

Zusammenfassung

Ribosomen übersetzen die genetische Information, die in der mRNA kodiert ist, mit extrem hoher Effizienz und Genauigkeit. In dieser Hinsicht ist die Aufrechterhaltung des korrekten Leserahmens während der Proteinsynthese eine der wesentlichen Aufgaben des Ribosoms. Ein spontaner Wechsel des Leserahmens führt zu unvollständigen und gewöhnlich nicht funktionsfähigen Proteinen und damit zu einem Verlust der genetischen Information. Normalerweise kommt eine spontane Änderung des Leserahmens einmal alle 30.000 eingebauten Aminosäuren vor. Im Fall der RF2 Synthese muss jedoch ein Leserahmenwechsel in +1 Richtung erfolgen, da das 26igste Codon das Stoppcodon UGA ist, das mit dem Leserahmenwechsel bei niedriger RF2 Konzentration umgangen wird und erst durch den Leserahmenwechsel zur vollständigen Synthese von RF2 führt. Der Leserahmenwechsel erfolgt mit einer erstaunlichen Effizienz von bis zu 100%, d.h. mit einer um vier Zehnerpotenzen größeren Häufigkeit als bei der üblichen Proteinsynthese.

Das interne Stoppcodon der RF2 mRNA ist die Basis der regulatorischen Rückkopplung der RF2 Synthese. Falls die RF2 Konzentration genügend hoch ist, erkennt RF2 das interne Stoppcodon an der 26igsten Codonposition seiner eigenen mRNA, mit dem Ergebnis, dass ein Oligopeptid von 25 Aminosäuren synthetisiert, vom Ribosom entlassen und schnell abgebaut wird. Falls hingegen die RF2 Konzentration niedrig ist, erfolgt der beschriebene +1 Leserahmenwechsel, was die RF2 Synthese ermöglicht.

In dieser Arbeit wird der Mechanismus des extrem effizienten Leserahmenwechsels aufgeklärt. Darüber hinaus wird nachgewiesen, dass die Besetzung der E Stelle eine Voraussetzung für die Erhaltung des Leserahmens während der Proteinsynthese ist.

Wir zeigen, dass die interne Shine-Dalgarno (SD) Sequenz vor dem internen Stoppcodon UGA (26igster Codon) der RF2-mRNA von kritischer Bedeutung für den Mechanismus der Regulation der RF2 Synthese ist. Wenn das interne Stoppcodon UGA in der A Stelle angelangt ist, liegt die SD Sequenz nur mit einer extrem kurzen Spacersequenz von 2 Nukleotiden stromaufwärts von der Peptidyl-tRNA in der P Stelle und überlappt damit mit der ersten Codonposition der E-Stellen tRNA. Dieser Sachverhalt führt zu einem sterischen Konflikt zwischen SD-AnitSD der 16S rRNA und Codon-Anticodon-Wechselwirkung in der E Stelle, und dieser sterische Zusammenstoß, wie hier gezeigt wird, führt zur Entlassung der tRNA aus der E Stelle. Damit besitzt das Ribosom nur eine tRNA, nämlich die Peptidyl-tRNA in der P Stelle, eine Situation, die während der Elongation nicht vorkommt, da während der Elongation statistisch immer zwei tRNAs auf dem Ribosom befinden. Wegen des kurzen Spacers drückt die SD-AntiSD Wechselwirkung das Ribosom mit seiner einen tRNA um ein Nukleotid stromabwärts, was das +1 Codon GAC für Asp in die A Stelle einstellt. Wir zeigen, dass der Verlust der tRNA aus der E Stelle mit dem Einbau Asp Aminosäure einhergeht. Wenn jedoch die SD Sequenz um zwei oder sechs Nukleotiden stromaufwärts verschoben wird, bleibt die Entlassung der tRNA aus der E Stelle sowie ein Wechsel des Leserahmens aus (kein Einbau von Asp).

Das *in vitro* Translationssystem, das für die Analyse der RF2-mRNA Translation entwickelt wurde, kann zum ersten mal *in vitro* einen Leserahmenwechsel von bis zu 100% entsprechend den *in vivo* Befunden nachweisen. Wir zeigen ferner, dass die E-Stellen tRNA bei einer "normalen" UGA Dekodierung durch RF2 nicht entlassen wird. Deshalb muss die E-Stellen tRNA in einem späteren Schritt der Terminationsphase

entlassen werden, was in den vorherrschenden Modellen der Translations-Termination nicht berücksichtigt ist.

Unsere Daten demonstrieren weiterhin zum ersten mal, dass eine tRNA in der E Stelle für die Aufrechterhaltung des Leserahmens von fundamentaler Bedeutung ist, und dass ein Verlust der E-Stellen tRNA den enorm effizienten Leserahmenwechsel während der RF2 Synthese auslöst.