem inkorrekten Leserahmen auf der kleinen Untereinheit positioniert wird. Wir sehen, dass die Präzision und Spezifität der Initiationsphase essenziell für die Lebensfähigkeit einer Zelle ist.

Auf welche Weise nun selektioniert das Ribosom das korrekte Startcodon und stellt die Spezifität der Wechselwirkung mit der Initiations-tRNA sicher? Tatsächlich gibt es keine einfache Antwort auf diese Frage, da der Initiationsprozess ausgesprochen variantenreich ist. In den meisten Fällen jedoch wird die nichttranslatierte Region (UTR) stromaufwärts von dem Startcodon der mRNA hinzugezogen, um die mRNA auf der kleinen Untereinheit zu platzieren. In Bakterien ist der Mechanismus relativ einfach; er schließt einen Strang von Nucleotiden ein (die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD)), der mit der komplementären Sequenz des 3'-Endes der 16S-RNA (der Anti-SD-Sequenz) in Wechselwirkung tritt. Kürzlich konnte diese Wechselwirkung anhand der Fourier-Differenzkarte des 70S-Ribosoms und des mRNA-Ribosoms direkt identifiziert werden.^[22]

In Eukaryoten ist die Situation weitaus komplizierter. Im Wesentlichen ist hier das 5'-Ende der Eukaryoten-mRNA beteiligt, das mit einer Guanin enthaltenden „Cap“-Struktur modifiziert ist. Die Cap-Struktur wird von spezifischen

Initiationsfaktoren erkannt, die sowohl die Bindung der mRNA als auch die der Initiator-Met-tRNA an die 40S-Untereinheit bestimmen. Die mRNA wird dann stromabwärts (in 3'-Richtung) abgetastet, bis das erste AUG-Codon gefunden wird, das automatisch als Startcodon fungiert. Jetzt kann die große Untereinheit binden und damit die Proteinsynthese beginnen. In seltenen Fällen enthält die UTR der mRNA stabile Sekundärstrukturen, die von großen heteromeren Proteinkomplexen erkannt und gebunden werden. Einige dieser Proteinfaktoren wechselwirken direkt mit der 40S-Untereinheit und vermitteln die genaue Platzierung der mRNA (Näheres dazu in der Übersicht von Pestova et al.^[23]).

Trotz dieser Unterschiede zwischen der Translationsinitiation in Bakterien und Eukaryoten bestehen doch zahlreiche Analogien.^[24] Zum Beispiel sind bei der Bildung des Initiationskomplexes sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten eine mRNA und die Initiator-tRNA beteiligt, die an die kleine Untereinheit binden, sodass die Initiator-tRNA in der P-Stelle der kleinen Untereinheit erscheint. Dies ist typisch für die Initiation, da in allen folgenden Bindungen eine aa-tRNA über die A-Stelle in das Ribosom gelangt. Wie in Abschnitt 2.2.2 dargelegt, ist es die Codon-Anticodon-Wechselwirkung in der A-Stelle, die vom Ribosom sorgfältig geprüft wird und damit die Genauigkeit der Translation sicherstellt. Die Initiation umgeht diesen wichtigen Prüfungsschritt, indem sie eine direkte P-Stellen-Bindung der Initiator-tRNA ermöglicht.

Wie stellt nun das Ribosom sicher, dass die korrekte tRNA an das Startcodon gebunden und dieses genau in der P-Stelle platziert wird? Eine Reihe spezifischer Initiationsfaktoren gewährleistet die Genauigkeit der P-Stellen-Bindung während der Initiation. In Bakterien wird dieser Prozess durch drei Initiationsfaktoren, IF1, IF2 und IF3, gesteuert (siehe Übersicht von Gualerzi et al.^[25]). Kristallstrukturen von Ribosomenkomplexen, die Proteintranslationsfaktoren tragen, wurden bislang nur in zwei Fällen gelöst, und zwar vom Komplex mit dem Initiationsfaktor IF1 und mit einer Domäne von IF3.^[26,27]

IF3 ist vermutlich der erste Initiationsfaktor, der an die kleine Untereinheit bindet. Er hat zwei Funktionen: Zunächst wirkt er als Antiassoziationsfaktor, d.h., er verhindert die Bildung von 70S-Ribosomen, indem er die Assoziation von 30S-Untereinheiten mit 50S-Untereinheiten hemmt. Des Weiteren spielt er eine wichtige Rolle in der Überprüfung der Codon-Anticodon-Genauigkeit in der ribosomalen P-Stelle. IF3 setzt sich aus zwei Domänen zusammen, die durch einen langen lysinreichen Peptidstrang verbunden sind. Die C-terminale Domäne (CTD) ist sowohl für die Ribosomenbindung als auch für die Verhinderung der Assoziation mit der großen Untereinheit zuständig, während die N-terminale Domäne (NTD) mit der zweiten Funktion in Verbindung gebracht wurde. Die Kristallstruktur der CTD auf der 30S-Untereinheit wurde aufgeklärt; auch ein Andocken der NTD ist den Untersuchungen zufolge möglich.^[27] Die Position der Bindestelle der CTD von IF3 lässt darauf schließen, dass die Antiassoziationsfunktion dieser Domäne auf einer Konformationsänderung beruht, und nicht wie zuvor vermutet auf einer direkten sterischen Hemmung. Des Weiteren wurde vorgeschlagen, dass die korrekte Codon-

Anticodon-Wechselwirkung der NTD in der P-Stelle nicht durch unmittelbare Wechselwirkung, sondern durch Einschränkung des zur Verfügung stehenden Raumes vermittelt wird, sodass auf diese Weise nur eine einzige korrekte Codon-Anticodon-Orientierung möglich ist.^[27]

Gemäß jüngsten Ergebnissen aus Footprinting-Experimenten bindet IF3 im Widerspruch zum geschilderten Modell in der Weise an die 30S-Untereinheit, dass die CTD direkt die Untereinheitenassoziation inhibiert.^[28] Dies wirft die Frage auf, ob IF3 möglicherweise zwei Bindestellen auf der 30S-Untereinheit hat: eine auf der 30S-Untereinheit, die für den Antiassoziationseffekt und die Überprüfung der Codon-Anticodon-Wechselwirkung in der P-Stelle maßgeblich wäre, und eine auf dem 70S-Ribosom, bevor es in seine Untereinheiten dissoziiert.

Obwohl IF1 eine eindeutige Bindestelle auf dem Ribosom einnimmt, ist seine genaue Funktion bislang unklar. Die geringe Größe von IF1 (unter 10 kDa) ermöglichte die Tränkung von 30S-Kristallen mit dem Faktor.^[26] IF1 wurde in der A-Stelle gefunden, was vermuten lässt, dass er eine A-Stellen-Bindung durch die Initiator-tRNA verhindert. Es wurde allerdings gezeigt, dass auch faktorfreie 30S-Untereinheiten die tRNA ausschließlich in die P-Stelle in Gegenwart einer geeigneten mRNA binden,^[29] sodass eine zusätzliche Überprüfungsfunktion nicht notwendig erscheint. Die Bindung von IF3 induziert weiträumige Konformationsänderungen auf der der großen Untereinheit zugewandten Oberfläche; insbesondere ist die Helix h44 der 30S-Untereinheit betroffen, die zusammen mit IF3 für die Assoziation der Untereinheit eine Rolle spielt.^[26] Bakterielle IF2 bindet spezifisch die Initiator-tRNA und dirigiert sie zu der 30S-Untereinheit. Die Übergabe der Initiator-tRNA von IF2 an die kleine Untereinheit wird von IF1 begünstigt. Interessanterweise enthält die zentrale Region des Eukaryoteninitiationsfaktors eIF1A ein Motiv, das identisch mit dem in Faktor IF1 ist (OB-Faltungsmotiv),^[30] was auf eine analoge Bindung in die A-Stelle der 40S-Untereinheit schließen lässt. Faktoren, die zu dem bakteriellen IF2 homolog sind, wurden sowohl in Eukaryoten (eIF5b) als auch in Archaea (aIF5b) nachgewiesen. Für beide wurde gezeigt, dass sie direkt mit dem eukaryotischen eIF1a wechselwirken (siehe Übersicht von Pestova et al.^[23] für Details). Die Assoziation des 43S-Präinitiationskomplexes mit der 60S-Untereinheit wird von dem Faktor eIF5b stimuliert. Es wird angenommen, dass die Assoziation der kleinen und der großen Untereinheit zu einer ribosomalen Konformationsänderung führt, die die Hydrolyse von GTP durch IF2 oder eIF5b und die Freisetzung dieser Faktoren vom Ribosom auslöst.

Eine Anzahl von Kontaktpunkten zwischen der kleinen und der großen Untereinheit (Untereinheitsbrücken) wurde in den bakteriellen 70S-Ribosomen identifiziert (Abbildung 3 a,b).^[31,32] Die funktionelle Bedeutung dieser Untereinheitsbrücken wird dadurch unterstrichen, dass entsprechende Brücken in dem Eukaryoten-80S-Ribosom gefunden worden sind (Hefe; Abbildung 3 c und d).^[3] Diese Brücken scheinen nicht nur für die Assoziation der ribosomalen Untereinheiten wichtig zu sein, sondern spielen wahrscheinlich auch eine bedeutende Rolle bei der Bewegung der tRNAs durch das Ribosom (siehe Abschnitt 2.4) sowie bei

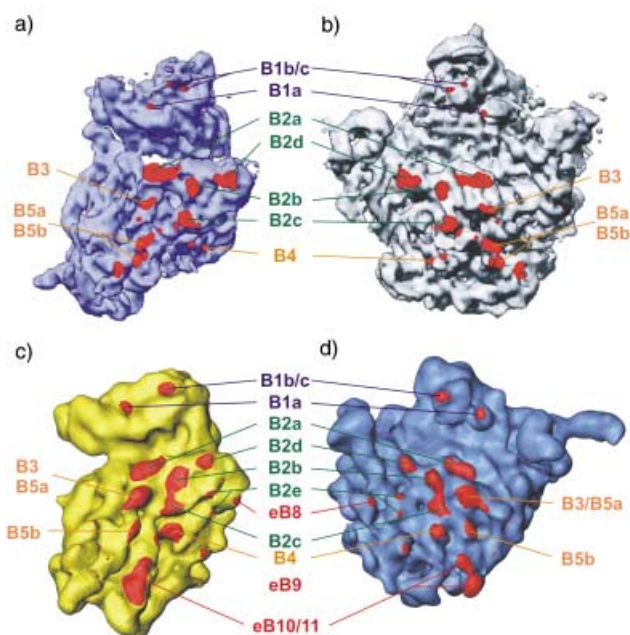


Abbildung 3. Vergleich der Brückenpositionen zwischen den Untereinheiten von bakteriellen und Heferibosomen; es sind jeweils die Grenzflächen zur benachbarten Untereinheit gezeigt. a, b) Ribosomale 30S- (blau) und 50S-Untereinheiten (grau) von *Thermus thermophilus*; die Brücken sind rot markiert und entsprechend der Nomenklatur von Gabashvili et al. bezeichnet.^[31] Die Brücken B1, B2 und B3–B5 sind blau, grün bzw. orangefarben beschriftet. Wiedergabe nach Cate et al.^[32] c, d) Ribosomale 40S- (gelb) und 60S-Untereinheit (blau) von *Saccharomyces cerevisiae*; die Brücken sind rot markiert. Brücken, die denen von *Thermus thermophilus* entsprechen, sind blau (B1), grün (B2) und orangefarben (B3–B5) beschriftet, zusätzliche Brücken in den Heferibosomen (eB8–eB11) rot. Aus Gründen der Übersicht sind die Brücken B6 und B7 nicht gezeigt. Wiedergabe nach Spahn et al.^[3]

der Signalübermittlung zwischen dem Decodierungszentrum auf der kleinen Untereinheit und dem PTF-Zentrum auf der großen Untereinheit. Gemäß einer näheren Untersuchung des bakteriellen und des Heferibosoms sind mehrere dieser Brücken, nämlich B2a, B3, B5a und B5b, an Wechselwirkungen mit der 30S-Helix h44 beteiligt, die wiederum bei der Decodierung und der Assoziation der Untereinheiten eine Rolle spielt.

2.2. Die A-Stelle: Decodierung, molekulare Mimikry und Wechselwirkung mit Antibiotika

Außer bei der Initiation ist die ribosomale A-Stelle der Eintrittsort für eine beladene aa-tRNA. An dieser Stelle muss das Ribosom entscheiden, ob die ankommende tRNA korrekt bezüglich des in der A-Stelle vorliegenden Codons ist oder nicht, d. h., ob diese tRNA in der A-Stelle akzeptiert oder zurückgewiesen werden soll. Die molekularen Details dieses Entscheidungsprozesses wurden kürzlich geklärt und bestätigten eine zwanzig Jahre alte Hypothese.^[33a] Die A-Stelle ist Teil der Bindestelle der Elongationsfaktoren. Auf allen Stufen der Proteinsynthese – Initiation, Elongation und Termination – wechselwirken Translationsfaktoren mit der

ribosomalen A-Stelle. Für eine Reihe dieser Translationsfaktoren wurden die Strukturen außerhalb des Ribosoms aufgeklärt. Teile dieser Strukturen sind erstaunlich deckungsgleich zueinander und, was noch wichtiger ist, zu der tRNA, dem „wahren“ Substrat der A-Stelle. Dieses Phänomen, die strukturelle Nachahmung eines A-tRNA-Substrats durch einen Proteinfaktor, ist ein Beispiel für molekulare Mimikry, ein häufig wiederkehrendes Charakteristikum bei der Translation (siehe die Übersicht von Nissen et al.^[34]), dessen umfassende Bedeutung bereits unter Beweis gestellt wurde. Leider existieren bis heute noch keine Ribosomenkristallkomplexe mit Elongations- oder Terminationsfaktoren. Ein Grund ist möglicherweise die Größe der Translationsfaktoren (40–80 kDa), die einfache Einweichexperimente verhindert und stattdessen die Anwendung von Kryo-Elektronenmikroskopie erfordert. Deshalb stammt unsere heutige Strukturinformation zu diesen Komplexen aus Kryo-EM-Studien. Die Einweichtechnik ist dagegen bei kleinen Liganden, z. B. Antibiotikamolekülen, in ribosomalen Kristallen sehr erfolgreich. Die Decodierungsstelle ist Angriffspunkt für eine Reihe von wirksamen Translationshemmern. Die Strukturen dieser Antibiotika, darunter Tetracycline, Paromomycin, Streptomycin, Hygromycin und Spectinomycin, sind mit atomarer Auflösung in Komplexen mit 30S-Untereinheiten gelöst worden.

2.2.1. Das generelle Problem der Aminoacyl-tRNA-Selektion

Sobald die Initiationsfaktoren das Ribosom verlassen haben, trägt das Ribosom nur eine aa-tRNA, und zwar in der P-Stelle. Das Codon in der benachbarten A-Stelle ist nur für eine bestimmte tRNA mit dem entsprechenden komplementären Anticodon, die cognate tRNA, spezifisch. Jedoch gibt es eine große Zahl anderer tRNA-Kompetitoren, die den Selektionsprozess stören können: 41 tRNAs mit unterschiedlichen Anticodons existieren in dem Bakterium *Escherichia coli* und noch einige mehr in den eukaryoten Zellen. Das Selektionsproblem wird dadurch verschärft, dass drei bis fünf oder sechs dieser tRNAs (bezeichnet als nah-cognate tRNAs) ein Anticodon tragen, das dem der cognaten tRNA weitgehend ähnelt. Die übrigen etwa 90 % tRNAs haben kein ähnliches Anticodon und werden deshalb als nichtcognate tRNAs bezeichnet. Das Problem der Selektion wird weiter dadurch erschwert, dass die aa-tRNA in Form des ternären Komplexes in die A-Stelle bindet, d. h. in einem Komplex mit dem Elongationsfaktor EF-Tu und GTP. Das Ribosom muss deshalb zwischen relativ großen ternären Komplexen (72 kDa) unterscheiden, die wegen der zahlreichen Berührungspunkte eine große Bindefläche zum Ribosom haben, während für die Unterscheidung (Diskriminierung) nur ein Bruchteil dieser Bindefläche, das Anticodon (1 kDa), genutzt werden kann.

Dieses Verhältnis von großer Bindefläche und kleiner Diskriminierungsfläche kann direkt auf die entsprechenden Energien projiziert werden: Die Bindung wird dominiert durch eine große freie Bindungsenergie, sodass nur ein kleiner Anteil in Form von Diskriminierungsenergie zur Verfügung steht. Das ungewöhnliche molekulare Selektionsproblem des Ribosoms besteht darin, dass der riesige Anteil

der Bindungsenergie bei den 41 unterschiedlichen ternären Komplexen (*E. coli*) identisch ist, und die Diskriminierung auf dem winzigen Bruchteil der Diskriminierungsenergie beruht. Das Unterscheidungspotential der Diskriminierungsenergie kann nur unter Gleichgewichtsbedingungen genutzt werden. Das bedeutet, dass wegen der großen Bindungsenergie das Gleichgewicht erst nach einer relativ langen Zeit erreicht werden kann – in anderen Worten muss der Prozess langsam sein, wenn er genau sein will.

Da wir wissen, dass die Proteinsynthese ein relativ schneller und akkurater Prozess ist, muss das Ribosom dieses Problem irgendwie lösen. Aber wie? Hierzu wurde ein Modell vorgeschlagen, demzufolge die A-Stellen-Besetzung in zwei aufeinander folgenden Schritten erfolgt: einem Decodierungsschritt und nachfolgend einem Akkomodationsschritt (siehe Übersicht in Lit. [35]). Während des Decodierungsschrittes befindet sich die A-Stelle in einem niedrigen Affinitätszustand, der die Wechselwirkung des ternären Komplexes im Wesentlichen auf Codon-Anticodon-Wechselwirkungen reduziert und damit die allgemeinen Kontakte der tRNA außerhalb des Anticodons sowie des Elongationsfaktors EF-Tu mit dem Ribosom ausschließt. Indem die Bindungsfläche des ternären Komplexes auf die Diskriminierungsfläche eingeschränkt wird, d. h. auf das Anticodon, ist die nun in Betracht zu ziehende Bindungsenergie klein und mehr oder minder identisch mit der Diskriminierungsenergie. Weil die Bindungsenergie klein ist, kann sich das Gleichgewicht rasch einstellen, was zudem die Genauigkeit der Reaktion sicherstellt. Der zweite Schritt, die Akkomodation in die A-Stelle, verlangt die Freisetzung der aa-tRNA aus dem ternären Komplex zur Bindung in die A-Stelle. Dieser Schritt nutzt die nichtdiskriminatorische Bindungsenergie, um die tRNA präzise in die A-Stelle und den anhängenden Aminoacylrest in das PTF-Zentrum der großen Untereinheit zu positionieren und so eine Peptidbindung zu ermöglichen. Wir werden später sehen, dass die Akkomodation der aa-tRNA in die A-Stelle von der Entlassung der E-tRNA begleitet ist. Augenscheinlich liegt diesem zweiten Schritt der A-Stellen-Bindung eine größere Konformationsänderung des Ribosoms zugrunde,^[21] weshalb es sich vermutlich um einen gegenüber dem Decodierungsschritt langsamen Prozess handelt. Die A-Stellen-Bindung ist demnach ein gekoppelter Prozess aus einem schnellen Initiations- oder Decodierungsschritt und einem langsamen Akkomodationsschritt. Dies hat die wichtige Konsequenz, dass der erste Schritt unter Gleichgewichtsbedingungen abläuft, selbst wenn sich das gesamte System im Fließgleichgewicht befindet. Der Gesamtprozess – ein schneller Decodierungsschritt mit nachfolgendem langsamen Akkomodationsschritt – nutzt somit das Diskriminierungspotential von Codon und Anticodon effizient und bei hoher Proteinsynthesegeschwindigkeit.

Kürzlich wurde der erste Schritt der A-Stellen-Bindung (niedrige A-Stellen-Affinität) durch Kryo-EM untersucht, wobei der ternäre Komplex in der A-Stelle mit dem Antibiotikum Kirromycin blockiert wurde.^[36,37] Kirromycin lässt zwar die GTP-Hydrolyse von EF-Tu zu, blockiert aber die darauffolgende Konformationsänderung von EF-Tu in die GDP-Konformation und damit die Dissoziation vom Ribosom. Die Kryo-EM-Rekonstruktion lässt vermuten, dass die

Anticodon-Stammschleife (ASL) innerhalb des ternären Komplexes um etwa 40° abgewinkelt ist, was eine Codon-Anticodon-Wechselwirkung zulässt, während die übrige tRNA noch nicht in der A-Stelle angekommen ist (siehe Abbildung 2b).^[36]

Wie schon angedeutet, ist die Akkomodation einer aa-tRNA in die A-Stelle von der Dissoziation von EF-Tu·GDP vom Ribosom begleitet, einem Prozess, der wiederum mit der vorhergehenden Hydrolyse von GTP gekoppelt ist. Deshalb ist der Befund bemerkenswert, dass in *Escherichia coli* bis zu zwei GTP beim Einbau einer cognaten tRNA und bis zu sechs GTP beim Einbau einer nah-cognaten tRNA hydrolysiert werden, während nichtcognate tRNAs nicht in der Lage sind, die EF-Tu-abhängige GTP-Hydrolyse auszulösen.^[38] Dies ist ein weiterer wichtiger Beleg dafür, dass die tRNA-Selektion im Wesentlichen durch die Erkennung der Codon-Anticodon-Wechselwirkung im ersten Bindungsschritt dominiert wird. Die nächste naheliegende Frage lautet: Wie werden cognate und nah-cognate tRNAs unterschieden? Diese Frage kann, wie im nächsten Abschnitt 2.2.2 beschrieben, auf molekularer Ebene beantwortet werden.

2.2.2. Decodierung einer Aminoacyl-tRNA

Vor zwanzig Jahren schlug Potapov ein Modell für die Unterscheidung von cognaten und nah-cognaten aa-tRNAs vor.^[33a] Nach diesem Modell erkennt das Decodierungszentrum des Ribosoms den Anticodon-Codon-Duplex, d.h., es wird die stereochemische Korrektheit der Watson-Crick-Basenpaarung sowie die korrekte Lage des Phosphat-Zucker-Rückgrats innerhalb dieser Struktur überprüft. Diese Hypothese wurde mit einer mRNA getestet, die ein einziges DNA-Codon innerhalb des RNA-Kontextes enthält.^[33b] Falls die Stabilität der Basenpaare, d.h. die der Wasserstoffbrücken zwischen den Codon- und Anticodonbasen der Watson-Crick-Paare, ausschlaggebend für den Erkennungsschritt ist, sollte eine 2'-Desoxybase innerhalb des Codons den Decodierungsprozess nicht beeinträchtigen. Wird jedoch die stereochemische Korrektheit der Basenpaarung unter Beteiligung der Position des Zuckerrestes getestet, sollte eine 2'-Desoxybase den Decodierungsprozess stören. Das Ergebnis dieser Studien war, dass ein Desoxycodon in der A-Stelle verheerend für die tRNA-Bindung in diese Stelle war, während ein Desoxycodon in der P-Stelle die tRNA-Bindung in diese Stelle nicht beeinflusste. Damit konnten vormalige Ergebnisse erklärt werden, nach denen eine DNA nicht die Funktion einer mRNA übernehmen kann (siehe Potapov et al.^[33b] zit. Lit.).

Kürzlich konnten die Komponenten des Ribosoms, die an der Decodierung beteiligt sind, kristallographisch bei 3.1 Å Auflösung direkt identifiziert werden.^[39] Die 30S-Untereinheiten von *Thermus thermophilus* ist in dem Kristall so angeordnet, dass der Sporn (h6) einer Untereinheit in die P-Stelle der benachbarten ragt und auf diese Weise eine Anticodon-Stammschleife einer P-tRNA imitiert. Eine zweite Überraschung war, dass das 3'-Ende der 16S-RNA die Rolle der mRNA für das P-tRNA-Imitat übernimmt und sich bis in das Decodierungszentrum erstreckt. Damit nimmt diese 30S-Untereinheit eine Konformation ein, wie sie inner-

halb eines 70S-Ribosoms vorliegt, womit es Ramakrishnan et al. gelang, in dem Kristall ein ASL-Fragment (ASL-tRNA) in die A-Stelle und ein komplementäres Hexanucleotid zu binden und auf diese Weise die Decodierung einer aa-tRNA zu untersuchen.^[39]

Die Bindung einer mRNA und einer cognaten aa-tRNA induziert zwei größere Umordnungen des ribosomalen Decodierungszentrums. Dabei drehen sich die universell konservierten Reste A1492 und A1493 aus der internen Schleife von h44 heraus, während die universell konservierte Base G530 von einer *syn*- in eine *anti*-Konformation wechselt. Durch diesen Prozess kann A1493 die kleine Furche des ersten Basenpaares der Codon-Anticodon-Helix in der A-Stelle erkennen. Das erste Basenpaar zwischen ASL-tRNA und der mRNA besteht aus Position A36 und U1 in Abbildung 4a, und die Erkennung erfolgt über das „A-minor“-Motiv vom Typ I. An der Erkennung sind drei Wasserstoffbrücken beteiligt, die A1493 mit dem ersten Paar des Codon-Anticodon-Duplex bildet (zwei mit den 2'-OH-Gruppen von A36 und U1 und eine dritte mit O2 von U1). Entgegen einer durchaus realistischen Vorstellung ist die dritte Wasserstoffbrücke nicht sequenzspezifisch, da die O2-Position der Pyrimidine und die N3-Position der Purine, beides H-Brücken-Acceptoren, identische Positionen in der kleinen Furche einer Doppelhelix einnehmen.

Das zweite Basenpaar (A35-U2) wird ebenfalls durch 2'-OH-Wechselwirkungen – diesmal aber von zwei Basen (A1492 und G530) – überprüft (diese Typ-2-Wechselwirkung eines „A-minor“-Motivs ist in Abbildung 4b gezeigt). A1492 und G530 werden in ihren Positionen durch sekundäre

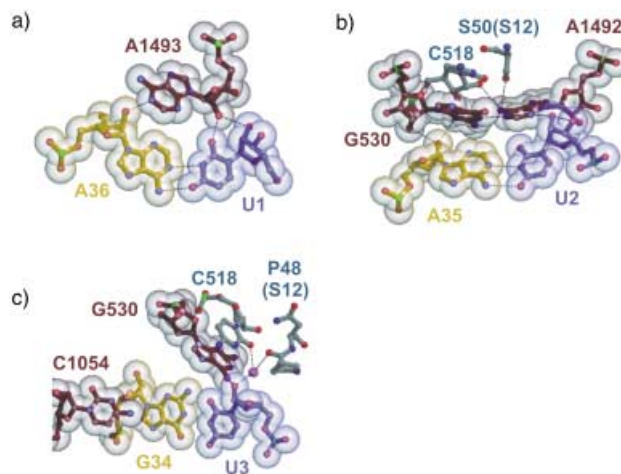


Abbildung 4. Die Decodierungsprinzipien der ribosomalen A-Stelle. a) Das erste Basenpaar einer Codon-Anticodon-Wechselwirkung (Position 1) wird vom „A-minor“-Motiv vom Typ I erkannt: A1493 bindet über H-Brücken in die kleine Furche des A36-U1-Basenpaares (gepunktet). b) Die Erkennung der Position 2 erfolgt über ein „A-minor“-Motiv vom Typ II: A1492 und G530 erkennen im Tandem, ebenfalls über H-Brücken, die stereochemische Korrektheit des A35-U2-Basenpaares. c) Das dritte Basenpaar G34-U3 (Wobble-Basenpaar) wird weniger rigoros überprüft. C1054 stapelt auf G34, während U3 direkt mit G530 wechselwirkt und über ein Magnesium-Ion (magenta) indirekt mit C518 und Prolin 48 von S12. Alle Nucleotide, die bei der Überprüfung von Position 1 und 2 beteiligt sind, sind universell konserviert. Wieder- gabe nach Ogle et al.^[39]

Wechselwirkung mit dem ribosomalen Protein S12 (Serin 50) und einem weiteren universell konservierten Rest C518 festgekeilt. Damit erscheint die Überprüfung des mittleren Basenpaares eines Codon-Anticodon-Duplex noch rigider zu verlaufen als die des ersten Basenpaares. Dies passt gut zu der Beobachtung, dass das mittlere Basenpaar die wichtigste Rolle bei der Codierung einer Aminosäure spielt, gefolgt vom ersten Basenpaar; das dritte Basenpaar spielt eine geringere und in vielen Fällen sogar keine Rolle bei der Decodierung der mRNA-Information. Im Einklang damit ist die Überprüfung der dritten Position weniger rigoros, was Spielraum für „Wobble-Wechselwirkungen“ lässt (Abbildung 4c). Tatsächlich bleibt die kleine Furche des dritten Basenpaares exponiert – trotz direkter Wechselwirkungen mit C1054 und G530 und einer indirekten Wechselwirkung, die durch ein Metallion eine Verbindung zu C518 und dem Prolinrest 48 des ribosomalen Proteins S12 herstellt. Die Ergebnisse bestätigen die Potapov-Hypothese und veranschaulichen, wie die Decodierung auf der Erkennung der korrekten Stereochemie der A-Form des Codon-Anticodon-Duplex erfolgt. Die Tatsache, dass die beteiligten Komponenten universell konserviert sind, lässt den Schluss zu, dass der Mechanismus der Decodierung für alle Ribosomen identisch ist.

Schon im Vorfeld der Potapov-Hypothese wurde vorgeschlagen, dass das Ribosom einen „Proofreading-Mechanismus“ nutzt, um die Genauigkeit der Translation zu verbessern.^[40,41] Der vorgeschlagene Mechanismus sieht eine wiederholte Selektion des korrekten Substrats vor, indem nach der anfänglichen Bindung der A-tRNA die Korrektheit dieser tRNA ein zweites Mal überprüft und danach die tRNA entlassen werden kann. Die zweite Selektion erfolgt nach der Freisetzung von EF-Tu-GDP (nach den ursprünglichen Proofreading-Hypothesen sollte die bei der GTP-Hydrolyse freierwerdende Energie direkt für diese Reselektion genutzt werden), weshalb der GTP-Verbrauch für den Fehleinbau einer nah-cognaten Aminosäure ein Maß für den Stellenwert des Proofreading-Mechanismus innerhalb der Translationsgenauigkeit ist. Die Kristallstrukturen von EF-Tu und Ribosom belegen, dass auf dem Ribosom kein aktives Zentrum für einen Proofreading-Mechanismus existiert. Deshalb muss ein Proofreading-Mechanismus im Falle des Ribosoms auf einen kinetischen Effekt reduziert werden,^[42] der nach der Freisetzung des binären Komplexes EF-Tu-GDP eintritt: Die Bindungsenergie im Decodierungsschritt (des ersten Schrittes der A-Stellen-Bindung, siehe Abschnitt 2.2.1) ist für die Bindung der schlechter passenden nah-cognaten aa-tRNA geringer als für die Bindung der cognaten aa-tRNA. Deshalb ist auch die Wahrscheinlichkeit, die für die Akkomodation notwendige größere Konformationsänderung auszulösen, bei einer nah-cognaten aa-tRNA kleiner, womit sich deren Verweilzeit in der schwach affinen A-Stelle verlängert (was gemessen werden konnte).^[43] Der nah-cognaten aa-tRNA bietet sich somit länger die Gelegenheit, von der gering affinen A-Stelle „herunterzufallen“. Die erneute Bindung der nah-cognaten aa-tRNA ist in Gegenwart der konkurrierenden ternären Komplexe, die wegen der Gegenwart von EF-Tu eine um zwei bis drei Größenordnungen höhere Affinität für die A-Stelle aufweisen, unwahrscheinlich.^[44]

Der Stellenwert des Proofreading-Schrittes kann quantifiziert werden, wenn man die Tatsache nutzt, dass der Proofreading-Mechanismus eine Folge der EF-Tu-abhängigen GTP-Hydrolyse ist. Die Genauigkeit der aa-tRNA-Selektion in Gegenwart von EF-Tu und eines nichtspaltbaren GTP-Analogons wurde zu 1:1000 bestimmt,^[45] d.h., ohne Proofreading kann der erste Selektionsschritt, die Anfangsbindung, eine Genauigkeit erreichen, die nur um den Faktor 3 unter der In-vivo-Genauigkeit (d.h. mit Proofreading) von 1:3000 liegt. Der gleiche Faktor wurde bei der Messung des GTP-Verbrauchs pro eingebauter cognater gegenüber nah-cognater Aminosäure festgestellt.^[38] Mit anderen Worten vermindert der kinetische Proofreading-Mechanismus den Fehleinbau nur um den Faktor 3. Damit ist klar, dass der entscheidende Beitrag zur Genauigkeit der Translation (Faktor 1000) von der Anfangsbindung und damit der stereochemischen Überprüfung des Codon-Anticodon-Duplex herrührt – so wie es von Potapov vorhergesagt wurde – und der Proofreading-Mechanismus eine untergeordnete Rolle spielt. Kürzlich wurde die Diskriminierungskraft der A-Stelle an 70S-Ribosomen direkt mithilfe von cognaten und nah-cognaten ASL-tRNA-Fragmenten untersucht. Das Ergebnis stimmt qualitativ mit der hier vorgestellten Sichtweise überein: Der Decodierungsschritt ohne Proofreading verläuft den Messungen zufolge mit einer Genauigkeit zwischen 1:350 und 1:500 und bildet somit auch in diesem Beispiel den Hauptbeitrag zur Translationsgenauigkeit.^[46]

2.2.3. Molekulare Mimikry in der ribosomalen A-Stelle

Die A-Stelle bindet nicht nur tRNAs, sondern auch einige Translationsfaktoren in verschiedenen Stufen des Elongationszyklus. Die ersten Strukturen von Faktoren dieser Gruppe, die gelöst werden konnten, waren die der Translationsfaktoren EF-G^[47,48] und EF-Tu.^[49,50] Überraschenderweise hat die Struktur des ternären Komplexes EF-Tu-GTP-tRNA^[51] eine bestechende Ähnlichkeit mit der von EF-G-GDP, und zwar nehmen die Domänen 3–5 von EF-G sehr exakt die Form der tRNA innerhalb des ternären Komplexes ein (Abbildung 5a und b; siehe Übersicht bei Nissen et al.^[34]). Dieser Befund ließ den Schluss zu, dass die Bindungstasche der A-Stelle die Translationsfaktoren zu einer tRNA-ähnlichen Gestalt zwingt. Die in den folgenden Jahren aufgelösten Strukturen unterschiedlicher Terminationsfaktoren, die ebenfalls mit der A-Stelle wechselwirken, stützen dieses Konzept. Die überzeugendste tRNA-Mimik überhaupt wurde in der Struktur des Ribosomen-Recycling-Faktors (RRF) gefunden, der eine ähnliche L-Form sowie die Ausmaße der tRNA hat (Abbildung 5c).^[53] Die Strukturen des bakteriellen RF2-Faktors (Abbildung 5d)^[56] und des eukaryotischen menschlichen eRF1^[57] weichen signifikant von der Standardstruktur einer tRNA ab, obwohl auch dieser Faktor die A-Stelle ausfüllen sollte wie eine tRNA. Eine Domäne sollte Wechselwirkungen mit der Decodierungsstelle der kleinen Untereinheit eingehen und eine andere das PTF-Zentrum auf der großen Untereinheit erreichen. Dieser Widerspruch von Struktur und Voraussage konnte kürzlich gelöst werden: Nach Kryo-EM-Analysen von Terminations-

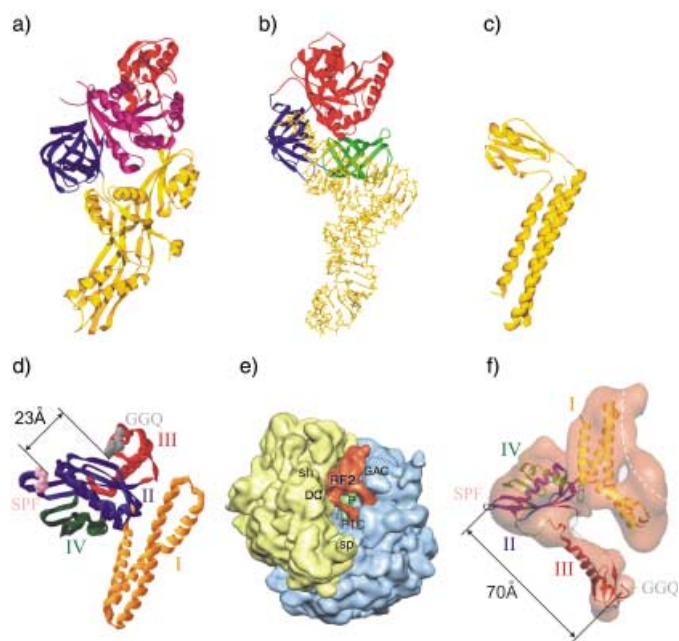


Abbildung 5. Molekulare Mimikry: Translationsfaktoren kopieren die Form der tRNAs. Kristallstrukturen von a) EF-G-GDP mit den Domänen 3–5 in Gelb (pdb1fnn),^[52] b) EF-Tu-GTP-tRNA (pdb1ttt),^[51] c) RRF (pdb1eh1),^[54] d) RF2 (pdb1gqe).^[56] e) Kryo-EM-Rekonstruktionen von RF2 (rot), das an das *E.-coli*-70S-Ribosom gebunden ist (30S in Gelb und 50S in Blau). DC: Decodierungszentrum, GAC: GTPase-assoziiertes Zentrum, P: P-Stellen-tRNA, PTC: Peptidyltransferasezentrum. f) Die RF2-Kristallstruktur wurde in die Elektronendichte von RF2, wie in (e) gezeigt, hineinmodelliert. In (d) und (f) kennzeichnen römische Ziffern die RF2-Domänen, die jeweils gleich angefärbt sind; die GGQ- und SPF-Motive sind mit Grau und Rosa hervorgehoben. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen der RF2-Elektronendichte und der des Ribosoms. Die Abbildungen der Kristallstrukturen wurden mit dem Swisspdb-Viewer^[55] angefertigt und mit POVRAY ausgegeben. Wiedergabe der Kryo-EM-Bilder nach Rawat et al.^[59]

komplexen, bei denen Ribosomen RF2 gebunden hatten, lagern sich die Domänen von RF2 nach der Bindung an das Ribosom drastisch um (Abbildung 5 e).^[58,59] Dieser Konformationswechsel ermöglichte die exakte Bestimmung funktioneller Bereiche dieses Proteinfaktors. Zum Beispiel befinden sich in der Kristallstruktur das „Tripeptid-Anticodon“ und das GGQ-Motiv lediglich in einem Abstand von 23 Å (Abbildung 5 d), obwohl diese Regionen mit dem Stoppcodon bzw. mit dem PTF-Zentrum wechselwirken sollten, was eine Trennung der beiden Bereiche um ungefähr 70 Å erfordern würde. Tatsächlich wurde diese Bedingung beim Einpassen der Struktur von RF2 in die Elektronendichte des Faktors innerhalb des Terminationskomplexes erfüllt (Abbildung 5 f).^[58,59]

Die strukturelle Nachahmung einer tRNA durch RRF wurde anhand von Sondierungsexperimenten mithilfe von Hydroxylradikalen in Zweifel gezogen. Diese Untersuchungen deuteten darauf hin, dass RRF exakt umgekehrt auf dem Ribosom zu liegen kommt als es die tRNA-Mimik erwarten lässt.^[60] Die Überprüfung dieses Befundes durch Kryo-EM ribosomaler RRF-Komplexe steht noch aus. Dass sich RRF bei der Bindung an das Ribosom ähnlich umordnet wie RF2 scheint eher unwahrscheinlich zu sein. Offenbar sollte im Fall

von RRF eher von einer funktionellen als von einer strukturellen Mimikry gesprochen werden.

Nach Freisetzung der Polypeptidkette durch einen der Terminationsfaktoren bindet der RRF an das Ribosom und vermittelt die Dissoziation des Ribosoms in seine Untereinheiten, wodurch diese für den nächsten Translationszyklus bereitgestellt werden. Dieser Prozess wird durch den EF-G gefördert, der einem Vorschlag zufolge den RRF von der A-Stelle in die P-Stelle transloziert; auf ähnliche Weise vermittelt der EF-G eine tRNA während der Translokation.^[61]

Die Mimikry einer tRNA durch ein Protein dürfte innerhalb des Ribosoms ein weiter verbreitetes Merkmal sein als zunächst angenommen. Ribosomen in Organellen (Chloroplasten, Mitochondrien) enthalten gewöhnlich kürzere rRNAs als *E. coli*. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese rRNA-Verluste sowohl in der Größe als auch in der Form durch ribosomale Proteine kompensiert werden, die zum Teil spezifisch für die Organellen-Ribosomen sind.^[62] Mitochondrien sind ein extremes Beispiel insofern, als die Proteinanteile des Ribosoms zwei Drittel der Masse (gegenüber einem Drittel in *E.-coli*-Ribosomen) ausmachen. Die reduzierte rRNA besteht vornehmlich aus universell konservierten Resten, die in den aktiven Zentren des Ribosoms, d.h. im Decodierungszentrum der 30S-Untereinheit und im PTF-Zentrum auf der großen Untereinheit, zu finden sind,^[63] was die Bedeutung dieser Regionen unterstreicht.

2.2.4. Antibiotische Antagonisten der A-Stellen-Decodierung

Bis heute sind die Strukturen von sieben Antibiotika im Komplex mit der 30S-Untereinheit gelöst worden: von Tetracyclin, Paromomycin, Spectinomycin, Streptomycin, Pactamycin, Hygromycin B und Edein.^[27,39,64,65] Die primären Bindungsstellen dieser Antibiotika sind zwar unterschiedlich, befinden sich aber sämtlich in wichtigen funktionellen Regionen der 30S-Untereinheit, d.h. rRNA-reichen Regionen, die mit der tRNA wechselwirken oder an der Bewegung der tRNA während der Translokation beteiligt sind. Hier wollen wir uns auf Tetracyclin und Paromomycin beschränken, beide Antibiotika, die in die Decodierungsstelle binden.

In unabhängigen Untersuchungen wurden mindestens zwei Tetracyclinbindungsstellen auf der 30S-Untereinheit identifiziert (Abbildung 6 a).^[27,65] In beiden Fällen wurde die Stelle mit der höchsten Besetzung, eine Spalte zwischen Kopf und Schulter der 30S-Untereinheit, als die primäre Bindungsstelle aufgefasst (Abbildung 6 b). In dieser Position wechselwirkt Tetracyclin, das ein System von vier anellierten Ringen bildet, mit der 16S-RNA über Sauerstoffatome einer Seite des Moleküls. Die O-Atome bilden Wasserstoffbrücken mit dem exponierten Zucker-Phosphat-Rückgrat der Helix h34. Diese Anordnung und Wechselwirkung ist insofern überraschend, als Tetracyclin mit seiner hydrophilen Seite an die 16S-RNA bindet, während die hydrophobe Seite in das Lumen der A-Stelle ragt; üblicherweise lagern sich hydrophobe Regionen der Moleküle aneinander. Es steht zu erwarten, dass die primäre Tetracyclinbindungsstelle mit der Position der A-Stellen-tRNA überlappt, womit die Tetracyclin-Hemmung im Wesentlichen auf einer Hemmung der aa-tRNA-Bindung bei der Akkomodation in die A-Stelle beruht. Aus zwei

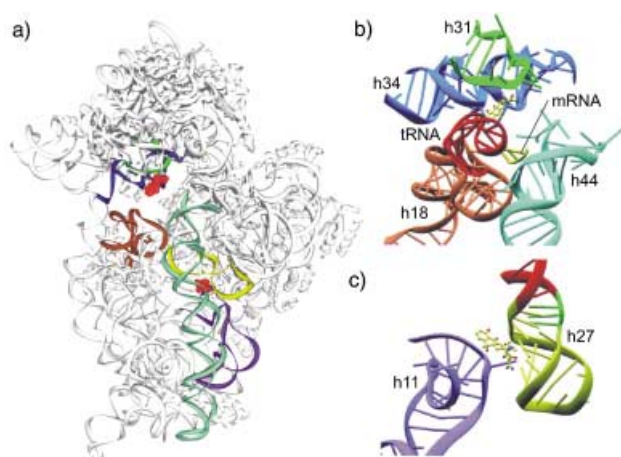


Abbildung 6. Bindung von Tetracyclin (Tet) an die 30S-Untereinheit von *Thermus thermophilus*. a) Überblick über die primäre und sekundäre Tet-Bindestelle (rot). b) Die primäre Bindestelle in stärkerer Vergrößerung mit der Position der A-Stellen-tRNA (rot) und der mRNA (gelb). Helix 18 (braun), h31 (grün), h34 (blau) und h44 (cyan) sind im Bandformat dargestellt. c) Die sekundäre Bindestelle umfasst h11 (violett) und h27 (gelb). Der im Text erwähnte Schalter beruht auf der Umwandlung der Basenpaarkonfiguration von Rot zu Grün. Die Abbildung (a) wurde aus der pdb-Datei 1HNW mit Swisspdb-Viewer^[55] erzeugt und mit POV-Ray ausgegeben. Wiedergabe der Abbildungen (b) und (c) in veränderter Form nach Brodersen et al.^[65]

Gründen ist es unwahrscheinlich, dass der erste Schritt der aa-tRNA-Bindung, d.h. die Initialbindung oder Decodierung, von Tetracyclin beeinflusst wird: 1) Die Tetracyclinbindestelle befindet sich auf der tRNA-Seite, die der initialen Codon-Anticodon-Wechselwirkung gegenüberliegt. 2) Während der Übergabe der aa-tRNA in die A-Stelle wird die Anticodon-Stammschleife der aa-tRNA von EF-Tu geknickt und in einem Winkel präsentiert,^[36,37] sodass offenbar Kontakte zwischen der initial gebundenen tRNA und gebundenem Tetracyclin vermieden werden.^[27,65] Dies erklärt, warum Tetracyclin nicht die EF-Tu-abhängige GTP-Hydrolyse hemmt,^[66] einen Schritt, der *nach* der initialen Bindung des ternären Komplexes abläuft. Die rRNA-Basen der primären Bindestelle von Tetracyclin sind zwischen Prokaryoten und Eukaryoten nur schwach konserviert, und die universelle Hemmwirkung von Tetracyclin geht auf dessen nahezu ausschließliche Wechselwirkung mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat zurück. Im Unterschied dazu sind die Bindungsstellen von Pactamycin, Edein und Hygromycin B hochkonserviert, sodass der universelle Mechanismus auf der Wechselwirkung mit den konservierten Basen beruht.

Die sekundäre Bindestelle von Tetracyclin liegt eingeklemt zwischen h11 und h27 im Körper der 30S-Untereinheiten (Abbildung 6c). In der Helix h27 können Basen verschoben werden, ohne dass sich die Zahl der Basenpaare verändert; das System wurde dementsprechend als „Konformationsschalter“ bezeichnet.^[67] Das Protein Tet(O) entfernt Tetracyclin vom Ribosom und erzeugt damit eine Resistenz gegen Tetracyclin. Schutzexperimente mit Dimethylsulfat in Gegenwart von Tet(O) zeigten, dass dieses Protein Tetracyclin von der primären, nicht aber von der sekundären Bindestelle entfernt.^[68] Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass die

sekundäre Stelle bei der Tetracyclin-Hemmung eine Rolle spielt.

Die Bindestelle des Aminoglycosids Paromomycin, das den Translationsfehler verstärkt, wurde mit 3 Å Auflösung bestimmt; Wechselwirkungen wurden ausschließlich mit h44 der 16S-RNA identifiziert.^[39,64] Die Bindung von Paromomycin induziert ein Ausschwenken der universell konservierten Reste A1492 und A1493 von h44 auf ähnliche Weise, wie es in Gegenwart einer cognaten aa-tRNA in der A-Stelle beobachtet wird. Dieser Konformationswechsel wird dadurch erzwungen, dass einer der vier Ringe von Paromomycin (Ring I) in h44 eingebaut wird. In dieser Position ähnelt Ring I einer Nucleotidbase, die gegen G1491 stapelt und eine H-Brücke mit A1408 eingeht. Die Stabilität dieser Konformationsänderung wird verstärkt durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Ring I und dem Rückgrat des herausgedrehten Restes A1493. Ring I und Ring II von Paromomycin kommen in einigen anderen Aminoglycosiden vor, z. B. in den Antibiotika der Neomycin-, Gentamycin- und Kanamycin-Familien, was vermuten lässt, dass der bei diesen Antibiotika gefundene erhöhte Translationsfehler auf einem ähnlichen Mechanismus beruht.

Wie wir im Abschnitt 2.2.2 gesehen haben, wird die Bildung einer korrekten Codon-Anticodon-Wechselwirkung durch Wechselwirkungen des „A-minor“-Motivs zwischen A1492 und A1493 mit der Codon-Anticodon-Helix überprüft. Vermutlich wird die Energie, die zum Herausdrehen von A1492 und A1493 benötigt wird, durch kompensatorische Wechselwirkungen der Codon-Anticodon-Helix aufgebracht, die damit diese Konformation stabilisieren. In Gegenwart nah-cognater tRNA werden diese kompensatorischen Wechselwirkungen nicht gebildet, womit das Herausdrehen von A1492 und A1493 nicht stabilisiert und keine A-Stellen-Akkommodation erreicht werden kann. Offenbar können in Gegenwart von Paromomycin die normalerweise nicht kompensierten Energieverluste aufgebracht und so das Herausdrehen von A1492 und A1493 in eine offene Konformation induziert werden. Im Ergebnis kann damit in Gegenwart von Paromomycin auch eine nah-cognate tRNA mit großer Wahrscheinlichkeit vollständig in der A-Stelle akkomodiert werden, was zum Fehleinbau der zugehörigen Aminosäure führt und die Fehlerquote der Proteinsynthese erhöht.

2.3. Die P-Stelle und das Peptidyltransferasezentrum

Die Frage nach dem katalytischen „Herzstück“ des Ribosoms, dem Peptidyltransferasezentrum, war schon immer von Kontroversen umgeben. Anfangs stand die Frage im Vordergrund, ob das aktuelle Zentrum vornehmlich aus Proteinen oder RNA besteht. Die Antwort auf diese Frage gab die Kristallstruktur der 50S-Untereinheit, insbesondere die des 50S-Komplexes mit einem Molekül, von dem man annahm, es sei ein Intermediat der PTF-Reaktion.^[69] Die Lokalisierung des Intermediats ergab zweifelsfrei, dass das katalytische Zentrum des Ribosoms ausschließlich von RNA gebildet wird. Weiterhin ergab die Analyse der Reste, die sich unmittelbar neben den CCA-Enden des tRNA-Analogons befinden, dass der PTF-Reaktion vermutlich ein allgemeiner

Säure-Base-Katalysemechanismus zugrunde liegt, der den universell konservierten Nucleotidrest A2451 als zentrales Element einschließt. Dieser Vorschlag wurde von einer Reihe von Arbeitsgruppen anhand gegenteiliger biochemischer und genetischer Belege attackiert.^[70–72] Die im Gang befindliche Kontroverse konzentriert sich auf den exakten katalytischen Beitrag des Ribosoms und die mögliche Beteiligung von Nucleotiden.^[73] Somit hat sich die Debatte von der Frage „RNA oder Proteine als Bausteine der katalytischen Domäne?“ auf detaillierte mechanistische Fragen verlagert.

In Abschnitt 2.3.1 analysieren wir die Wechselwirkungen der Peptidyl-tRNA an der P-Stelle – sicher die tRNA-Bindestelle, zu der die genauesten Informationen vorliegen – und veranschaulichen die universellen Merkmale. Den Mechanismus der PTF-Reaktion betrachten wir in Abschnitt 2.3.2, wobei wir untersuchen, auf welche Weise das Ribosom den Transfer der wachsenden Polypeptidkette von der P-tRNA auf die A-tRNA unterstützt oder katalysiert. Die extreme Konservierung der Reste innerhalb des PTF-Zentrums macht deutlich, dass der Mechanismus des PTF universell gültig ist. Abschließend widmen wir uns dem PTF-Zentrum und seiner direkten Umgebung als Ziel zahlreicher Antibiotika. Strukturen einiger klinisch relevanter Beispiele wie Chloramphenicol, Clindamycin und Makroliden^[11,74] wurden in Komplexen mit der 50S-Untereinheit gelöst. Diese Strukturen geben nicht nur Einblick in den Hemmungsmechanismus einiger Antibiotika und der gehemmten ribosomalen Funktion, sondern könnten auch den Weg bahnen für den Entwurf spezifischer Antibiotika zur Bekämpfung der zunehmenden Resistenz von Bakterienstämmen.^[75]

2.3.1. Peptidyl-tRNA-Wechselwirkungen in der P-Stelle des Ribosoms

Die tRNA-Positionen auf dem Ribosom wurden mit unterschiedlichen biochemischen Strategien untersucht, anhand derer eine Reihe von rRNA-Nucleotiden identifiziert und mit jeder der tRNA-Stellen assoziiert werden konnte (siehe Tabelle 3 in Lit. [13]). Nachdem die mit 5.5 Å aufgelöste Kristallstruktur des 70S-Ribosoms von *Thermus thermophilus* im Komplex mit drei tRNAs zugänglich war,^[76] wurde klar, dass die identifizierten Reste entweder direkt die tRNA berühren oder ihre veränderte Modifizierbarkeit mit Konformationsänderungen innerhalb der Bindungsregion erklärt werden konnte. Ein ausgezeichnetes Beispiel, das diese Korrelation illustriert, ist die Analyse von Spaltungsmustern innerhalb der phosphothionierten tRNA, die am Ribosom gebunden ist. Die Kontaktmuster zeigen, dass nur 15 % einer P-tRNA (nämlich die tRNA-Nucleotide 29–43, die die Anticodon-Schleife und zwei benachbarte Stammbasenpaare umfassen) mit der 30S-Untereinheit und die restlichen 85 % mit der 50S-Untereinheit wechselwirken (Abbildung 7).^[77] Dass die Schutzmuster die gesamte tRNA umfassen, widerlegt frühere Annahmen, nach denen die tRNA nur über ihre äußersten Enden an das Ribosom bindet, d. h. über Codon-Anticodon-Wechselwirkung mit der kleinen und mit dem CCA-Ende mit der großen Untereinheit verknüpft ist. Ferner zeigte sich, dass das Ribosom eine tRNA in jeder der

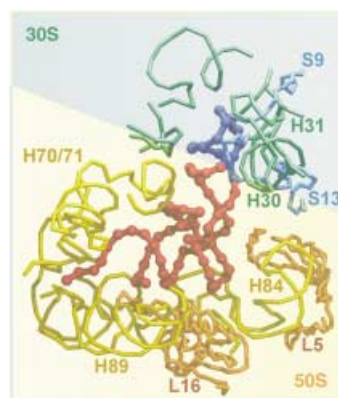


Abbildung 7. Wechselwirkungen der P-tRNA mit dem 70S-Ribosom. Die Bereiche der P-tRNA, die mit der 30S-Untereinheit (15 %) und der 50S-Untereinheit (85 %) wechselwirken,^[77] sind blau bzw. rot. Ribosomale Komponenten sind innerhalb eines 10-Å-Radius um die P-tRNA dargestellt (grün und cyan: rRNA bzw. Proteine der kleinen 30S-Untereinheit; gelb und orangefarben: rRNA bzw. Proteine der 50S-Untereinheit); H: Helices der rRNA, S und L: Protein der kleinen bzw. großen Untereinheit. Die Abbildung wurde aus den pdb-Dateien 1GIX/1GIY^[76] mithilfe des Programms RASMOL^[78] erzeugt und mit POVray ausgegeben.

drei Bindestellen über universell konservierte tRNA-Nucleotide fixiert.^[76,77] Anhand von Phosphothioat-Schutzgruppenexperimenten wurde des Weiteren eine Konformationsänderung einer P-tRNA während der Bindung an das Ribosom nachgewiesen.^[79] Ein derartiger Strukturwechsel wird auch in der 70S/tRNA₃-Kristallstruktur ersichtlich, in der die P-tRNA leicht an dem Gelenk um die D-Schleife und den Anticodon-Stamm gebogen ist.^[76] Hinweise auf einen ähnlichen Konformationswechsel wurden bei der Einpassung der Kristallstruktur einer Hefe-tRNA^{Phe} in die P-Stellen-Elektronendichte einer Kryo-EM-Rekonstruktion eines Hefe-80S-P-tRNA-Komplexes entdeckt.^[3]

Die Berührungspunkte von P-tRNA-Wechselwirkungen mit Heferibosomen sollen, mit besonderem Augenmerk auf konservierten Wechselwirkungen, im Detail betrachtet werden. Ein Vergleich zeigt, dass die Wechselwirkungen zwischen rRNA und der P-tRNA in Bakterien denen in Hefe entsprechen (Tabelle 2).^[3,32] Auf der bakteriellen 30S-Untereinheit ist die P-tRNA sehr fest mit der rRNA über sechs Kontaktpunkte fixiert (a–f in Abbildung 8a). Der P-Stellen-Codon-Anticodon-Duplex liegt in der verzogenen größeren Furche von h44 und wird mit einer Reihe von ribosomalen „Fingern“ mehrheitlich an das Zucker-Phosphat-Rückgrat fixiert.^[32] Eine entsprechende Position wird ebenfalls für die P-tRNA und die Anordnung der Wechselwirkungen in Heferibosomen beobachtet (Abbildung 8b). In *Thermus thermophilus* werden zwei der P-tRNA/rRNA-Kontakte durch Wechselwirkungen mit den C-terminalen Enden der ribosomalen Proteine S9 und S13 verstärkt. Das C-terminale Ende von S9 ist hochkonserviert und enthält einen universell konservierten Argininrest, der die Phosphatgruppe der Position 35 in der Anticodon-Schleife der P-tRNA berührt. Wiederum wird eine ähnliche Wechselwirkung in Hefe mit dem Protein rpS16, dem Homologen des bakteriellen S9, gefunden, während rpS18, das Homologe von S13, keine

Tabelle 2: Ribosomale Komponenten der Brücken zwischen den Untereinheiten von *Thermus thermophilus*^[32] und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.^[3]

Untereinheit	tRNA-Position ^[a]	ribosomale Komponente (<i>T. thermophilus</i>)	rRNA-Wechselwirkung (<i>T. thermophilus</i>)	ribosomale Komponente (<i>S. cerevisiae</i>)	rRNA-Wechselwirkung (<i>S. cerevisiae</i>)
kleine	28	16S h30	1229		
	29/30	16S h30	1229	18S h30	1229/1230
	32			RpS16	Tyr 141/Arg 142
	34	16S h31	966	18S h31	966
	35	S9	Arg 128		
	36	S13	116–120		
	38 (39)	16S h24	790	(18S h24)	(790)
	(40) 41	(16S h42)	(1339)	18S h43	1338
	(41) 42	(16S h42)	(1338)	18S h43	1339
große	2			RpL10	Lys 101
	3	23S H80	2255–2256	25S H80	2285
	4			25S H80	2286
	11–13 (12–13)	(23S H69)	(1908–1909)	25S H69	1908–1910
	14			25S H69	1924
	25–26	23S H69	1922–1923		
	51/52/63			RpL10	Arg 24
	56 (56–57)	(RpL5)	(55–66)	RpL11	Tyr 51
	71–72			25S H93	2594
	73 (75)	23S H93	(2602)	25S H93	2602
	74/76	23S P-Loop/L90–93	2252/2585		

[a] tRNA-Positionen von Hefe-Kryo-EM-Analysen gelten wegen der eingeschränkten Auflösung nur näherungsweise.

entsprechende C-terminale Sequenz enthält und wegen seiner Position innerhalb des 80S-Ribosoms wahrscheinlich nicht an einer P-tRNA-Fixierung beteiligt ist. Auch die große Untereinheit enthält konservierte Wechselwirkungen mit der P-tRNA; sichtbar sind hier Wechselwirkungen mit H69 und der D-Schleife, während die T-Schleife das Protein rpL11 in Eukaryoten und das bakterielle Homologe L5 in Bakterien berührt (Tabelle 2 und Abbildung 8c und d). Interessanterweise sind beide ribosomale Komponenten an der Bildung von Brücken zwischen den Untereinheiten beteiligt, was ihre dynamische Rolle in der Translation, z. B. in der Translokation von tRNAs, verdeutlicht (siehe Abschnitt 2.4.2). Zwar konnte das Einzelstrang-CCA-Ende der P-tRNA in dem 80S-Komplex nicht aufgelöst werden, seine Lage weist aber auf eine Wechselwirkung mit dem PTF-Zentrum hin. Deutlich wird dies anhand der Nähe des CCA-Endes mit der Base 2602 im Heferibosomenkomplex, die im bakteriellen Ribosomenkomplex die tRNA-Base 75 berührt (die vorletzte Base des CCA-Endes einer P-tRNA).

Die multiplen Kontaktpunkte einer tRNA mit dem Ribosom machen deutlich, dass die exakte Positionierung einer tRNA durch ein komplexes Netzwerk von Wechselwirkungen zustande kommt. Dass die ribosomalen Komponenten, die mit einer P-tRNA wechselwirken, hinsichtlich der tRNA-Anordnung eine ausgesprochen große Ähnlichkeit aufweisen und praktisch in Milliarden von Jahren von Hefe bis Eubakterien nicht verändert wurden, lässt auf eine herausragende Funktion dieser Komponenten bei der Translation schließen. Die präzise Positionierung einer tRNA ist essenziell für die ribosomale Funktion. Wie wir in Abschnitt 2.2 gesehen haben, wird der Prozess der Decodierung durch die stereochemische Anordnung der tRNAs relativ zu der mRNA und dem Ribosom ermöglicht. Auffallend viele der Berührungspunkte sind Komponenten von

Brücken, die die Untereinheiten verbinden, was darauf hinweist, dass diese Wechselwirkungen nicht nur die Position einer tRNA fixieren, sondern auch am Transport durch das Ribosom beteiligt sind (siehe Abschnitt 2.4). Wie wir im nächsten Abschnitt 2.3.2 sehen werden, ist eine stabile Fixierung sowohl der A- als auch der P-tRNA eine Voraussetzung für eine effiziente Bildung einer Peptidbindung.

2.3.2. Das Ribosom ist ein Ribozym

Die PTF-Reaktion ist die wesentliche enzymatische Aktivität der großen Untereinheit. Sie findet statt, wenn ein prätranslokationaler (PRE) Zustand erreicht ist, d. h. wenn eine Peptidyl-tRNA in der P-Stelle und eine aa-tRNA in der A-Stelle bindet. Die beiden L-förmigen tRNAs in der A- und der P-Stelle schließen einen Winkel von ca. 40° ein,^[19,76,80] während die Acceptorstämme beider tRNAs parallel zueinander sind und durch eine translationale Bewegung ineinander überführt werden können. Im Unterschied dazu stehen sich die CCA-Enden beider tRNAs im PTF-Zentrum in Rotationssymmetrie mit einem Winkel von etwa 180° gegenüber. Die Drehung findet praktisch ausschließlich zwischen den Nucleotiden 72 und 74 der tRNA statt.^[81] Kürzlich wurde für diese Rotationssymmetrie der tRNA-Enden eine Entsprechung im PTF-Zentrum entdeckt: Zwei Gruppen von PTF-Nucleotiden umgeben dort beide CCA-Enden und weisen ebenfalls eine Rotationssymmetrie auf.^[82] Diese ribosomale Struktur könnte bei der Überführung der CCA-Enden von der A- oder P-Stelle zur P- bzw. E-Stelle während der Translokation eine wesentliche Rolle spielen.

Die Übertragung des Peptidylrestes beginnt damit, dass die α -Aminogruppe der A-tRNA die Carbonylgruppe des Peptidylrestes der P-tRNA angreift, die mit dem tRNA-Körper verestert ist. Es bildet sich ein tetraedrisches Inter-

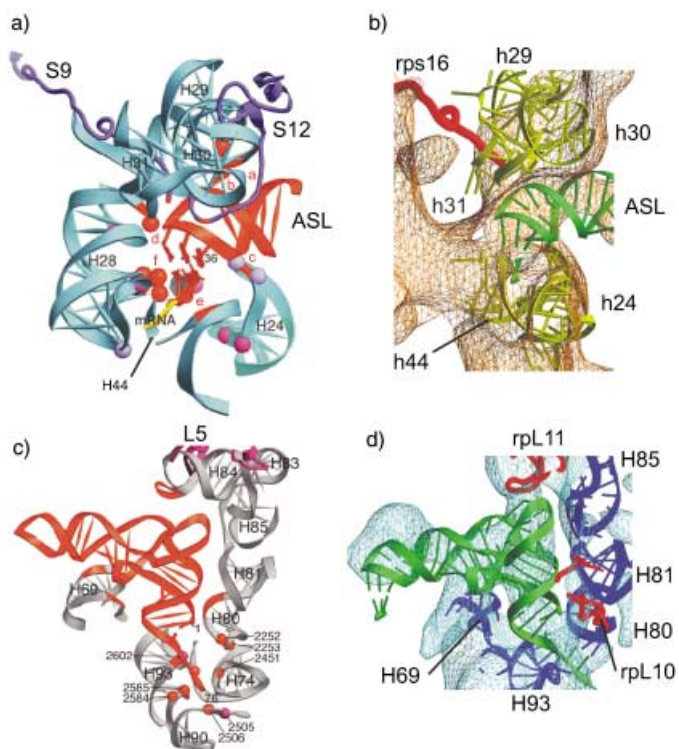


Abbildung 8. Details von P-tRNA-Wechselwirkungen mit der kleinen und großen Untereinheit des *Thermus-thermophilus*- und des *Saccharomyces-cerevisiae*-Ribosoms. Die Kontakte der P-tRNA (rot) mit der 30S- (a) und der 50S-Untereinheit (c) von *T. thermophilus* entsprechen denen der P-tRNA (grün) mit der 40S- (b) und 60S-Untereinheit (d) von *S. cerevisiae*. Die rRNA der kleinen Untereinheit ist in Cyan (a) oder Gelb (b) gehalten, die ribosomalen Proteine in Violett (a) oder Rot (b); die rRNA der großen Untereinheit ist grau (c) oder blau (d), die ribosomalen Proteine sind magenta (c) oder rot (d). Die Kugeln in (a) und (c) repräsentieren rRNA-Basen, die vor chemischen Modifikationen durch tRNA-Bindung geschützt sind. In (a) sind die sechs ribosomalen Finger, die die Anticodon-Stammschleife (ASL) der P-tRNA exakt ausrichten, mit a–f gekennzeichnet. Wiedergabe nach Yusupov et al.^[76] und Spahn et al.^[3]

mediat, das sich in einer Peptidbindung auflöst. Insgesamt wird die aa-tRNA in eine Peptidyl-tRNA überführt, verlängert um einen Aminosäurerest, während die vormalige Peptidyl-tRNA, „befreit“ von dem Peptidylrest, nun als „desacylierte tRNA“ bezeichnet wird (Abbildung 9).

Wie schon erwähnt, wurde hinsichtlich des Translationsmechanismus lange darüber gestritten, ob die PTF-Reaktion durch Proteine oder rRNA katalysiert wird. Die Frage wurde mit der Identifizierung des PTF-Zentrums beantwortet. Dazu wurden Kristalle der 50S-Untereinheit von *Haloarcula marismortui* mit einer Molekülsorte, die dem erwarteten Übergangszustand einer PTF-Reaktion ähnelt, durchtränkt und dann deren Lage bestimmt.^[69] Dieses Analogon (der so genannte Yarus-Inhibitor) ist ein Mimetikum des CCA-Endes einer Peptidyl-tRNA, das mit einem Puromycinmolekül in der A-Stelle verbunden ist (Abbildung 9). Der Yarus-Inhibitor ist ein starker, kompetitiver Inhibitor des A-Stellen-Substrats.^[84] Die Region, die den Hemmer bindet, ist dicht gepackt mit hochkonservierten Basen der 23S-rRNA, die hauptsächlich von dem PTF-Ring der Domäne V der 23S-

rRNA stammen. Von den 15 Proteinen, die mit der Domäne V der 23S-rRNA wechselwirken, kommen nur Ausläufer der Proteine L2, L3, L4 und L10e dem aktiven Zentrums bis auf 20 Å nahe (Abbildung 10). Die Tatsache, dass das aktive Zentrum des Ribosoms ausschließlich von RNA gebildet wird, bedeutet, dass das Ribosom ein Ribozym ist.

Die Debatte hat sich mittlerweile der Frage zugewandt, ob die PTF-Reaktion ausschließlich auf einem physikalischen oder zusätzlich auf einem chemischen Prinzip beruht, d. h., ob neben einer akkuraten stereochemischen Ausrichtung der Substrate (physikalisches Prinzip) auch ein chemisches Prinzip wie eine allgemeine Säure-Base-Katalyse im Spiel ist.

Die universell konservierte Base A2451 der Domäne V kommt dem Übergangsanalogon am nächsten (Abbildung 9). Es wurde als ein geeignetes Substrat für eine allgemeine Säure-Base-Katalyse angesehen, da sein N3-Atom nur etwa 3 Å vom Sauerstoffatom und 4 Å vom Stickstoff des Phosphoamids des Yarus-Inhibitors entfernt ist (Abbildung 11 a). Dieser Vorschlag wird dadurch untermauert, dass der pK_S -Wert des Restes A2451 ungewöhnlicherweise bei etwa 7 liegt und damit 6 pK_S -Einheiten höher als erwartet.^[71,85] Diese Eigenschaft ist eine Voraussetzung für eine Säure-Base-Katalyse, denn N3 kann somit leicht Protonen von der α -Aminogruppe einer aa-tRNA in der A-Stelle aufnehmen oder an diese abgeben. Auf der gleichen Grundlage wurde angenommen,^[69] dass ein protoniertes A2451 eine Wasserstoffbrücke zu dem Oxidatom des tetraedrischen Übergangszustandes bilden könnte (Abbildung 9). Jedoch wurde durch Modifizierungsstudien mit Dimethylsulfat gezeigt, dass die pH-Abhängigkeit der Position 2451 nur bei inaktiven, nicht aber bei aktiven Ribosomen auftritt.^[86] Mehrere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass A2451 nicht essenziell für eine Peptidbildung ist, da Mutationen dieser Position nur eine mäßige Abnahme der Geschwindigkeit der PTF-Reaktion um den Faktor 2–14 nach sich ziehen.^[72] Dagegen wurde gezeigt, dass solche Mutationen Defekte der Substratbindung vor allem in der A-Stelle erzeugen.^[70]

Die nächste Stufe bei der Aufklärung der PTF-Reaktion war der Nachweis einer Peptidbildung innerhalb der Kristalle nach Einweichen von A- und P-Stellen-Substraten in enzymatisch aktive *H. marismortui*-50S-Kristalle.^[87] Die bis 2.4–3.0 Å aufgelöste Struktur enthielt bereits ausgebildete Peptidbindungen, während die CCA-Enden beider tRNAs sich noch unverändert in der Lage des prätranslokationalen Ribosoms befanden. Die 3'-OH-Gruppe des desacylierten CCA-Endes in der P-Stelle befand sich in der Nähe des N3-Atoms von A2451 (Abbildung 11 b).^[87]

Es folgten Hinweise, nach denen A2451 nicht an der Stabilisierung des Übergangszustandes beteiligt ist: Falls das Oxidatom des tetraedrischen Intermediats zu dem N3-Atom von A2451 eine Wasserstoffbrücke bildet, dann müsste dieses N3 bei etwa pH 7 protoniert vorliegen und ab pH 7.3 zunehmend deprotoniert werden. In diesem Fall wäre eine starke pH-Abhängigkeit der Affinität des Yarus-Inhibitors zu erwarten, da eine Wasserstoffbrücke einen wesentlichen Beitrag (um bis zu drei Größenordnungen) zur Affinität liefert. Hingegen zeigten Strobel et al., dass pH-Wert-Änderungen zwischen pH 5 und 8.5 die Affinität des Yarus-Inhibitors für 50S-Untereinheiten nicht beeinflussen.^[85]

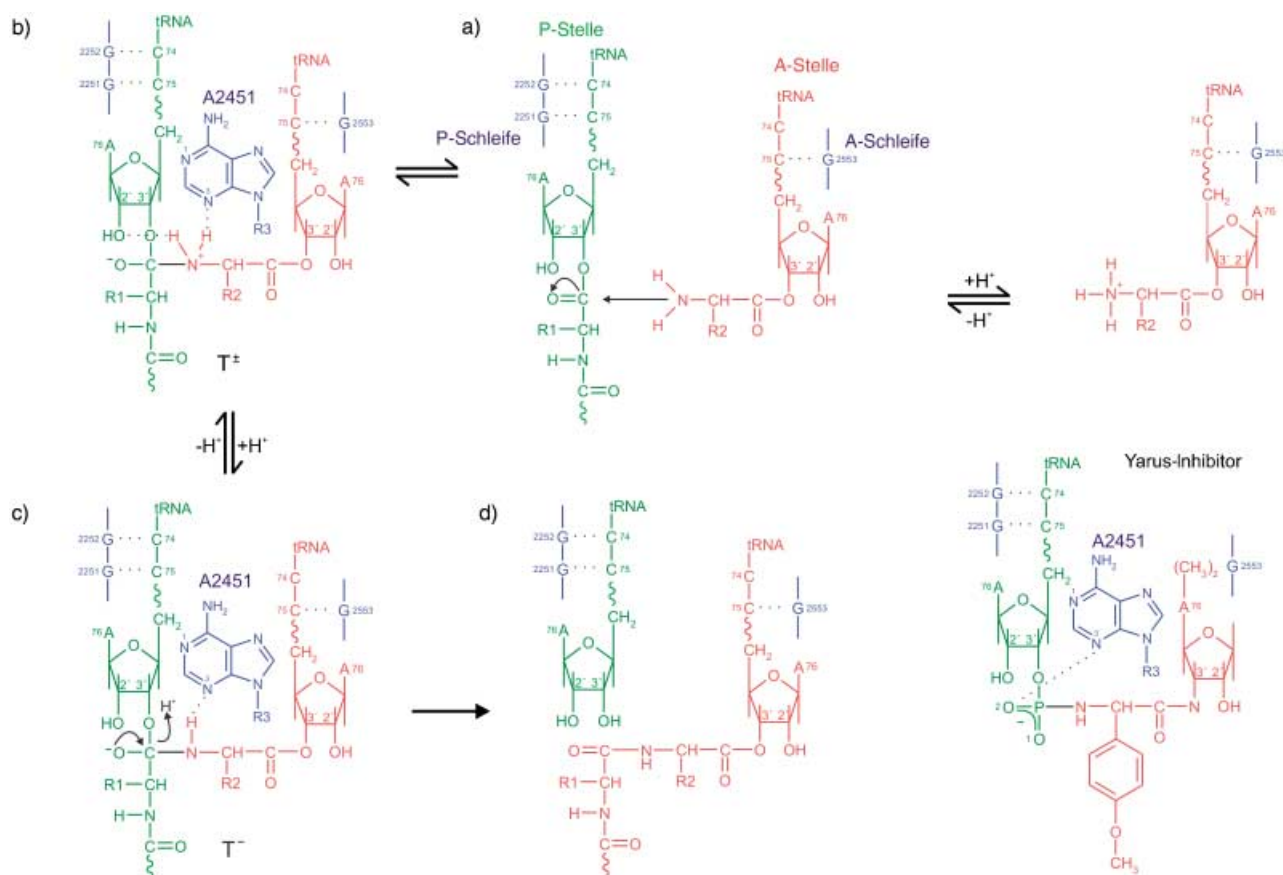


Abbildung 9. Die Peptidyltransferase-Reaktion. Rechts unten ist unter anderem der Yarus-Hemmer CCdAp-Puromycin (CCdApPmn) gezeigt, der bei der Identifizierung des PTF-Zentrums auf dem Ribosom eingesetzt wurde. Die Wechselwirkungen des Yarus-Hemmers mit der rRNA wurden aus der 50S-Kristallstruktur der *H. marismortui*-Ribosomen abgeleitet, nachdem der Kristall mit dem Inhibitor durchtränkt worden war. Ursprünglich wurde angenommen, dass protoniertes N3 von A2451 eine Wasserstoffbrücke zu O2 bildet, dessen Position für die des Oxidatoms des tetraedrischen Intermediats während der Peptidbildung gehalten wurde^[69] (siehe die schematischen Darstellung in Stufe b). Die Abbildung illustriert die vier möglichen Stufen der Peptidbildung entsprechend der neuesten kristallographischen und biochemischen Daten.^[69,73,81,85] Die wesentlichen Merkmale sind: a) C74 und C75 der P-Stellen-tRNA (grün) bilden mit G2252 und G2251 der P-Schleife (blau) ein Watson-Crick-Basenpaar. Entsprechend bildet C75 des A-Stellen-Substrats (rot) ein Watson-Crick-Basenpaar mit G2553 (A-Schleife). Bei pH 7 liegt die α -Aminofunktion der A-Stellen-aa-tRNA als Ammoniumion vor.^[83] b) Durch Deprotonierung der Ammoniumgruppe wird der nucleophile Angriff der α -Aminofunktion auf die Carbonylgruppe des P-Stellen-Substrats unter Bildung des tetraedrischen Intermediats T^+ ausgelöst. Die sekundäre Ammoniumgruppe bildet eine H-Brücke mit N3 von A2451 und eine zweite entweder mit 2'-OH der A76-Ribose in der P-Stelle (hier gezeigt) oder alternativ mit der 2'-OH-Gruppe von A2451. Das Oxidatom des tetraedrischen Intermediats weist vom N3 in A2451 weg^[81] und kann entgegen dem ursprünglichen Vorschlag^[69] keine H-Brücke zu dieser Position bilden. c) Weitere Deprotonierung der sekundären α -Ammoniumgruppe führt zu dem tetraedrischen Intermediat T^- , das in einem Eliminierungsschritt die PTF-Reaktion vervollständigt (d). Der Peptidylrest ist nun über eine Peptidbindung an die aa-tRNA der A-Stelle gebunden.

Damit ist die Vorstellung widerlegt, dass das Oxidatom durch eine Wasserstoffbrücke mit N3 von A2451 verbunden ist. Zu dem gleichen Ergebnis kamen kristallographische Analysen, nach denen das Oxidatom des tetraedrischen Intermediats vom N3-Atom wegragt und eine Wasserstoffbrücke zwischen diesen Atomen damit ausgeschlossen ist.^[81]

Schließlich ist festzustellen, dass der Yarus-Inhibitor streng genommen keine Mimikry des Übergangszustandes ist. Der Abstand zwischen dem O2-Atom des Yarus-Inhibitors und dem C2'-Atom der Desoxy-A76(dA76)-Ribose in der P-Stelle beträgt nur 2.8 Å (siehe Pfeil in Abbildung 11 a). Ein physiologisches P-Stellen-Substrat enthält aber eine 2'-OH-Gruppe an diesem C2'-Atom; die OH-Gruppe ist essenziell für die Peptidbindung.^[88] In der Position, die im Kristall analysiert wurde, würde der Yarus-Inhibitor demzu-

folge mit dieser 2'-OH-Gruppe „zusammenstoßen“. Die essenzielle Beteiligung der 2'-OH-Gruppe kann durch die Beobachtung erklärt werden, dass die α -Aminogruppe der A-Stelle möglicherweise eine Wasserstoffbrücke mit der 2'-OH-Gruppe bildet (dargestellt in Abbildung 9b).

Neu entfacht wurde die Debatte über die allgemeine Säure-Base-Katalyse durch Rodnina et al., die nachweisen konnten, dass die Peptidbildung von zwei ionisierbaren Gruppen abhängig ist: einer mit einem pK_s von 6.9 und einer zweiten mit einem Wert von 7.5.^[89] Der Wert von 6.9 wurde der α -Aminogruppe des Puromycins zugeordnet, das in diesen kinetischen Experimenten eingesetzt wurde, der zweite Wert hing offenbar mit dem Ribosom zusammen. Die ionisierbare Gruppe schien zu A2451 zu gehören, da ein Ribosom mit der Mutante A2451U die Peptidbildung 130-

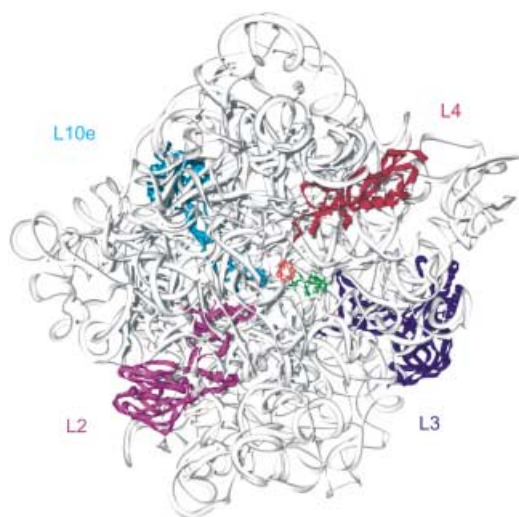


Abbildung 10. Produkte der A- (rot) und P-Stellen-Peptidbildung (grün) am PTF-Zentrum der 50S-Untereinheit; die Proteine L2 (violett), L3 (blau), L4 (rot) und L10e (blau) reichen bis auf 20 Å an das PTF-Zentrum heran. Die Abbildung wurde aus der pdb-Datei 1KQS^[87] mithilfe von Swisspdb-Viewer^[55] erzeugt und mit POVRAY ausgegeben.

mal langsamer katalysierte als das „normale“ Ribosom und keine pH-Abhängigkeit mehr aufwies. Die Autoren schlugen eine alternative Erklärung vor, der zufolge die protonierte Gruppe Teil des Basenpaares A2450:C2063 ist, das sich direkt hinter A2451 befindet (dargestellt in Abbildung 11b). In diesem Fall könnte es sich bei der ionisierten Stelle um das N1-Atom von A2450 handeln. Zwar ist dessen Abstand zur α -Aminogruppe mit 7 Å zu lang für einen Wasserstofftransfer, allerdings könnte ein Konformationswechsel des PTF-Zentrums den Rest A2450 in Reaktionsnähe bringen.^[89] Die Annahme eines Konformationswechsels erweitert nun wiederum die Palette der potenziell ionisierbaren Stellen, die für die hier behandelte chemische Katalyse infrage kommen. Wir erinnern daran, dass Hinweise auf eine Beteiligung des Restes His 229 des Proteins L2 an der Katalyse vorliegen,^[90] obgleich His 229 nach gegenwärtigen Atomkarten mehr als 20 Å vom tetraedrischen Intermediat des Übergangszustandes entfernt ist.

Im Augenblick lässt sich nur feststellen, dass eine direkte Beteiligung von A2451 an einer allgemeinen Säure-Base-Katalyse kaum mit der Beobachtung in Einklang gebracht werden kann, dass A2451 in aktiven Ribosomen (anders als in inaktiven Ribosomen) keine titrierbare Gruppe bei diesem pK_s -Wert von 7.5 enthält.^[86]

Tatsächlich ist es vorstellbar, dass das Ribosom keine direkte chemische Beteiligung zur Katalyse der PTF-Reaktion beisteuert. Beispiel für eine solche Mitwirkung wäre die Entstehung einer transienten kovalenten Wechselwirkung zwischen Substrat (tRNAs) und Enzym (dem Ribosom oder, spezifisch in diesem Fall, der rRNA). Dem Templat-Modell zufolge genügt eine präzise stereochemische Ausrichtung der Substrate zueinander, um die beobachtete Beschleunigung der Peptidbildung zu erklären (siehe Übersicht in Lit. [91]). In diesem Fall wäre die Rolle von A2451 darauf beschränkt, eine Wasserstoffbrücke mit der α -Aminogruppe zu bilden

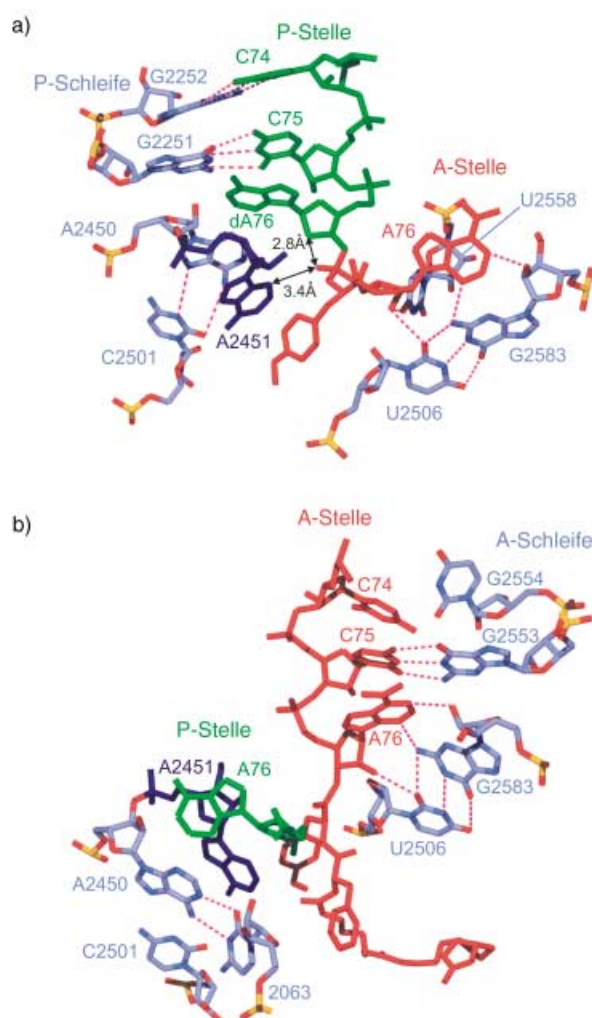


Abbildung 11. Die detaillierte Ansicht des PTF-Zentrums zeigt die genaue Fixierung der CCA-Enden von P- (grün) und A-Stellen-tRNA (rot) in der 50S-Untereinheit von *H. marismortui* im Komplex mit dem Yarus-Inhibitor (a) und den Produkten der Peptidbildung (b). N3 in A2451 (dunkelblau) ist 3.4 Å von O2 im Yarus-Inhibitor entfernt (siehe auch Abbildung 9). Der Abstand zwischen O2 und der 2'-Desoxy-Position A76 des Yarus-Inhibitors wiederum beträgt nur 2.8 Å (siehe Pfeile). Hellblaue Beschriftung: ausgewählte rRNA-Reste der Domäne V der 23S-rRNA einschließlich der Basen der A- und P-Schleife, die an der Fixierung der CCA-Enden von A- und P-Stellen-tRNAs beteiligt sind (*E. coli*-Nummerierung); gestrichelte Linien: Wasserstoffbrücken. Farbschema der rRNA-Nucleotide: O rot, P gelb, N blau, C dunkelblau. Abbildung a und b wurden aus den pdb-Dateien 1FFZ^[69] und 1KQS^[87] mithilfe von Swisspdb-Viewer^[55] erzeugt und mit POVRAY ausgegeben.

und so die Bildung einer Peptidbindung durch exakte Fixierung der α -Aminogruppe zu unterstützen. Das Reaktionsschema würde in etwa dem in Abbildung 9 gleichen und ist in der entsprechenden Legende näher beschrieben.

Eine solche straffe Fixierung der CCA-Enden von P- und A-tRNA ist genau das, was man mit beiden Analoga beobachtet, die in 50S-Kristalle diffundiert wurden (Abbildung 11a), sowie dem Produkt mit Peptidbindung, das als Folge der Bindung der A- und P-Stellen-Substrate gebildet wurde (Abbildung 11b). In der P-Stelle ist das CCA-Ende in

seiner Position durch zwei Watson-Crick-Basenpaare (C74 und C75 mit G2252 bzw. G2251) verriegelt. A76 stapelt auf der Ribose von A2451 (deutlich zu erkennen in Abbildung 11b). In der A-Stelle ist das CCA-Ende der aa-tRNA auf dreierlei Weise fixiert: 1) durch Watson-Crick-Basenpaarung zwischen C75 und G2553, 2) durch ein „A-minor“-Motiv des Typs I zwischen A76 und dem Basenpaar G2583–U2506 und c) durch eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen der 2'-HO-Gruppe von A76 und U2585. Die straffe Fixierung der CCA-Enden beider tRNAs in der A- und P-Stelle am PTF-Zentrum unterstreicht die Bedeutung des (rein physikalischen) Templat-Modells für die Bildung der Peptidbindung, demzufolge eine präzise stereochemische Fixierung hauptsächlich für die Beschleunigung der Reaktion maßgeblich ist. Die Geschwindigkeit der Bildung einer Peptidbindung am Ribosom beträgt etwa 50 s^{-1} , was einer Beschleunigung gegenüber der nichtkatalysierten Reaktion (d.h. in Abwesenheit von Ribosomen) um einen Faktor ca. 10^5 entspricht.^[91] Die ribosomale PTF-Reaktion ohne chemische Katalyse (d.h. wenn die ionisierbare Gruppe des Ribosoms bei $\text{pH} < 7$ protoniert ist) verläuft mit einer Geschwindigkeit von etwa 0.5 s^{-1} ^[89] und ist somit immer noch etwa 1000-mal schneller als die nichtkatalysierte Reaktion. Falls diese Abschätzung korrekt ist, dann trägt der rein physikalische Effekt (die exakte stereochemische Ausrichtung der Reaktanten) zur Beschleunigung der Peptidbildung etwa zehnmal mehr bei als der katalytische Effekt.

2.3.3. Hemmungsmechanismen von Antibiotika auf der 50S-Untereinheit

Die funktionelle Bedeutung der rRNA an den ribosomalen aktiven Zentren spiegelt sich darin wider, dass klinisch relevante Antibiotika dort ihre Wechselwirkungsstelle haben und die PTF-Aktivität inhibieren. Beispiele sind Chloramphenicol (Cam) und Clindamycin.^[11] Cam ist ein spezifischer bakterieller Hemmer des CCA-Endes der A-Stellen-tRNA,^[92] hemmt aber nicht die CCA-Fixierung der P-Stellen-tRNA.^[93] Die Bindestelle von Cam wurde mit 3.5 \AA Auflösung bestimmt, indem 50S-Kristalle von *D. radiodurans* mit dem Antibiotikum durchtränkt wurden.^[11] Cam wechselwirkt mit sieben Nucleotiden innerhalb des PTF-Zentrums. Einige dieser Wechselwirkungen sind indirekt und werden vermutlich durch Mg^{2+} -Ionen vermittelt. Da funktionell wichtige Molekülteile von Cam diese Wechselwirkungen eingehen, ist vermutlich die Gegenwart dieser Ionen von größter Bedeutung für die Cam-Bindung und die resultierende PTF-Hemmung. Eines der Moleküle von Cam ist zum CCA-Ende der A-Stellen-tRNA gerichtet und kann vermutlich sogar das CCA-Ende verdrängen. Diese Beobachtung stimmt mit dem Befund überein, dass zwar die Bindung einer A-tRNA in Gegenwart von Cam möglich ist, es aber nicht zur Peptidbindung kommt, weil Cam das CCA-Ende der A-Stellen-tRNA aus seiner korrekten Position verdrängt. In vitro wurde gezeigt, dass die Cam-Hemmung von der chemischen Struktur des Peptidylrestes in der P-Stelle und der des A-Stellen-Substrats abhängt. Insbesondere ist Chloramphenicol ein schwacher Hemmer in Gegenwart aromatischer Aminosäuren wie Phenylalanin. Vermutlich

können diese Aminosäuren die Chloramphenicolbindestelle besetzen, das Antibiotikum verdrängen und damit die Bildung einer Peptidbindung ermöglichen. Die deutliche Überlappung von Chloramphenicol und dem Aminosäurerest der A-Stellen-tRNA stützt die Vorstellung, dass der primäre Wirkungsmechanismus von Cam auf einer Verdrängung des Aminosäurerestes der A-Stellen-tRNA beruht, wodurch indirekt auch das CCA-Ende verdrängt wird.

Im Unterschied zum Chloramphenicol erstreckt sich die Bindestelle für das Lincosamid Clindamycin sowohl über A- und P-Stellen des PTF-Zentrums.^[11] Im Wesentlichen sind Wasserstoffbrücken zwischen Hydroxygruppen der Zuckerreste der Basen innerhalb des PTF-Zentrums beteiligt, ein Befund, der mit den bekannten Resistenzmutationen in Einklang ist. Die Prolingruppe von Clindamycin überlappt mit der Position, die die Phenylgruppe von Cam einnimmt, was die Wirkung auf die A-Stellen-tRNA erklärt. Das C8'-Atom vom Prolinrest des Clindamycins nähert sich bis auf 2.5 \AA dem N3-Atom von C2452 und kommt damit in die unmittelbare Umgebung der P-Stellen-gebundenen tRNA. Damit ist zu erwarten, dass Clindamycin die Positionierung der Aminosäurereste auf beiden Stellen stört.

Die Bindestellen von nicht weniger als sieben Mitgliedern der Makrolid-Familie wurden in Komplexen mit der 50S-Untereinheit identifiziert.^[11,74] Diese große Antibiotikafamilie kann anhand der Größe des Lactonrings in drei Klassen eingeteilt werden. Erythromycin und zwei Erythromycin-derivate (Clarithromycin und Roxithromycin) gehören zur Klasse mit 14-gliedrigem Ring, und ihre jeweiligen Strukturen im Komplex mit der 50S-Untereinheit von *D. radiodurans* wurden gelöst.^[11] Von den beiden anderen Klassen mit größeren, 15- und 16-gliedrigen Ringen wurden die Bindestellen von Azithromycin, Spiramycin, Tylosin und Carbomycin A im Komplex mit der 50S-Untereinheit von *H. marismortui* bestimmt.^[74]

Die Bindepositionen dieser Makrolide befinden sich im Allgemeinen übereinstimmend innerhalb des Polypeptid-tunnels, dicht unterhalb des PTF-Zentrums. In dieser Position können die Makrolide den Tunnel und damit die Passage der wachsenden Polypeptidkette blockieren (Abbildung 12). Dies erklärt den Befund, dass Makrolide translatierende Ribosomen nicht hemmen, da die Gegenwart der Polypeptidkette im Tunnel das Eindringen des Makrolids verhindert. Ribosomen, die bereits vor der Proteinsynthese Makrolide gebunden haben, können je nach Makrolid noch Oligopeptide mit bis zu fünf Aminosäuren synthetisieren. Da der Lactonring der gebundenen Makrolide so im Tunnel platziert ist, dass die Zuckerreste von der C5-Position aus in Richtung PTF-Zentrum zeigen, bestimmt die Länge dieser Makrolid-seitenkette die Zahl der Peptidbindungen, die bei gebundenem Makrolid geknüpft werden. Zum Beispiel werden in Gegenwart von Erythromycin, das einen Monosaccharidrest an der C5 Position trägt, Tri- und Tetrapeptide gebildet, während Tylosin und Spiramycin, die an der entsprechenden Stelle Disaccharidreste tragen, nur die Bildung von Dipeptiden zulassen. Carbomycin A, das eine zusätzliche Isobutyrylgruppe am C5-Disaccharidrest trägt, hemmt sogar die Bildung der ersten Peptidbindung. Die Isobutyrylgruppe von Carbomycin A reicht so weit in das PTF-Zentrum, dass es die

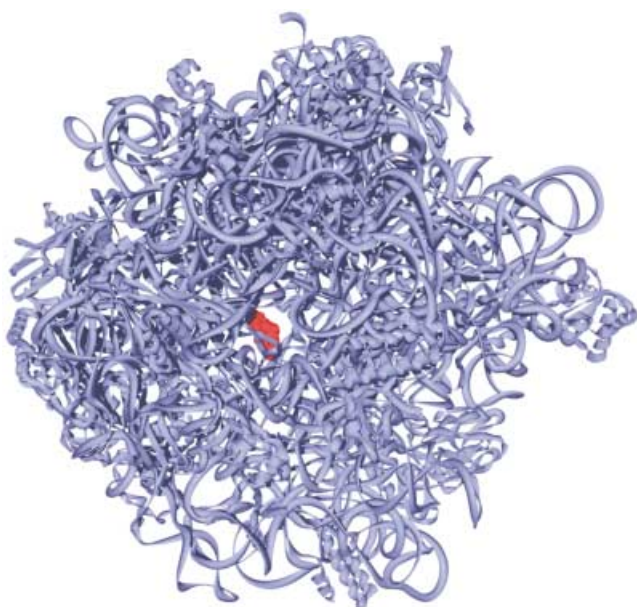


Abbildung 12. Das Makrolid Carbomycin A bindet im Tunnel der *H. marismortui*-50S-Untereinheit. rRNA und Proteine sind als violette Bänder dargestellt, Carbomycin A als rotes Kalottenmodell. Die 50S-Untereinheit wird von der cytoplasmatischen Seite (der „Rückseite“) aus betrachtet. Die Abbildung wurde aus der pdb-Datei 1K8A^[74] mithilfe vom Swisspdb-Viewer^[55] erzeugt und mit POVRAY ausgegeben.

Position einnimmt, auf der sich normalerweise der Aminosäurerest des A-Stellen-Substrats befindet.^[74] Die direkte Wechselwirkung der Makrolide mit Position 2058 macht verständlich, dass Modifikationen oder Mutationen an dieser Position in *E. coli* eine Resistenz gegen diese Antibiotikaklasse erzeugen. Erythromycin und dessen Derivate sowie Azithromycin berühren nicht die ribosomalen Proteine L4 oder L22, sodass die Mutationen dieser Proteine, die zur Resistenz gegen diese Antibiotika führen, indirekt über Konformationsänderungen der 23S-rRNA wirken müssen.

Eine weitere überraschende Entdeckung war die Bildung einer reversiblen kovalenten Bindung zwischen dem Formylmethylsubstituenten an C6 der 16-Ring-Makrolide und N6 von A2062 (*E. coli*).^[74] Die Bildung dieses Aminoalkohols ist spezifisch für die Klasse der 16-gliedrigen Makrolide, da die kleineren Makrolide keine entsprechende Aldehydfunktion aufweisen. Schließlich soll nicht unerwähnt bleiben, dass zwei Forschungsgruppen zwar in guter Übereinstimmung die Bindestellen der untersuchten Makrolide identifiziert haben, aber einige signifikante Diskrepanzen hinsichtlich Orientierung und Konformation der Lactonringe und des Cladinosezuckers der Makrolide bestehen. Einer der Studien zufolge scheint eine Wechselwirkung mit der Tunnelwand über die hydrophobe Seite des Lactonringes vorzuliegen, während die zweite Studie auf eine Wechselwirkung über eine Serie von Wasserstoffbrücken schließen lässt. Ob die Diskrepanz auf einer unterschiedlichen Interpretation, einer unterschiedlichen Bindung der Ribosomen verschiedener Organismen oder tatsächlich auf unterschiedlichen Arten der Makrolidbindung beruht, ist unklar. Die letzte Möglich-

keit scheint unwahrscheinlich zu sein, da Azithromycin und Erythromycin sich nur durch die Abwesenheit eines Keto-sauerstoffs und die Anwesenheit eines Methylstickstoffs unterscheiden. Eine erneute Analyse dieser Strukturen sowie die Wahl identischer Antibiotika für beide Ribosomentypen sollte das Problem lösen.

2.4. Translokation von P- und A-Stellen tRNA innerhalb des Ribosoms

Nach der Bildung einer Peptidbindung verändert sich die Position der tRNAs nicht. Dies wurde mithilfe von Kryo-EM-Analysen von *E. coli*-Ribosomen gezeigt^[19] sowie bezüglich der CCA-Enden durch Einweichen von A- und P-Substraten in aktive 50S-*H. marismortui*-Kristalle und anschließende Strukturlösung der Reaktionsprodukte.^[87] Nach der Peptidbildung muss das Ribosom die Produkte weiterleiten – die Peptidyl-tRNA von der A- in die P-Stelle und gleichzeitig die Desacyl-tRNA von der P- in die E-Stelle –, wodurch das Ribosom vom prä- in den posttranslokationalen Zustand überführt wird (Abbildung 2c und f). Bei diesem als Translokation bezeichneten Prozess müssen die Enden der tRNA-Moleküle mit hoher Genauigkeit bewegt werden: Der Anticodon-Codon-Komplex muss exakt um 10 Å (die Länge eines Codons) weiterrücken, da das Ribosom bei einer Bewegung um eine längere oder kürzere Strecke seinen Leserahmen verlieren würde. Am anderen Ende der Peptidyl-tRNA in der A-Stelle muss auch die CCA-Region präzise von der A-Stelle in die P-Stelle des PTF-Zentrums geführt werden, um die nächste PTF-Reaktion mit der anschließend gebundenen A-Stellen-tRNA zu ermöglichen. Eine unpräzise Platzierung der Peptidyl-tRNA in der P-Stelle wäre verhängnisvoll für die Peptidbindung und würde zum Abbruch der Translation führen.

Ribosomen können auch ohne äußere Hilfe die Translokation ausführen, allerdings ist diese Reaktion um mehr als eine Größenordnung langsamer als die EF-G-katalysierte Reaktion.^[94] Daraus folgt, dass die für die Bewegung der tRNAs notwendigen Strukturen Teile des Ribosoms sind und die Rolle von EF-G/EF2 sich darauf beschränkt, die Aktivierungsbarriere herabzusetzen, die die beiden Typen der tRNA-Positionierung (A plus P und P plus E) trennt. Wichtige Fragen bleiben bislang unbeantwortet, z. B. auf welche Weise EF-G/EF2 die Translokation fördert und welche ribosomalen Komponenten an dem Transfer der tRNAs beteiligt sind.

2.4.1. Konservierung der Bindestelle des Elongationsfaktors G

Die Kristallstruktur von EF-G wurde in Abwesenheit von Nucleotiden^[48] und im Komplex mit GDP gelöst (Abbildung 5a).^[47] Die GTP-Form ist die aktive Form, die an das Ribosom bindet und die Translokation auslöst. GTP-Hydrolyse inaktiviert EF-G und dissoziiert es vom Ribosom (siehe Übersicht von Kaziro^[95]). EF-G gehört zur selben Unterfamilie von G-Proteinen wie IF2, RF3 und EF-Tu. Letztgenanntes wurde in der aktiven GTP-haltigen und inaktiven GDP-haltigen Form kristallisiert; beide Formen unterscheiden sich durch eine drastische Domänenverlagerung.^[50]

Kryo-EM-Rekonstruktionen von EF-G-70S-Komplexen bei 17.5–20 Å Auflösung^[96–98] und EF2-Komplexen mit dem eukaryotischen 80S-Ribosom bei 17.5 Å Auflösung^[99] zeigen eine ähnliche Bindestelle für beide Faktoren (Abbildung 13a und b). In beiden Komplexen wurden Antibiotika eingesetzt, um den Elongationsfaktor auf dem Ribosom festzuhalten.

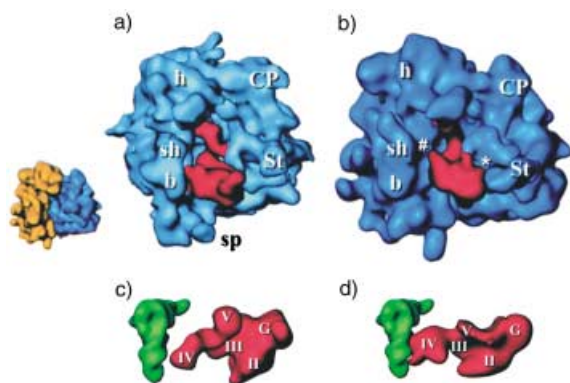


Abbildung 13. Kryo-EM-Bilder (Seitenansicht) des EF-G-70S-Komplexes von *E. coli* (a) und des EF2-80S-Komplexes von *S. cerevisiae* (b); auf der linken Seite befindet sich die kleine, auf der rechten die großen Untereinheit. Aus der gleichen Perspektive ist links ein leeres 80S-Ribosom verkleinert dargestellt (gelb: 40S, blau: 60S). Die untere Reihe zeigt die relativen Orientierungen von EF-G (rot) und der P-tRNA (c) sowie von EF2 (rot) und der P-tRNA (d). Die Abkürzungen der Orientierungspunkte sind dieselben wie in Abbildung 1. Die römischen Ziffern von EF-G und EF2 beziehen sich auf die Domänen dieser Faktoren. Wiedergabe in veränderter Form nach Gomez-Lorenzo et al.^[99]

EF-G wurde an das 70S-Ribosom mithilfe des Antibiotikums Fusidinsäure fixiert. Dieses lässt die Translokation und GDP-Hydrolyse zu, blockiert aber den Konformationswechsel zur GDP-Konformation des Faktors und verhindert damit die Dissoziation vom Ribosom. Das eukaryotische eEF2 wurde an das Ribosom mithilfe des Antibiotikums Sordarin fixiert, von dem man eine zur Fusidinsäure analoge Wirkung annimmt.^[99] Dieser Komplex wurde in einem typischen prätranslationalen Zustand gebildet, d.h., es waren A- und P-tRNA vorhanden. Erwartungsgemäß wurden die tRNAs in die P- und E-Stellen transloziert. Von besonderem Interesse war, dass die Spitze der Domäne IV von EF-G die Position der A-Stelle einnimmt. Ähnliches wurde mit EF2 im EF2-Ribosomen-Komplex beobachtet (Abbildung 13c und d). Eine EF-G-vermittelte Translokation ist auch in Gegenwart eines nichthydrolysierbaren GTP-Analogons wie GDPNP möglich, was den Schluss zulässt, dass die Bindung von EF-G-GTP für die Translokation und die Hydrolyse für die Konformationsänderung von EF-G sowie die daraus resultierende Entlassung von EF-G-GDP maßgeblich ist.^[95]

Im Falle eines typischen G-Proteins stimuliert ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) die G-Protein-vermittelte Hydrolyse von GTP. Im Falle von EF-G/EF2 übernehmen Komponenten des Ribosoms die Funktion von GAP. Die Bindung eines Elongationsfaktors an das Ribosom löst große sichtbare Konformationsänderungen am Ribosom aus. Eine auffallende Änderung betrifft die „Stalk“-Region, deren Elektronendichte in leeren 70S- und 80S-Ribosomen nicht

aufgelöst werden kann, aber nach EF-G/EF2-Bindung geordnet erscheint,^[96,97,99] was die identische und universelle Funktion dieser Region bei der Faktorbindung belegt. Ein hervorragender Kandidat für die Übernahme der GAP-Funktion ist eine Region der 23S-rRNA, die als Sarcin-Ricin-Schleife (SRL) bezeichnet wird, sowie der pentamere Stalk-Komplex der ribosomalen Proteine L10(L7/L12)₄. Die Benennung der SRL-Struktur geht auf die Tatsache zurück, dass eine hochspezifische RNase, das α -Sarcin, eine Phosphodiesterbindung hinter G2661 der bakteriellen 23S-rRNA spaltet und damit jegliche Elongationsfaktor-abhängige Aktivität unterbindet.^[100] Ähnliche Effekte wurden nach Entfernung der benachbarten Base A2660 (*E.-coli*-Nomenklatur) in der 26S-rRNA von Hefe durch die N-Glycosidase-Aktivität der Ricin-A-Kette beobachtet.^[101] Diese Region enthält die längste universell konservierte Sequenz der rRNA (zwölf Nucleotide), was ihre herausragende funktionelle Bedeutung unterstreicht.

Kürzlich wurden Hybridribosomen aufgebaut, bei denen die Proteine des GTPase-Zentrums von *E. coli*, L7/L12 und L10, durch die eukaryotischen Analoga P1/P2 und P0 von der Ratte ersetzt wurden.^[102] Sowohl die In-vitro-Translation als auch die GTPase-Aktivität der resultierenden Hybridribosomen hingen nun von der Gegenwart der eukaryotischen Elongationsfaktoren EF2 und EF1a ab, und nicht mehr von ihren bakteriellen Gegenstücken EF-G und EF-Tu. Dies spiegelt nicht nur die Spezifität der Wechselwirkung zwischen den Stalk-Proteinen und Elongationsfaktoren in jedem Reich von Lebewesen wider, sondern auch die Bedeutung der Stalk-Proteine bei der Vermittlung der Elongationsfaktor-GTPase-Aktivität.

Mitunter wird das ribosomale Protein L11 (und die mit L11 assoziierte Bindestelle auf der 23S-RNA) als Kandidat für die Übernahme einer GAP-Funktion betrachtet. Die Grund ist, dass Mutationen sowohl in L11 als auch in seiner Bindestelle auf der 23S-RNA eine Resistenz gegen das Antibiotikum Thiostrepton, einen potenten Hemmer der EF-G- und EF-Tu-abhängigen GTPase-Aktivität, hervorrufen können.^[103] Eine direkte Beteiligung von L11 in der faktorabhängigen GTPase ist allerdings anzuzweifeln, da L11-freie Mutanten zwar lebensfähig, aber stark beeinträchtigt sind,^[104] und weil die IF-2-abhängige GTPase durch Thiostrepton eher stimuliert als blockiert wird.^[105] In die gleiche Richtung weisen Experimente, bei denen entweder das Pentamer L10(L7/L12)₄ oder L11 durch die entsprechenden Rattenproteine ersetzt wurden. Diesen Studien zufolge ist ausschließlich der P0(P1-P2)₂-Komplex, nicht jedoch das eukaryotische Gegenstück zu L11 (RL12) für die Faktorspezifität und die assoziierte GTPase-Abhängigkeit maßgeblich, obwohl Zugabe von L11 oder RL12 die Proteinsynthese signifikant stimulierte.^[102] Die Funktion von L11 ist demnach unklar. In allen Fällen zumindest befindet sich L11 in unmittelbarer Nähe zu den Elongationsfaktoren: Kryo-EM-Analysen von EFG-70S-Komplexen belegen, dass durch die Bindung von EFG die N-terminale Domäne von L11 verschoben wird und eine bogenähnliche Verbindung mit der G-Domäne von EF-G bildet.^[106] Diese bogenähnliche Verbindung wird auch im EF2-80S-Komplex beobachtet, erscheint hier aber breiter und stärker verschmolzen.^[99]

2.4.2. Dynamik innerhalb des Ribosoms

Gemäß dem α - ϵ -Modell der Translokation liegt vermutlich eine bewegliche Domäne innerhalb des Ribosoms vor, die A- und P-Stellen-tRNA während der Translokation trägt und befördert (siehe Übersicht in Lit. [107]). Dieses Modell geht auf Experimente zurück, in denen die Zugänglichkeit der Phosphatgruppen der tRNAs in prä- und posttranslokationalen Zuständen untersucht wurde. Das wesentliche Ergebnis war, dass sich die Schutzmuster der A- und P-tRNAs zwar stark voneinander unterscheiden, aber jede der beiden tRNAs ihr Schutzmuster bei der Verschiebung vom prä- in den posttranslokationalen Zustand beibehält. Dieser Befund lässt vermuten, dass während der Translokation die molekulare Umgebung der tRNAs unverändert bleibt, und bestimmte ribosomale Komponenten die tRNAs binden und so vom prä- in den posttranslokationalen Zustand überführen. Es existiert eine Reihe von Kandidaten, die eine Rolle bei der Translokation der tRNAs spielen könnten oder als Bestandteil der beweglichen Domänen infrage kommen.

Dass bestimmte Regionen innerhalb der ribosomalen Kristallstrukturen ungeordnet sind, spiegelt wahrscheinlich deren Flexibilität wider. Ein klassisches Beispiel ist die Stalk-Region, die, wie schon erwähnt, durch die Bindung eines Elongationsfaktors geordnet wird. Weiter zu erwähnen ist die gegenüberliegende Ausstülpung der 50S-Untereinheit, die L1-Region, deren Flexibilität vermutlich die Entlassung der E-Stellen-tRNA vermittelt (siehe Abschnitt 2.5). Andere Strukturen werden entweder geordnet oder während der Assoziation der Untereinheiten verschoben. Die meisten dieser Elemente sind Bestandteile der Brücken zwischen den Untereinheiten. Ein prominentes Beispiel ist die universell konservierte Helix H69 in der Domäne IV der rRNA der großen ribosomalen Untereinheit. H69 ist das wesentliche Element der Brücke B2a, der größten Brücke zwischen den Untereinheiten (siehe Abbildung 3), die ungeordnet in der 50S-Struktur von *H. marismortui*, aber geordnet in der von *D. radiodurans* erscheint. Ein Vergleich der *D. radiodurans*-50S-Struktur mit der 70S-Struktur von *Thermus thermophilus* verdeutlicht, dass H69 nach Assoziation der Untereinheiten in Richtung h44 schwingt, was dessen hohe Flexibilität belegt. In dieser ausladenden Konformation von H69 existieren wahrscheinlich Wechselwirkungen mit beiden tRNAs in A- und P-Stellen.^[108] Ein anderes, bislang nicht vollständig gelöstes Element in beiden 50S-Strukturen ist H38 der Domäne II, ein Bestandteil der Brücke B1a (oft als „A-Stellen-Finger“ bezeichnet, weil es die A-Stellen-tRNA berührt). Wie schon erwähnt, haben die Elemente der B1a- und B2a-Brücken Gegenstücke im 80S-Heferibosom, was ihre mögliche Rolle bei der Translokation untermauert.

2.5. Die E-Stelle und die Genauigkeit der Translation

2.5.1. Entdeckung einer dritten universellen tRNA-Bindestelle auf dem Ribosom

Die E-Stelle in bakteriellen Ribosomen wurde zwar bereits in den frühen 80er Jahren entdeckt,^[109,110] fand aber erst in jüngster Zeit in einigen Lehrbüchern Erwähnung. Bei

jeder Ribosomenart, die in dieser Hinsicht erforscht wurde, ist man fündig geworden. So wurde die E-Stelle in Archaea entdeckt^[111] sowie in Eukaryoten sowohl in Hefe^[112] als auch in Säugern,^[113] was darauf schließen lässt, dass die E-Stelle ein universelles Merkmal von Ribosomen ist. Die E-Stelle ist spezifisch für desacylierte tRNA und kann weder eine Peptidyl- noch eine Aminoacyl-tRNA binden. Dies ist in Einklang mit der Funktion der E-Stelle, ausschließlich desacylierte tRNA von der P-Stelle anzunehmen, nachdem die wachsende Polypeptidkette auf die A-tRNA übertragen worden ist. Ein Teil der Kontroverse über die Existenz der E-Stelle geht auf das Konto bestimmter artifizierender Pufferbedingungen, unter denen die Bindung der Desacyl-tRNA in der E-Stelle instabil wird (siehe Übersicht in Lit. [107]). Hingegen konnte eine stabile Bindung in die E-Stelle unter physiologischen Pufferbedingungen, so in Gegenwart von geringen Magnesiumkonzentrationen (3–6 mM) und Polyaminen, nachgewiesen werden. Überzeugend belegt wurde die Dissoziation der E-tRNA unter nichtphysiologischen Pufferbedingungen mit Kryo-EM, mit der die tRNAs in posttranslokationalen Komplexen bei unterschiedlichen Pufferbedingungen untersucht wurden.^[114,115] Unter nichtphysiologischen Bedingungen ging die E-tRNA-Elektronendichte verloren, und eine zusätzliche Elektronendichte erschien um die L1-Protuberanz (bezeichnet als E2-Stelle). Es wurde spekuliert, dass diese Position den Weg der tRNA aus dem Ribosom nach dem Verlassen der E-Stelle markiert und die hoch flexible L1-Protuberanz eine Rolle bei der Dissoziation der E-Stellen-tRNA vom Ribosom spielt. Diese Vorstellung wurde kürzlich durch einen Vergleich von *D. radiodurans*-50S-Kristallen mit den Kristallen von *T. thermophilus*-70S-Ribosom gestützt, demzufolge die Positionen der L1-Arme um 30° differieren (Abbildung 14). In der 70S-Struktur befindet sich der L1-Arm nicht am Ribosomenkörper; er

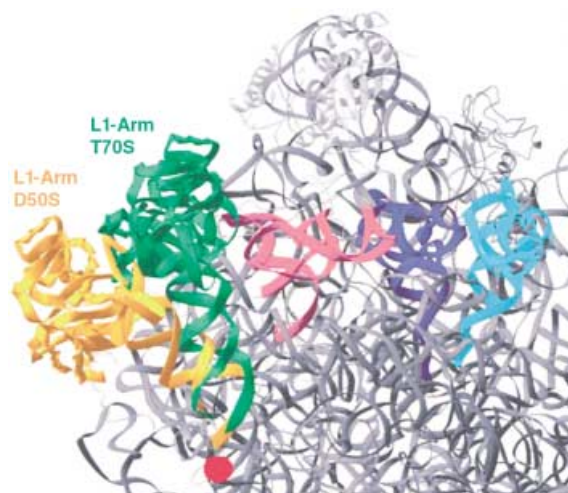


Abbildung 14. Bewegung des L1-Armes. Ein Ausschnitt der 50S-Kristallstruktur von *D. radiodurans*, die die 23S-rRNA in Grau und den L1-Arm in Gelb zeigt. Die Position des L1-Armes von *T. thermophilus*-70S-Kristallen wurde in Grün darübergelegt, der rote Punkt markiert den vermutlichen Drehpunkt des L1-Armes. Die Positionen der A- (cyan), P- (blau) und E-tRNAs (rosa) sind ebenfalls dargestellt, wobei der Anticodon-Arm zum Betrachter zeigt. Wiedergabe nach Harms et al.^[108]

berührt den Ellenbogen der E-Stellen-tRNA und verhindert so die tRNA-Entlassung vom Ribosom. Demgegenüber ist der L1-Arm in der *D.-radiodurans*-Struktur offen und ermöglicht die Entlassung der E-tRNA während der Translation.^[108] Tatsächlich könnte auch dieser Mechanismus universell sein. Bei einem Vergleich eines P-tRNA-gebundenen Hefe-80S-Ribosoms (im pseudoprätranslokationalen Zustand) mit einem während der Translation angehaltenen Ribosom (im künstlich induzierten posttranslokationalen Zustand) wurde eine stark unterschiedliche Position des L1-Armes (um 70 Å) festgestellt.^[3,4] Angesichts der konformationalen Flexibilität des L1-Armes (siehe unten) muss die E2-Elektronendichte nicht zwangsläufig einer tRNA entsprechen, die das Ribosom bereits verlassen hat, sondern könnte auch einen lokalen pufferinduzierten Konformationswechsel des Ribosoms widerspiegeln.

Endgültig bestätigt wurde die Existenz der E-Stelle durch Kryo-EM-Analyse der tRNA-Positionen sowohl im aktiven Ribosom^[19] als auch in einem artifiziellen 70S-Kristall von *Thermus-thermophilus*-Ribosomen, der mRNA und drei desacylierte tRNAs enthielt.^[76] Die E-tRNA im 70S-Kristall ist eine endogene E-tRNA, die mit den Ribosomen isoliert wurde, was die außerordentliche Stabilität der tRNA-Bindung trotz der langwierigen Isolierungsprozedur illustriert. Heute ist die Existenz der E-Stelle allgemein akzeptiert, auch wenn ihre Bedeutung noch nicht völlig anerkannt ist.

2.5.2. Bedeutung der E-Stelle: Genauigkeit der Translation und Erhaltung des Leserahmens

Allein die Tatsache, dass die E-Stelle sowohl in Prokaryoten- als auch in Eukaryoten-Ribosomen existiert, lässt eine wichtige Funktion bei der Translation vermuten. Tatsächlich wurde gezeigt, dass die Gegenwart einer desacylierten tRNA in der E-Stelle die Selektion der Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle moduliert (siehe Übersicht in Lit. [116]). Insbesondere induziert eine besetzte E-Stelle eine schwach affine A-Stelle so, dass deren Wechselwirkung mit einem ternären Komplex im Wesentlichen vom Anticodon bestimmt wird. Diese Konstellation lässt ausschließlich die Bindung von cognaten und nah-cognaten tRNAs in die A-Stelle zu, während 90 % der konkurrierenden nichtcognaten tRNA ausgeschlossen werden (die Bedeutung dieses Befundes wurde in Abschnitt 2.2.1 diskutiert). Falls jedoch die E-Stelle keine tRNA enthält, befindet sich die A-Stelle in einem hoch affinen Zustand und ermöglicht auf diese Weise die Wechselwirkung mit allen tRNAs, was sogar einen Fehleinbau von nichtcognaten tRNAs einschließt. Diese Folgerungen wurden aus In-vitro-Experimenten abgeleitet.^[117] Dabei konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart einer tRNA nur in der P-Stelle sowohl nichtcognate Asp-tRNA als auch cognate Phe-tRNA an ein A-Stellen-UUU-Codon binden (Abbildung 15a), während in Gegenwart einer tRNA sowohl in der E-Stelle als auch in der P-Stelle ausschließlich die cognate Phe-tRNA in die A-Stelle bindet (Abbildung 15b,c). Die Bindung einer A-tRNA entlässt die E-tRNA aus der E-Stelle, sodass zu jedem Zeitpunkt der Translation – außer im Decodierungsschritt – nie mehr als zwei tRNAs auf dem

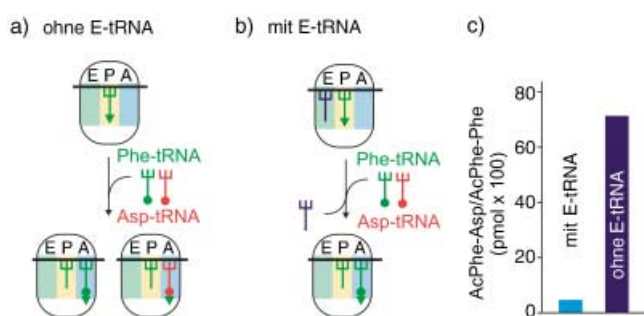


Abbildung 15. Die Rolle der E-Stelle für die Genauigkeit der Decodierung. Ribosomenkomplexe wurden präpariert, die eine Poly(U)-mRNA und in der P-Stelle eine AcPhe-tRNA tragen. A-Stellen-Bindung einer cognaten Phe-tRNA (Codon UUU) und einer nichtcognaten Asp-tRNA (Codon GAC/U) wurde ohne (a) oder mit einer E-tRNA (b) ausgelöst. Die Bindung der Phe- oder Asp-tRNA in die A-Stelle wurde über die Bildung des entsprechenden Dipeptids AcPhe-Phe oder AcPhe-Asp detektiert (c). In Abwesenheit einer E-tRNA wurden sowohl AcPhe-Phe und AcPhe-Asp gefunden, was den Fehleinbau einer Asp-tRNA in der A-Stelle beweist, während in Gegenwart von E-tRNA ausschließlich AcPhe-Phe in üblichen Mengen gefunden wurde; somit kann unter diesen Bedingungen ausschließlich die cognate Phe-tRNA in die A-Stelle binden. Die Daten stammen von Geigenmüller et al.^[117]

Ribosom vorhanden sind. Darüber hinaus muss in der E-Stelle eine cognate Desacyl-tRNA vorhanden sein, da die Gegenwart einer nah-cognaten E-tRNA den Fehleinbau einer Asp-tRNA nicht verhindern konnte.^[117] Dieser Befund, dass eine cognate tRNA in der E-Stelle vorliegen muss, weist darauf hin, dass die Codon-Anticodon-Wechselwirkung in der E-Stelle als Signal für das Ribosom gilt, den posttranslokationalen Zustand einzunehmen und damit eine schwach affine A-Stelle zu präsentieren. Weitere Hinweise für eine Codon-Anticodon-Wechselwirkung an der E-Stelle stammen von Untersuchungen der *gag-pol*-Recodierungsstelle von HIV-1. Ribosomen recodieren an dieser Stelle mithilfe eines posttranslokationalen Rutschmechanismus, d.h. durch Verschieben in den –1-Leseraster nach der Translokation, wobei sowohl die P- als auch die E-tRNA gleichzeitig in die –1-Richtung rutschen.^[118] Die Zahl von sieben Nucleotiden in der „Rutsch-Sequenz“ weist auf eine Codon-Anticodon-Wechselwirkung in der P- und E-Stelle hin (sechs Nucleotide) plus eine Rutschposition in den –1-Leseraster. Eine andere Recodierungsstelle illustriert ebenfalls die Bedeutung der E-Stelle bei der Leserasterverschiebung während der Translation von RF2. An der Codonposition 26 befindet sich ein Stoppcodon UGA innerhalb der RF2-mRNA; an dieser Stelle ist eine +1-Leserasterverschiebung notwendig, um einen internen UGA-Stopp zu vermeiden und die Synthese von RF2 zu vervollständigen. Ein wesentliches Merkmal, das den Leserasterwechsel unterstützt, ist in diesem Falle eine stromaufwärts liegende Sequenz vom Shine-Dalgarno(SD)-Typ, die mit der komplementären Anti-SD-Sequenz innerhalb der 16S-RNA auf der 30S-Untereinheit wechselwirkt. Interessanterweise schließt diese SD-anti-SD-Wechselwirkung die erste Codonposition der E-Stelle mit ein. Tatsächlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass der SD-anti-SD-Duplex die E-tRNA verdrängt

und damit die Leserasterverschiebung vermittelt.^[119] Damit wurde belegt, dass die E-Stelle auch eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des korrekten Leserasters während der Translation spielt.

3. Zusammenfassung und Ausblick

Auch wenn in den letzten Jahren viele Details der Ribosomenstruktur und -funktion aufgeklärt wurden, existieren reichlich Fragen, deren Beantwortung noch aussteht. Einige dieser Fragen betreffen fundamental den Prozess der Translation: Über welchen Mechanismus verlaufen Peptidbildung und Translokation? Welche Rolle spielt der universell konservierte Tunnel in der großen ribosomalen Unter-einheit? Viele weitere, eher periphere Fragen tauchen hinsichtlich der Translationsregulierung auf. Klärungsbedarf erfordert insbesondere die eukaryotische Translation, an der zahlreiche Faktoren, weitere ribosomale Proteine und zusätzliche rRNA-Sequenzen beteiligt sind. Einige Antworten wird die höhere Auflösung der Strukturen ribosomaler Funktionskomplexe geben. Voraussetzung dafür ist die Herstellung geeigneter Kristalle, sodass es nicht einfach ist, einen Zeitrahmen anzugeben, innerhalb dessen die Strukturen eukaryotischer ribosomaler Kristalle oder bestimmter Funktionskomplexe prokaryotischer Ribosomen, z.B. prä- und posttranslokationale Zustände oder im Komplex mit großen Translationsfaktoren, zugänglich werden. Ein anderer Aspekt betrifft die Tatsache, dass diese Kristallstrukturen statisch sind, das Ribosom aber eine hoch dynamische Maschine ist. Es bedarf deshalb eines konzertierten Forschungsansatzes unter Anwendung sowohl biochemischer als auch biophysikalischer Methoden, um die Mechanismen zu zergliedern und zu verstehen. Wenn wir daran denken, dass die Proteinsynthese fundamental für alle Lebensprozesse ist und ihre Untersuchung Einblicke allgemeiner Art in molekulare Wechselwirkungen und evolutionäre Prozesse und Zusammenhänge gewährt, ist es ratsam, bei der Erforschung dieser komplexen molekularen Maschine nicht nachzulassen!

Abkürzungen

A-Stelle	Aminoacyl(aa)-tRNA-Stelle
A-tRNA	tRNA in der A-Stelle
CTD	Carboxyl-terminierte Domäne
E-Stelle	Austrittsstelle, spezifisch für desacylierte tRNA
E-tRNA	tRNA in der E-Stelle
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
NTD	Amino-terminierte Domäne
POST	posttranslokationaler Zustand
PRE	prätranslokationaler Zustand
P-Stelle	Peptidyl-tRNA-Stelle vor der Peptidbildung
PTF	Peptidyltransferase
P-tRNA	tRNA in der P-Stelle
SD	Shine-Dalgarno-Sequenz
SRL	Sarcin-Ricin-Schleife
UTR	nichttranslatierter Abschnitt einer mRNA

Wir danken Christian Spahn für die Überlassung der Hochauflösungsbilder der Abbildung 1a–d, 3b, 8b und 8d, Özlem Tastan für die Überlassung der Abbildung 7 sowie Meredith Ross, Oliver Vesper und Sean Connell für das kritische Lesen unseres Manuskriptes. D.N.W. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für die Unterstützung und K.H.N. der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Beihilfen Ni174/8-2 und Ni174/9-2).

Eingegangen am 23. Juli 2002 [A544]

- [1] J. Frank, *Bioessays* **2001**, 23, 725–732.
- [2] P. Dube, M. Wieske, H. Stark, M. Schatz, J. Stahl, F. Zemlin, G. Lutsch, M. van Heel, *Structure* **1998**, 6, 389–399.
- [3] C. M. Spahn, R. Beckmann, N. Eswar, P. A. Penczek, A. Sali, G. Blobel, J. Frank, *Cell* **2001**, 107, 373–386.
- [4] R. Beckmann, C. M. Spahn, N. Eswar, J. Helmers, P. A. Penczek, A. Sali, J. Frank, G. Blobel, *Cell* **2001**, 107, 361–372.
- [5] a) D. G. Morgan, J. F. Menetret, A. Neuhof, T. A. Rapoport, C. W. Akey, *J. Mol. Biol.* **2002**, 324, 871–886; b) J. F. Menetret, A. Neuhof, D. G. Morgan, K. Plath, M. Radermacher, T. A. Rapoport, C. W. Akey, *Mol. Cell* **2000**, 6, 1219–1232.
- [6] R. Beckmann, D. Bubeck, R. Grassucci, P. Penczek, A. Verschoor, G. Blobel, J. Frank, *Science* **1997**, 278, 2123–2126.
- [7] T. Tenson, M. Ehrenberg, *Cell* **2002**, 108, 591–594.
- [8] B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartsch, V. Ramakrishnan, *Nature* **2000**, 407, 327–339.
- [9] F. Schlutzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi, A. Yonath, *Cell* **2000**, 102, 615–623.
- [10] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, 289, 905–920.
- [11] F. Schlutzen, R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. Franceschi, *Nature* **2001**, 413, 814–821.
- [12] a) V. Ramakrishnan, *Cell* **2002**, 108, 557–572; b) P. B. Moore, T. A. Steitz, *Nature* **2002**, 418, 229–235; c) A. Yonath, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2002**, 31, 257–273.
- [13] D. N. Wilson, G. Blaha, S. R. Connell, P. V. Ivanov, H. Jenke, U. Stelzl, Y. Teraoka, K. H. Nierhaus, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2002**, 3, 1–53.
- [14] P. Schimmel, B. Henderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 11283–11286.
- [15] D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., A. P. Carter, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *J. Mol. Biol.* **2002**, 316, 725–768.
- [16] R. R. Gutell, J. J. Cannone, Z. Shang, Y. Du, M. J. Serra, *J. Mol. Biol.* **2000**, 304, 335–354.
- [17] P. Nissen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 4899–4903.
- [18] a) J. H. Cate, A. R. Gooding, E. Podell, K. H. Zhou, B. L. Golden, C. E. Kundrot, T. R. Cech, J. A. Doudna, *Science* **1996**, 273, 1678–1685; b) A. R. Ferre-D'Amare, K. Zhou, J. A. Doudna, *Nature* **1998**, 395, 567–574.
- [19] R. K. Agrawal, C. M. T. Spahn, P. Penczek, R. A. Grassucci, K. H. Nierhaus, J. Frank, *J. Cell Biol.* **2000**, 150, 447–459.
- [20] L. P. Gavrilova, O. E. Kostishkina, V. E. Koteliensky, N. M. Rutkevitch, A. S. Spirin, *J. Mol. Biol.* **1976**, 101, 537–552.
- [21] S. Schilling-Bartetzko, A. Bartetzko, K. H. Nierhaus, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 4703–4712.
- [22] G. Z. Yusupova, M. M. Yusupov, J. H. Cate, H. F. Noller, *Cell* **2001**, 106, 233–241.
- [23] T. V. Pestova, V. G. Kolupaeva, I. B. Lomakin, E. V. Pilipenko, I. N. Shatsky, V. I. Agol, C. U. T. Hellen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 7029–7036.

- [24] A. Roll-Mecak, B. S. Shin, T. E. Dever, S. K. Burley, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 705–709.
- [25] C. Gualerzi, L. Brandi, E. Caserta, A. La Teana, R. Spurio, J. Tomsic, C. Pon in *The Ribosome. Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions* (Hrsg.: R. A. Garrett, S. R. Douthwaite, A. Liljas, A. T. Matheson, P. B. Moore, H. F. Noller), American Society for Microbiology, Washington, **2000**, S. 477–494.
- [26] A. P. Carter, W. M. Clemons, Jr., D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, T. Hartsch, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Science* **2001**, 291, 498–501.
- [27] M. Pioletti, F. Schlünzen, J. Harms, R. Zarivach, M. Glühmann, H. Avila, A. Bashan, H. Bartels, T. Auerbach, C. Jacobi, T. Hartsch, A. Yonath, F. Franceschi, *EMBO J.* **2001**, 20, 1829–1839.
- [28] A. Dallas, H. F. Noller, *Mol. Cell* **2001**, 8, 855–864.
- [29] A. Gnirke, K. H. Nierhaus, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 14506–14514.
- [30] A. Roll-Mecak, C. Cao, T. E. Dever, S. K. Burley, *Cell* **2000**, 103, 781–792.
- [31] I. S. Gabashvili, R. K. Agrawal, C. M. T. Spahn, R. A. Grassucci, D. I. Svergun, J. Frank, P. Penczek, *Cell* **2000**, 100, 537–549.
- [32] J. H. Cate, M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, T. N. Earnest, H. F. Noller, *Science* **1999**, 285, 2095–2104.
- [33] a) A. P. Potapov, *FEBS Lett.* **1982**, 146, 28–33; b) A. P. Potapov, F. J. Triana-Alonso, K. H. Nierhaus, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 17680–17684.
- [34] P. Nissen, M. Kjeldgaard, J. Nyborg, *EMBO J.* **2000**, 19, 489–495.
- [35] K. H. Nierhaus, *Mol. Microbiol.* **1993**, 9, 661–669.
- [36] M. Valle, J. Sengupta, N. K. Swami, R. A. Grassucci, N. Burkhardt, K. H. Nierhaus, R. K. Agrawal, J. Frank, *EMBO J.* **2002**, 21, 3557–3567.
- [37] H. Stark, M. V. Rodnina, H. J. Wieden, F. Zemlin, W. Wintermeyer, M. Van Heel, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 15, 15–20.
- [38] A. Weijland, A. Parmeggiani, *Science* **1993**, 259, 1311–1314.
- [39] J. M. Ogle, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., M. J. Tarry, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, *Science* **2001**, 292, 897–902.
- [40] J. J. Hopfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, 71, 4135–4139.
- [41] J. Ninio, *Biochimie* **1975**, 57, 587–595.
- [42] M. Ehrenberg, D. Andersson, K. Mohman, P. Jelenc, T. Ruusala, C. G. Kurland in *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes* (Hrsg.: B. Hardesty, G. Kramer), Springer, New York, **1986**, S. 573–585.
- [43] M. V. Rodnina, T. Daviter, K. Gromadski, W. Wintermeyer, *Biochimie* **2002**, 84, 745–754.
- [44] S. Schilling-Bartetzko, F. Franceschi, H. Sternbach, K. H. Nierhaus, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 4693–4702.
- [45] A. M. Karim, R. C. Thompson, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 3238–3243.
- [46] J. M. Ogle, F. V. Murphy, M. J. Tarry, V. Ramakrishnan, *Cell* **2002**, 111, 721–732.
- [47] J. Czworowski, J. Wang, T. A. Seitz, P. B. Moore, *EMBO J.* **1994**, 13, 3661–3668.
- [48] A. Aevansson, E. Brazhnikov, M. Garber, J. Zheltonosova, Y. Chirgadze, S. Alkaradaghi, L. A. Svensson, A. Liljas, *EMBO J.* **1994**, 13, 3669–3677.
- [49] M. Kjeldgaard, J. Nyborg, *J. Mol. Biol.* **1992**, 223, 721–742.
- [50] H. Berchtold, L. Reshetnikova, C. O. A. Reiser, N. K. Schirmer, M. Sprinzl, R. Hilgenfeld, *Nature* **1993**, 365, 126–132.
- [51] P. Nissen, M. Kjeldgaard, S. Thirup, G. Polekhina, L. Reshetnikova, B. F. C. Clark, J. Nyborg, *Science* **1995**, 270, 1464–1472.
- [52] M. Laurberg, O. Kristensen, K. Martemyanov, A. T. Gudkov, I. Nagaev, D. Hughes, A. Liljas, *J. Mol. Biol.* **2000**, 303, 593–603.
- [53] a) M. Selmer, S. Al-Karadaghi, G. Hirakawa, A. Kaji, A. Liljas, *Science* **1999**, 286, 2349–2352; b) K. K. Kim, K. Min, S. W. Suh, *EMBO J.* **2000**, 19, 2362–2370; c) T. Yoshida, S. Uchiyama, H. Nakano, H. Kashimori, H. Kijima, T. Ohshima, Y. Saihara, T. Ishino, H. Shimahara, K. Yokose, T. Ohkubo, A. Kaji, Y. Kobayashi, *Biochemistry* **2001**, 40, 2387–2396.
- [54] T. Toyoda, O. F. Tin, K. Ito, T. Fujiwara, T. Kumasaka, M. Yamamoto, M. B. Garber, Y. Nakamura, *RNA* **2000**, 6, 1432–1444.
- [55] N. Guex, M. C. Peitsch, *Electrophoresis* **1997**, 18, 2714–2723.
- [56] B. Vestergaard, L. Van, G. Andersen, J. Nyborg, R. Buckingham, M. Kjeldgaard, *Mol. Cell* **2001**, 8, 1375–1382.
- [57] H. Song, P. Mugnier, A. Das, H. Webb, D. Evans, M. Tuite, B. Hemmings, D. Barford, *Cell* **2000**, 100, 311–321.
- [58] B. P. Klaholz, T. Pape, A. V. Zavialov, A. G. Myasnikov, E. V. Orlova, B. Vestergaard, M. Ehrenberg, M. Van Heel, *Nature* **2003**, 421, 90–94.
- [59] U. B. Rawat, A. V. Zavialov, J. Sengupta, M. Valle, R. A. Grassucci, J. Linde, B. Vestergaard, M. Ehrenberg, J. Frank, *Nature* **2003**, 421, 87–90.
- [60] L. Lancaster, M. C. Kiel, A. Kaji, H. F. Noller, *Cell* **2002**, 111, 129–140.
- [61] G. Hirokawa, M. C. Kiel, A. Muto, M. Selmer, V. S. Raj, A. Liljas, K. Igarashi, H. Kaji, A. Kaji, *EMBO J.* **2002**, 21, 2272–2281.
- [62] a) K. Yamaguchi, K. von Knoblauch, A. R. Subramanian, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 28455–28465; b) K. Yamaguchi, A. R. Subramanian, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 28466–28482; c) T. Suzuki, M. Terasaki, C. Takemoto-Hori, T. Hanada, T. Ueda, A. Wada, K. Watanabe, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 33181–33195; d) E. C. Koc, W. Burkhardt, K. Blackburn, M. B. Moyer, D. M. Schlatter, A. Moseley, L. Spremulli, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 43958–43969; e) E. C. Koc, W. Burkhardt, K. Blackburn, A. Moseley, L. Spremulli, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 19363–19374.
- [63] J. A. Mears, J. J. Cannone, S. M. Stagg, R. R. Gutell, R. K. Agrawal, S. C. Harvey, *J. Mol. Biol.* **2002**, 321, 215–234.
- [64] A. P. Carter, W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Nature* **2000**, 407, 340–348.
- [65] D. E. Brodersen, W. M. Clemons, A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Cell* **2000**, 103, 1143–1154.
- [66] J. Gordon, *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 5680–5686.
- [67] J. S. Lodmell, A. E. Dahlberg, *Science* **1997**, 277, 1262–1267.
- [68] S. R. Connell, C. A. Trieber, U. Stelzl, E. Einfeldt, D. E. Taylor, K. H. Nierhaus, *Mol. Microbiol.* **2002**, 45, 1463–1472.
- [69] P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, 289, 920–930.
- [70] N. Polacek, M. Gaynor, A. Yassin, A. S. Mankin, *Nature* **2001**, 411, 498–501.
- [71] G. W. Muth, L. Ortoleva-Donnelly, S. A. Strobel, *Science* **2000**, 289, 947–950.
- [72] J. Thompson, D. F. Kim, M. O'Connor, K. R. Lieberman, M. A. Bayfield, S. T. Gregory, R. Green, H. F. Noller, A. E. Dahlberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 9002–9007.
- [73] R. Green, J. R. Lorsch, *Cell* **2002**, 110, 665–668.
- [74] J. L. Hansen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. Nissen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Mol. Cell* **2002**, 10, 117–128.
- [75] D. Knowles, N. Foloppe, N. Matassova, A. Murchie, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, 2, 501.
- [76] M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate, H. F. Noller, *Science* **2001**, 292, 883–896.
- [77] M. A. Schäfer, A. O. Tastan, S. Patzke, G. Blaha, C. M. Spahn, D. N. Wilson, K. H. Nierhaus, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 19095–19105.

- [78] R. A. Sayle, E. J. Milner-White, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 374.
- [79] M. Dabrowski, C. M. T. Spahn, K. H. Nierhaus, *EMBO J.* **1995**, *14*, 4872–4882.
- [80] K. H. Nierhaus, J. Wadzack, N. Burkhardt, R. Jünemann, W. Meerwinck, R. Willumeit, H. B. Stuhmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 945–950.
- [81] J. L. Hansen, T. M. Schmeing, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11670–11675.
- [82] A. Bashan, I. Agmon, R. Zarivach, F. Schlutzenzen, 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.
- [83] J. M. Berg, J. R. Lorsch, *Science* **2001**, *291*, 203.
- [84] M. Welch, J. Chastang, M. Yarus, *Biochemistry* **1995**, *34*, 385–390.
- [85] K. M. Parnell, A. Seila, S. A. Strobel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11658–11663.
- [86] M. A. Bayfield, A. E. Dahlberg, U. Schulmeister, S. Dorner, A. Barta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10096–10101.
- [87] T. M. Schmeing, A. C. Seila, J. L. Hansen, B. Freeborn, J. K. Soukup, S. A. Scaringe, S. A. Strobel, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 225–230.
- [88] K. Quiggle, G. Kumar, T. W. Ott, E. K. Ryu, S. Chladek, *Biochemistry* **1981**, *20*, 3480–3485.
- [89] V. I. Katunin, G. W. Muth, S. A. Strobel, W. Wintermeyer, M. V. Rodnina, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 339–346.
- [90] G. Diedrich, C. M. T. Spahn, U. Stelzl, M. A. Schäfer, T. Wooten, D. E. Bochariov, B. S. Cooperman, R. R. Traut, K. H. Nierhaus, *EMBO J.* **2000**, *19*, 5241–5250.
- [91] K. H. Nierhaus, H. Schulze, B. S. Cooperman, *Biochem. Int.* **1980**, *1*, 185–192.
- [92] M. L. Celma, R. E. Monro, D. Vazquez, *FEBS Lett.* **1971**, *13*, 247–251.
- [93] B. Ulbrich, G. Mertens, K. H. Nierhaus, *Arch. Biochem. Biophys.* **1978**, *190*, 149–154.
- [94] K. Bergemann, K. H. Nierhaus, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 15105–15113.
- [95] Y. Kaziro, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *505*, 95–127.
- [96] R. Agrawal, P. Penczek, R. Grassucci, J. Frank, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6134–6138.
- [97] R. K. Agrawal, A. B. Heagle, P. Penczek, R. A. Grassucci, J. Frank, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 643–647.
- [98] H. Stark, M. V. Rodnina, H. J. Wieden, M. van Heel, W. Wintermeyer, *Cell* **2000**, *100*, 301–309.
- [99] M. G. Gomez-Lorenzo, C. M. T. Spahn, R. K. Agrawal, R. A. Grassucci, P. Penczek, K. Chakraborty, J. P. G. Ballesta, J. L. Lavandera, J. F. Garcia-Bustos, J. Frank, *EMBO J.* **2000**, *19*, 2710–2718.
- [100] T. P. Hausner, J. Atmadja, K. H. Nierhaus, *Biochimie* **1987**, *69*, 911–923.
- [101] Y. Endo, K. Tsurugi, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8128–8130.
- [102] T. Uchiumi, S. Honma, T. Nomura, E. R. Dabbs, A. Hachimori, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3857–3862.
- [103] E. Cundliffe in *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (Hrsg.: W. E. Hill, A. Dahlberg, R. A. Garrett, P. B. Moore, D. Schlessinger, J. R. Warners), American Society for Microbiology, Washington, **1990**, S. 479–490.
- [104] G. Stöffler, E. Cundliffe, M. Stöffle-Meilicke, E. R. Dabbs, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 10517–10522.
- [105] D. M. Cameron, J. Thompson, P. E. March, A. E. Dahlberg, *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 27–35.
- [106] R. K. Agrawal, J. Linde, J. Sengupta, K. H. Nierhaus, J. Frank, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 777–787.
- [107] K. H. Nierhaus, C. M. T. Spahn, N. Burkhardt, M. Dabrowski, G. Diedrich, E. Einfeldt, D. Kamp, V. Marquez, S. Patzke, M. A. Schäfer, U. Stelzl, G. Blaha, R. Willumeit, H. B. Stuhmann in *The Ribosome. Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions* (Hrsg.: R. A. Garrett, S. R. Douthwaite, A. Liljas, A. T. Matheson, P. B. Moore, H. F. Noller), American Society for Microbiology, Washington, **2000**, S. 319–335.
- [108] J. Harms, F. Schlutzenzen, R. Zarivach, A. Bashan, S. Gat, I. Agmon, H. Bartels, F. Franceschi, A. Yonath, *Cell* **2001**, *107*, 679–688.
- [109] H.-J. Rheinberger, K. H. Nierhaus, *Biochem. Int.* **1980**, *1*, 297–303.
- [110] H.-J. Rheinberger, H. Sternbach, K. H. Nierhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 5310–5314.
- [111] H. Saruyama, K. H. Nierhaus, *Mol. Gen. Genet.* **1986**, *204*, 221–228.
- [112] F. Triana, K. Nierhaus, K. Chakraborty, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1994**, *33*, 909–915.
- [113] A. V. Elskaya, G. V. Ovcharenko, S. S. Palchevskii, Z. M. Petrushenko, F. J. Triana-Alonso, K. H. Nierhaus, *Biochemistry* **1997**, *36*, 10492–10497.
- [114] R. K. Agrawal, P. Penczek, R. A. Grassucci, N. Burkhardt, K. H. Nierhaus, J. Frank, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8723–8729.
- [115] G. Blaha, U. Stelzl, C. M. T. Spahn, R. K. Agrawal, J. Frank, K. H. Nierhaus, *Methods Enzymol.* **2000**, *317*, 292–309.
- [116] K. H. Nierhaus, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4997–5008.
- [117] U. Geigenmüller, K. H. Nierhaus, *EMBO J.* **1990**, *9*, 4527–4533.
- [118] J. A. Horsfield, D. N. Wilson, S. A. Mannering, F. M. Adamski, W. P. Tate, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1487–1494.
- [119] V. Marquez, D. N. Wilson, F. Triana-Alonso, W. Tate, K. H. Nierhaus, unveröffentlichte Ergebnisse.