

1 Einleitung

1.1 Proteinbiosynthese

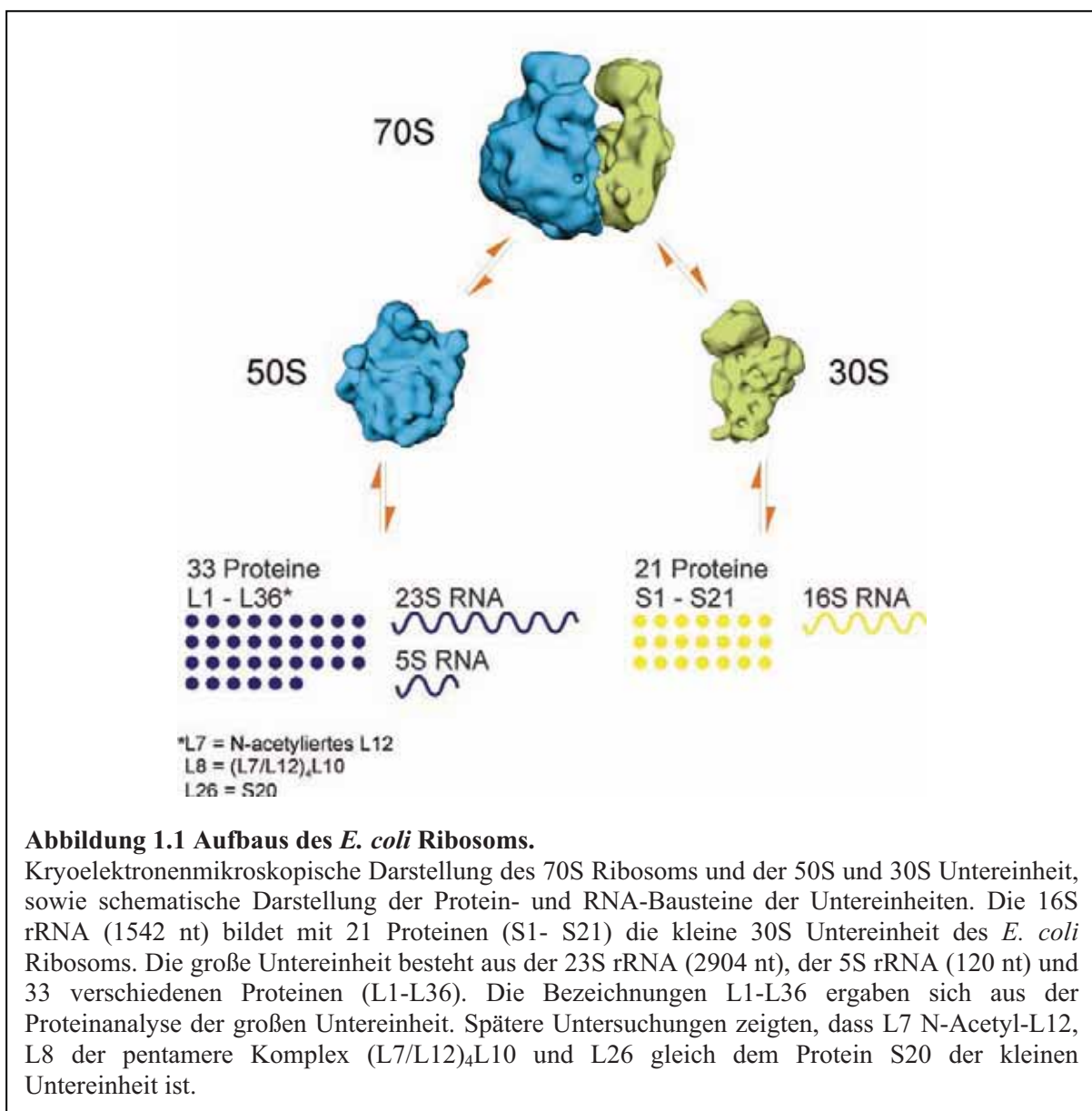
Die Proteinbiosynthese ist einer der zentralen Prozesse der Zelle. Die Umsetzung der genetischen Information, die in der DNA gespeichert ist, erfolgt durch Transkription der DNA in Messenger-RNA (mRNA), die in die dreidimensionale Proteinstruktur durch Translation übersetzt wird. Während der Transkription erfolgt die Synthese der mRNA aus den Ribonukleotidtriphosphaten unter Nutzung des codogenen Stranges der DNA als basengenaue Matrize. Die entstandene mRNA kann nun durch den Prozess der Translation in die Aminosäuresequenz umgesetzt werden. Das Ablesen der kodierenden Region der mRNA erfolgt am Ribosom. Drei aufeinander folgende Basen (Codon) kodieren für eine Aminosäure. Die 64 möglichen Basentriplets ergeben den so genannten universellen genetischen Code. Der genetische Code ist degeneriert, das heißt einige Aminosäuren werden durch mehrere Codone kodiert. Die drei Codone UAA, UAG und UGA fungieren als Stoppsignale (Stoppcodone). Die Umsetzung des genetischen Codes erfolgt auf der Ebene der Aminoacyl-Transfer-RNA-Synthetasen. Diese erkennen die spezifische Transfer-RNA (tRNA) und verknüpfen sie mit der entsprechenden Aminosäure. Die Aminoacyl-tRNAs (Aa-tRNA) bilden die Adaptermoleküle, die die Umsetzung des Basentriplets in die Aminosäuresequenz am Ribosom ermöglichen. Die Proteinbiosynthese findet am Ribosom statt, indem schrittweise die wachsende Aminosäurekette auf die nächste kodierte Aminosäure übertragen wird.

1.2 Struktur des Ribosoms

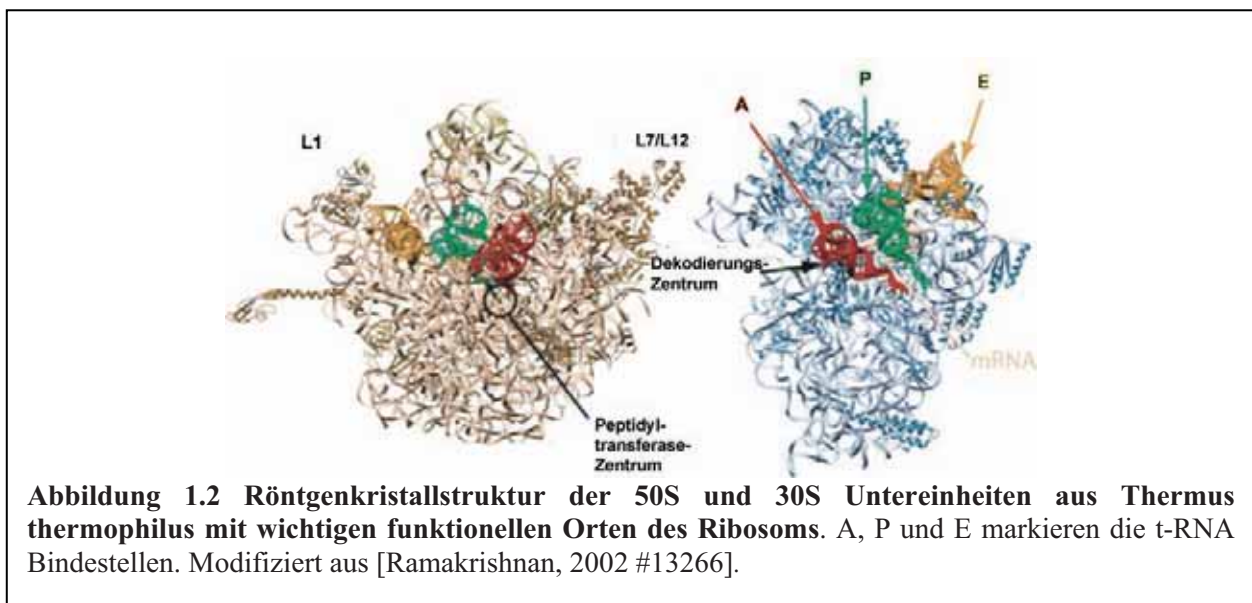
Alle Ribosomen, ob eukaryotischer oder prokaryotischer Herkunft, bestehen aus zwei ungleichen Untereinheiten. Diese Untereinheiten setzen sich aus verschiedenen ribosomalen Proteinen und den ribosomalen RNAs (rRNAs) zusammen. Obwohl die Ribosomen von Organismen der drei Domänen des Lebens (*Eukaryota*, *Bacteria* und *Archaea*) in ihrer Größe und der Anzahl der Bausteine variieren, lassen sich strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten erkennen (Ramakrishnan and Moore, 2001) (Doudna and Rath, 2002) (Schuwirth et al., 2005). Das Ribosom des Eubakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) ist

strukturell und funktionell sehr gut charakterisiert. Es ist ein Ribonukleoproteinkomplex aus drei verschiedenen rRNA und 54 Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 2,6-2,8 MDa. Es zeigt einen relativen Sedimentationskoeffizienten von 70 Svedberg (S). Kürzlich wurde die Struktur des 70S Ribosoms aus *E. coli* mit einer Auflösung von 3,5 Å gelöst (Schuwirth et al., 2005).

Das bakterielle 70S Ribosom dissoziiert unter geeigneten ionischen Bedingungen (*in vitro*) oder in bestimmten funktionellen Stadien (*in vivo*) in zwei Untereinheiten. Diese Untereinheiten werden entsprechend ihrer relativen Sedimentationskoeffizienten als 50S (große) und 30S (kleine) ribosomale Untereinheit bezeichnet. Abbildung 1.1 zeigt schematisch die Zusammensetzung des *E. coli* Ribosoms.

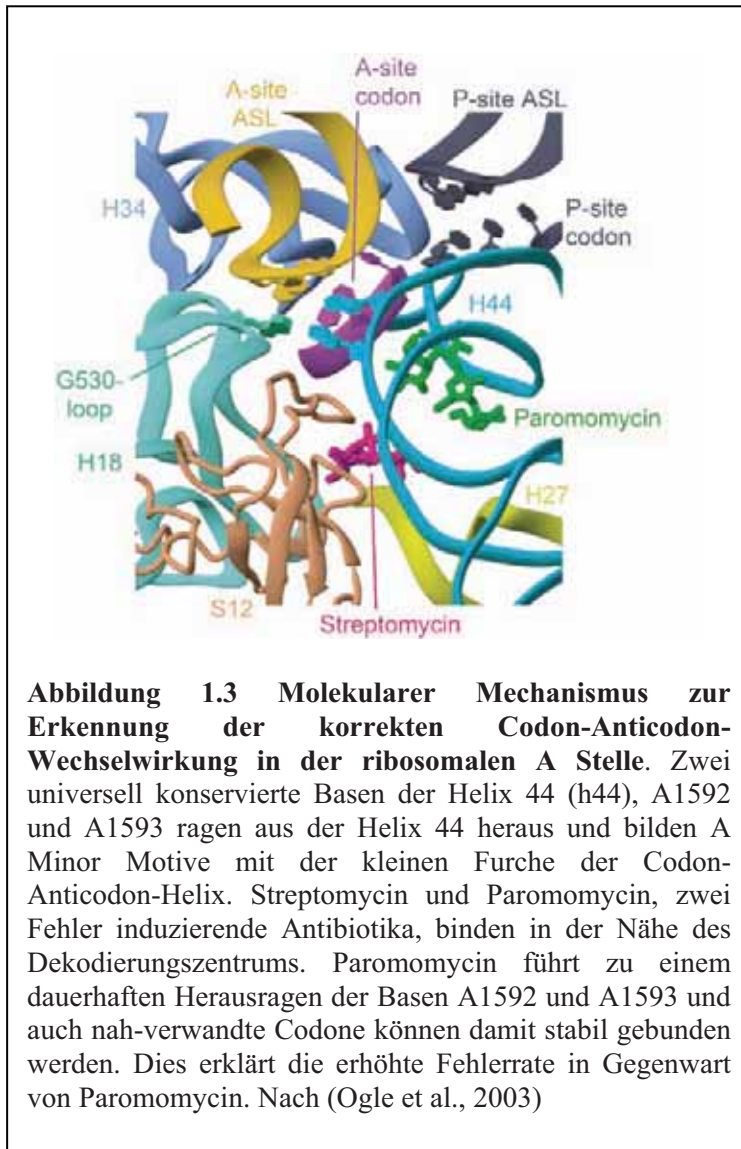


Kristallstrukturen des 70S Ribosoms liegen auch aus *Thermus thermophilus* (Cate et al., 1999) (Yusupov et al., 2001) in nahezu atomarer Auflösung vor. Ribosomale Strukturen dieses Organismus und Strukturen der ribosomalen Untereinheiten aus *Haluarcula marismortui* und *Deinococcus radiodurans* (Schmeing et al., 2005b) (Tu et al., 2005); (Ogle et al., 2003; Ogle et al., 2001)} (Schlünzen et al., 2001) (Wilson et al., 2005)] lieferten kürzlich neue Einblicke in die molekularen Details der Proteinbiosynthese und der Wirkungsweise von Antibiotika. Die Kombination von Kristallstrukturanalyse und kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen (Kryo EM) (Agrawal et al., 2000 ; Frank, 2001 ; Frank, 2003); erlauben die höher aufgelösten Kristallstrukturen in die geringer aufgelösten Kryo EM Strukturen funktioneller Komplexe hinein zu projizieren. Somit ergeben sich Modelle für biologisch aktive Ribosomenkomplexe mit quasi atomare Auflösungen (Valle et al., 2003) (Gao et al., 2003; Halic et al., 2004). Diese neuen hochaufgelösten Modelle haben unser Verständnis der funktionalen Vorgänge am Ribosom deutlich verbessert.



Im Jahre 1964 beschrieb Watson (Watson, 1964) ein zwei-Stellen-Modell der Proteinbiosynthese. In diesem Modell, das bis weit in die 1980er Jahre als Referenz angesehen wurde, existierten nur zwei tRNA Bindestellen, nämlich die A- und die P-Stelle. Die Entdeckung der E-Stelle (Rheinberger and Nierhaus, 1980) (Rheinberger et al., 1981) (Grajevskaja et al., 1982) und deren Bedeutung für die Proteinbiosynthese führten zu heftigen Kontroversen innerhalb der Forschungsgemeinde. Obwohl die Existenz der E-Stelle mittlerweile generell anerkannt ist, werden die Besetzung der E-Stelle mit einer deacylierten tRNA über spezifische Codon-Anticodon-Wechselwirkungen (Rheinberger, 1991) (Gnirke and Nierhaus, 1986), sowie die Bedeutung der Besetzung der E-Stelle für zum Beispiel die

Auswahl der Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle (Hausner et al., 1988) (Blaha and Nierhaus, 2001) (Nierhaus, 2006a) oder den Erhalt des Leserasters (Márquez et al., 2002) immer noch diskutiert.



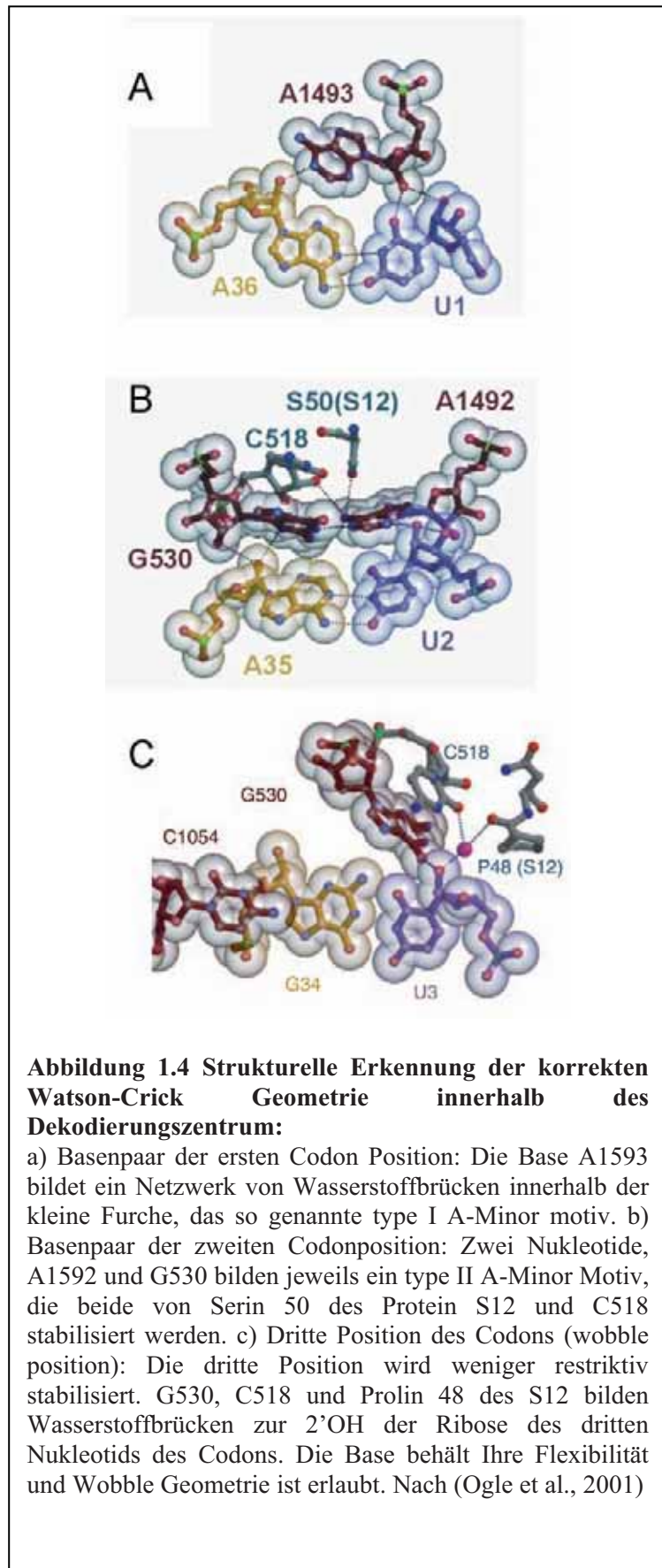
Das Zentrum der Dekodierung ist innerhalb der A-Stelle in der kleinen Untereinheit lokalisiert. (Abbildung 1.2). Der Dekodierungsprozess, die Auswahl der Aminoacyl-tRNA (Aa-tRNA) mit dem komplementären Anticodon (cognate Aminoacyl-tRNA) und die Zurückweisung der Aminoacyl-tRNA mit nicht-komplementären Anticodonen (nah-cognate bzw. nicht cognate Aminoacyl-tRNA) findet in der ribosomalen A-Stelle statt. Einblicke in den molekularen Mechanismus der Dekodierung anhand von Kristallstrukturen der kleinen Untereinheit in Komplex mit cognatem oder nahe cognatem Anticodonbereich (Anticodon-

stem-loops) einer tRNA zeigte, wie die Unterscheidung zwischen cognaten und nah-cognaten Codonen innerhalb des Dekodierungszentrums erfolgt (Ogle et al., 2003; Ogle et al., 2001), (Abbildung 1.3.)

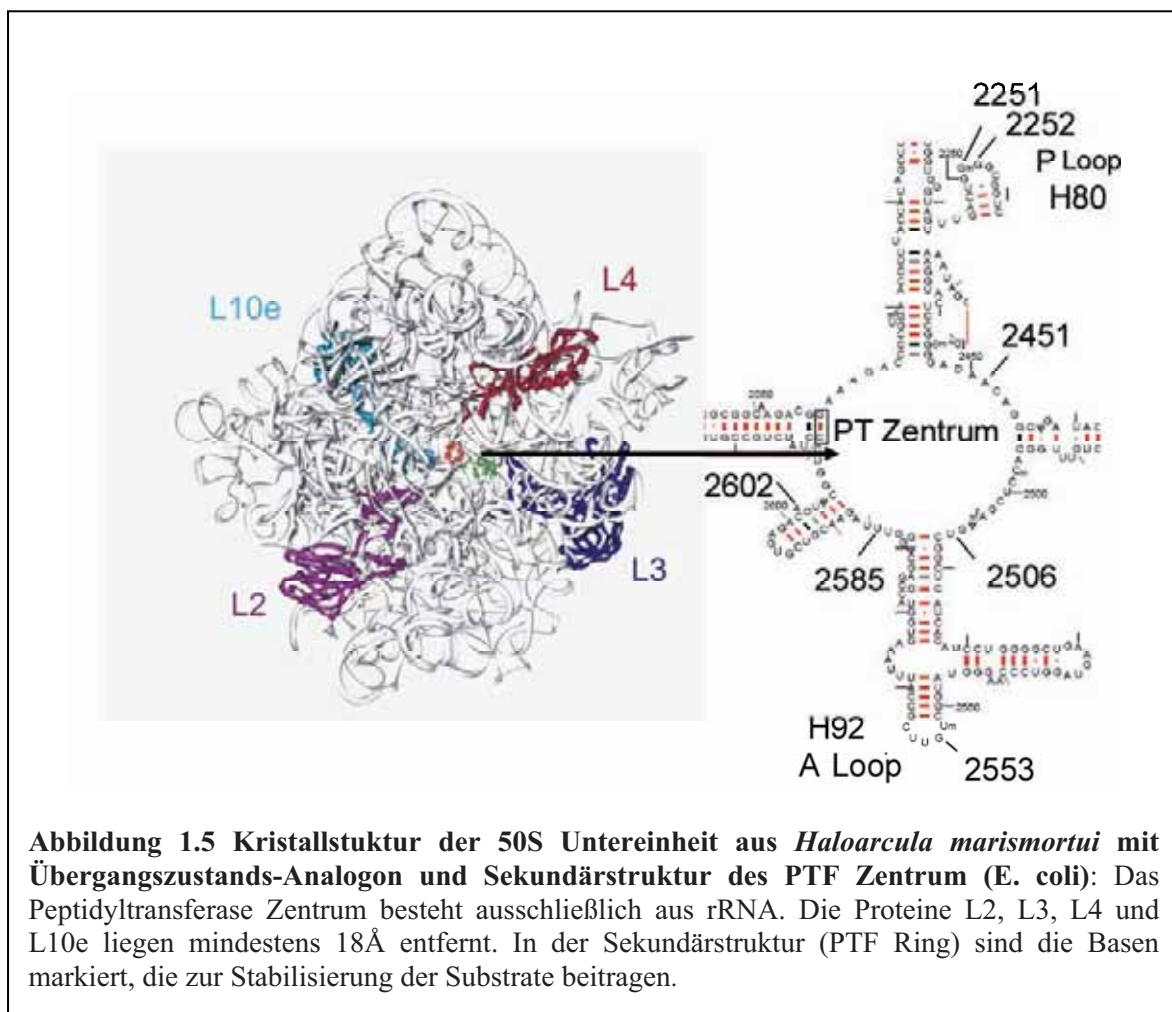
Im Dekodierungszentrum wird nicht die Stabilität der Wasserstoffbrücken der Codon-Anticodon-Wechselwirkung getestet, sondern die Geometrie der ersten beiden Basen der Codon-Anticodon-Wechselwirkung geprüft. Nur im Falle einer korrekten Watson-Crick-Geometrie können sich Tertiärstrukturen, die so genannten A-Minor-Motive, ausbilden, die zur Stabilisierung der Codon-Anticodon-Wechselwirkung führen (Abbildung 1.4).

Im Falle der nah-cognaten Codon-Anticodon-Wechselwirkung kommt es zu einem nicht-kompensierten Verlust von Wasserstoffbrücken und somit zur Instabilität der Codon-Anticodon-Wechselwirkung. Dem Erkennen der korrekten Watson-Crick-Geometrie durch lokale Konformationsänderung folgt eine weiterreichende Konformationsänderung innerhalb der kleinen ribosomalen Untereinheit, was zur Einpassung (Akkommodation) der Aa-tRNA in die ribosomale A-Stelle führt. Das Ribosom befindet sich nun im prätranslokationalen Zustand (PRE) und ist bereit für die Peptidyltransferase-Reaktion (PT Reaktion).

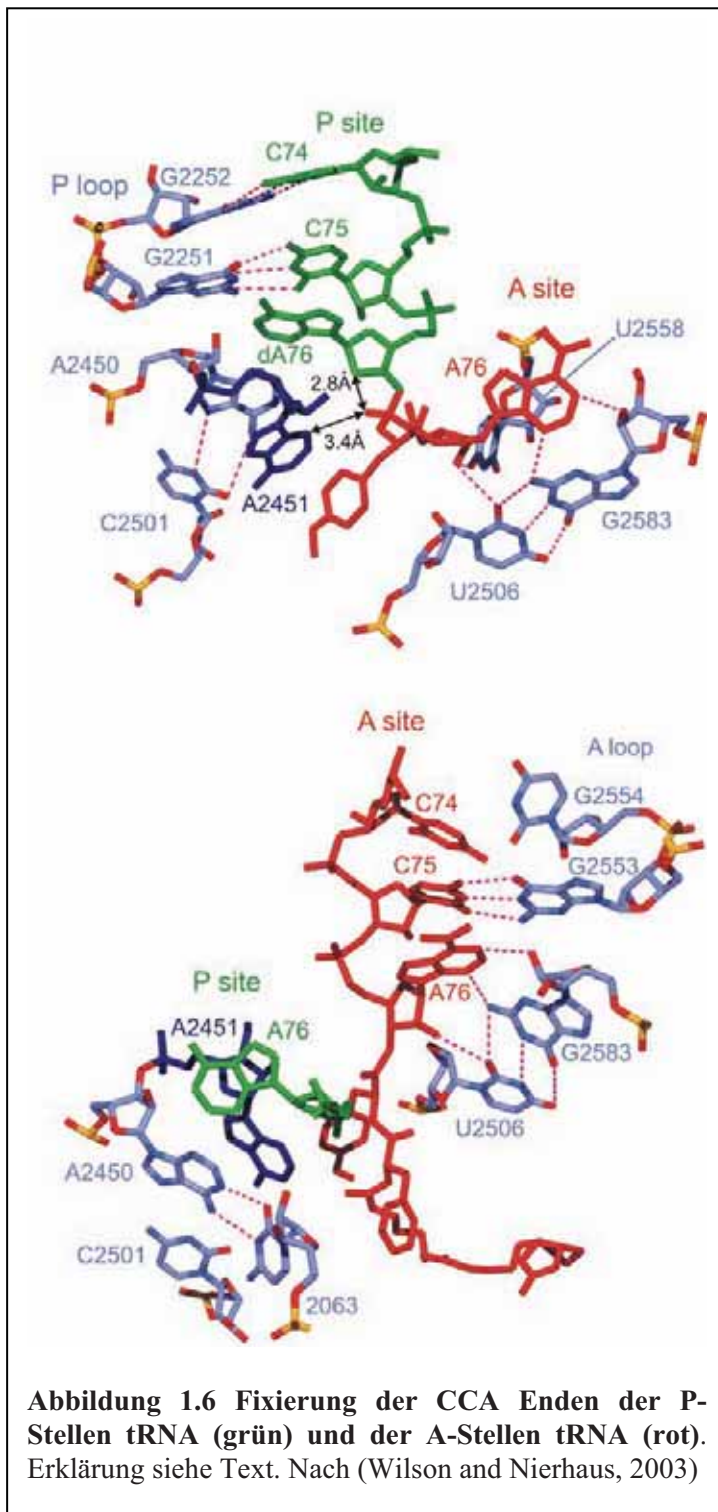
Die PT Reaktion ist die zentrale enzymatische Aktivität der großen Untereinheit. Das Zentrum der PT Reaktion liegt in einer Spalte auf der, der kleinen Untereinheit zugewandten Seite (intersubunit side) der großen Untereinheit, Abbildung 1.2 und 1.5.



Kristallographische Analysen haben gezeigt, dass das Peptidyltransferase Zentrum (PT Zentrum) ausschließlich aus rRNA besteht und nicht wie ursprünglich angenommen Proteine die PT Reaktion katalysieren. In der Gruppe von Steitz wurde die Struktur der großen Untereinheit aus *Haloarcula marismortui* im Komplex mit dem so genannten Yarus Inhibitor gelöst (Welch et al., 1995). In dieser Struktur lagen die Proteine L2, L3, L4 und L10e (Homolog des bakteriellen L16) mindestens 18 Å von dem Yarus Inhibitor entfernt (Abbildung 1.5).



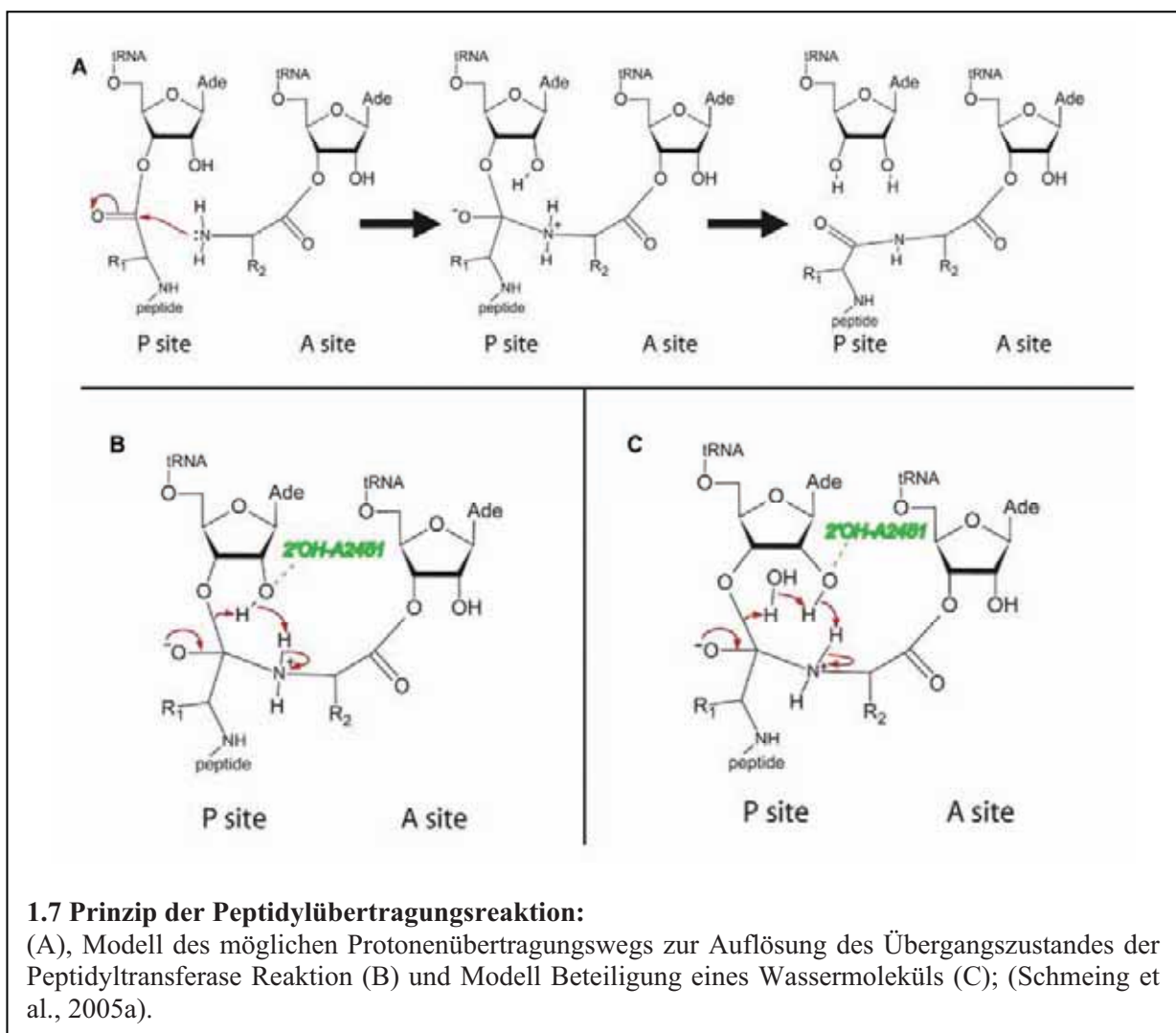
Im prätranslokationalen Zustand (PRE), wenn die ribosomale P-Stelle mit der Peptidyl-tRNA besetzt und die neue Aa-tRNA in die A-Stelle eingepasst ist, erfolgt die Übertragung des Peptidylrestes der P-Stellen tRNA auf die Aminosäure der A-Stellen Aa-tRNA. Die beiden L-förmigen tRNAs schließen einem Winkel von 40° ein, wohingegen die Akzeptorarmstämme der tRNAs (CCA Enden) innerhalb des PT Zentrums einen Winkel von 180° bilden, so dass die 3'-Ribose Positionen mit Peptidyl- bzw. Aminoacylrest nebeneinander liegen (Bashan et al., 2003). Die Bindung der CCA Enden der tRNAs in das PT Zentrum wird unterstützt durch Nukleotide der so genannten A- und P- Schleifen der rRNA (Abbildung 1.6).



Das CCA Ende der Aa-tRNA in der A-Stelle wird durch Watson-Crick Basenpaarung zwischen C75 (tRNA) und G2553 (rRNA) und einem A-Minor Motiv des A76 (tRNA) und dem Basenpaar G2583-U2506 (rRNA) sowie einer Wasserstoffbrücke zwischen der 2'OH Gruppe des A76 (tRNA) und U2585 (rRNA) fixiert. In der P-Stelle erfolgt die Fixierung über zwei Watson-Crick Basenpaarungen (C74 mit G2252 und C75 mit G2251) sowie ein A-Minor Motiv von A76 mit dem Basenpaar A2450-C2501 (siehe Übersichtsartikel (Wilson et al., 2002; Wilson and Nierhaus, 2003). Diese stabile Fixierung der Substrate setzt sich im inneren des PT Zentrums fort. Vier Nukleotide (A2451, U2506, U2585, und A2602) der inneren Lage des PT Zentrum sorgen durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken für die Ausrichtung der Substrate und erleichtern die Bildung des Übergangszustandes (Schmeing et

al., 2005a; Schmeing et al., 2005b ; Youngman et al., 2004). Die Kristallstrukturanalysen von Ribosomen in Komplex mit A- und P-Stellen Substraten, sowie mit Übergangszustand-Analoga, lieferten die strukturelle Hinweise für einen „induced fit“ Mechanismus zur Aktivierung des katalytischen Zentrums (Schmeing et al., 2005b). Die beteiligten Nukleotide des PT Zentrums und möglicherweise ein Wassermolekül platzieren die Substrate in einer Weise, die das Erreichen des Übergangszustandes erleichtern. Die Reduktion der

Reaktionsentropie durch die physikalische Substratpositionierung ist ausreichend, um die Beschleunigung der Peptidübertragungsreaktion gegenüber einer unkatalysierten Reaktion mit Modells substraten zu erklären (Krayevsky and Kukhanova, 1979 ; Nierhaus et al., 1980). Biochemische Analysen zeigten, dass die 2'OH der Ribose des A76 der P-Stelle tRNA und das 2'OH der Ribose des A2451 der rRNA für die Katalyse der Peptidübertragung von entscheidender Bedeutung sind (Erlacher et al., 2005). Dabei schält sich das folgende einfache Modell für den Mechanismus der Peptidbindung heraus: es findet ein Protonenübertrag von der α -Aminogruppe des angreifenden Stickstoffs auf den Sauerstoff der 2'-OH Gruppe der P-tRNA statt, diese gibt ihr Proton an den 3'-Sauerstoff der P-tRNA nach erfolgter Spaltung ihrer Esterbindung weiter. Die Wasserstoffbrücke des 2'-OHs des A2451 Restes mit der 2'-OH Gruppe der P-tRNA erleichtert diesen „proton-shuttle“ erheblich und beschleunigt den Peptidtransfer um einige Größenordnungen (Erlacher et al., 2006; Schmeing et al., 2005a; Trobro and Aqvist, 2005), (Abbildung 1.7 B und C).

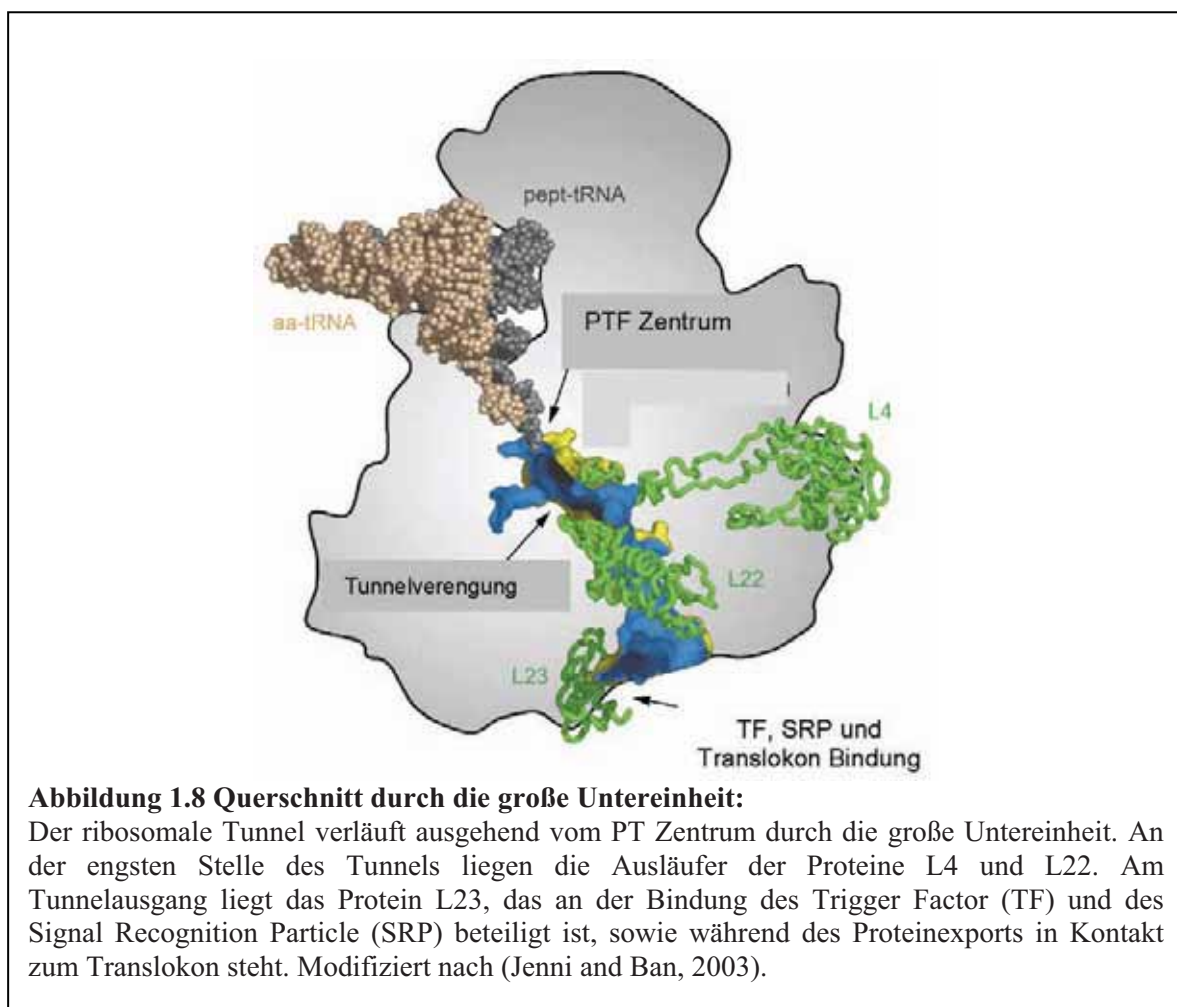


Eine ursprünglich diskutierte Säure-Basen-Katalyse der PT Reaktion konnte kürzlich ausgeschlossen werden (Schmeing et al., 2005b; Sievers et al., 2004).

Die zweite enzymatische Aktivität des PT Zentrums ist die Katalyse der hydrolytischen Spaltung der Peptidyl-tRNA und das Freisetzen des Proteins im Zuge der Termination der Proteinbiosynthese. Hier konnte gezeigt werden, dass das Nukleotid A2602 von entscheidender Bedeutung für die Termination der Proteinbiosynthese, für die PT Reaktion jedoch entbehrlich ist (Polacek et al., 2003).

Nach der PT Reaktion erfolgt die Translokationsreaktion, die mRNA und die tRNAs werden um ein Codon verschoben. Dadurch wird die Peptidyl-tRNA in die P-Stelle platziert und die deacyl-tRNA in die E-Stelle verschoben. Die E-Stellen tRNA verlässt das Ribosom nachdem die neue Aa-tRNA in der A-Stelle dekodiert ist (Dinos et al., 2005).

Ausgehend vom PT Zentrum verläuft der Ribosomentunnel durch die große Untereinheit hindurch, um auf der, der kleinen Untereinheit abgewandten Seite (solvent side) das synthetisierte Protein ins Zytosol zu leiten (Abbildung 1.8).

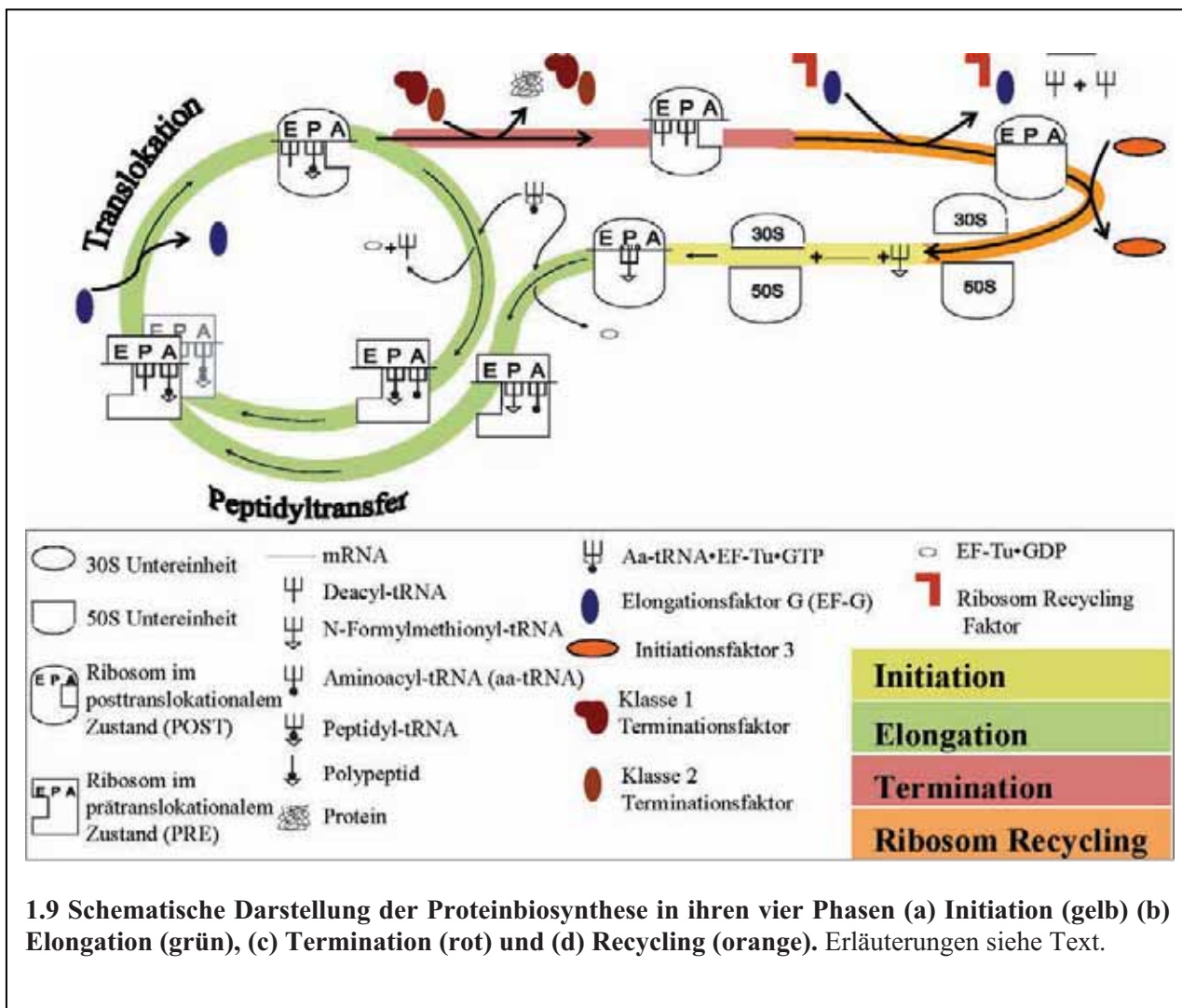


Die Tunnelwand ist fast vollständig mit rRNA ausgekleidet, nur in der Tunnelverengung kommen die langen Fortsätze der Proteine L4 und L22 der naszierenden Proteinkette nahe. Diese beiden Proteine bilden zusammen mit der rRNA einen Knick des Tunnels, der für Regulationsprozesse der Translation von Bedeutung ist (Nakatogawa et al., 2004)

Weiterhin wird diskutiert, ob der Tunnel die Proteinfaltung des naszierenden Proteins unterstützt (Lu and Deutsch, 2005) (Gilbert et al., 2004).

1.3 Ablauf der Proteinbiosynthese

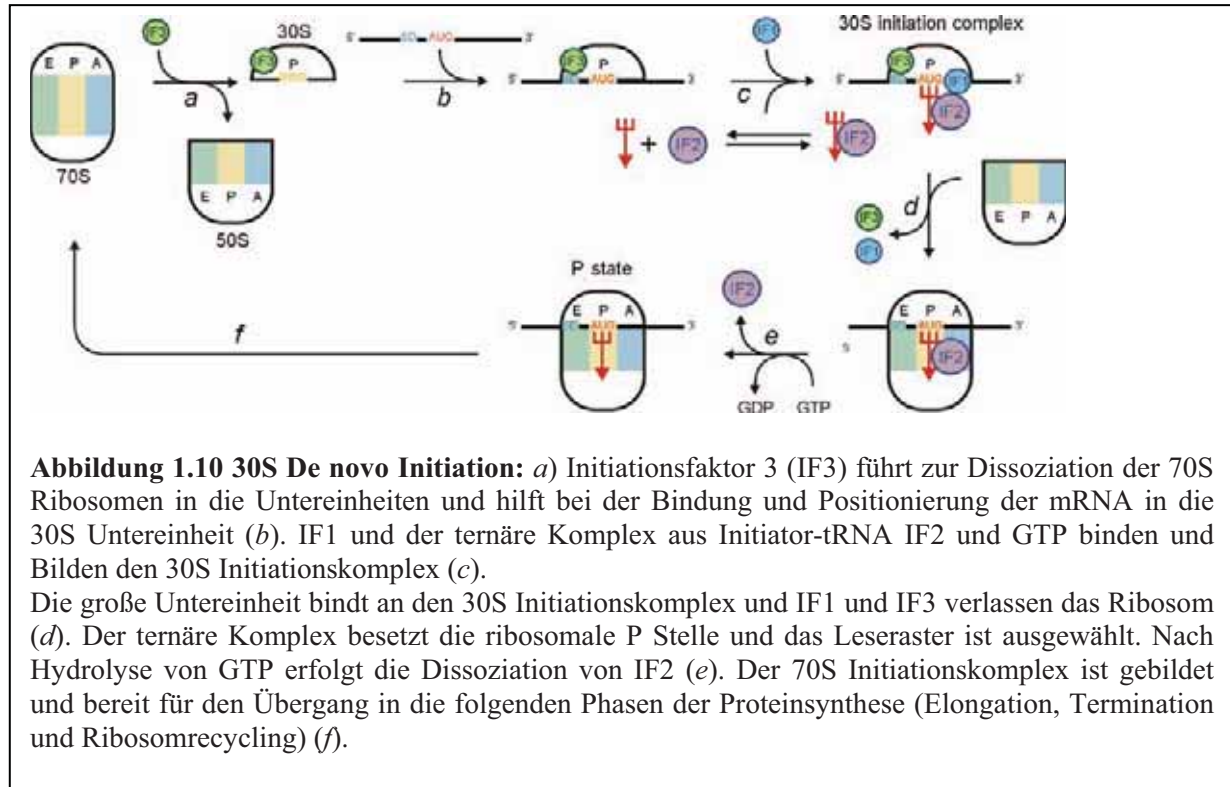
Die Proteinbiosynthese kann in vier funktionelle Phasen unterteilt werden: (a) Initiation, (b) Elongation, (c) Termination und (d) Recycling (Abbildung 1.9).



1.3.1 Initiation

1.3.1.1 30S *De novo* Initiation

In der Initiationsphase der Proteinbiosynthese der Eubakterien wird das Ribosom für die Proteinbiosynthese programmiert. Die mRNA wird an die 30S Untereinheit gebunden und das Startcodon wird über die Shine-Dalgarno-Wechselwirkung der mRNA mit der 16S rRNA positioniert. Die Initiator-Aminoacyl-tRNA (Formyl-Methionyl-tRNA^{Met}_f) wird als ternärer Komplex an das Startcodon gebunden. Die große Untereinheit bindet an den 30S Initiationskomplex und die Initiator-Aminoacyl-tRNA besetzt die P-Stelle. Der Initiationskomplex (P_i) ist somit ausgebildet und das Leseraster bestimmt. Die Aminoacyl-tRNA-Stelle (A-Stelle) des Ribosoms ist frei. Dieser Prozess wird durch Initiationsfaktoren (IF) gesteuert. Die exakte Rolle der Initiationsfaktoren und der chronologische Ablauf der Initiation sind immer noch nicht vollständig geklärt (Gualerzi et al., 2000) (Pestova and Hellen, 2000) (Pestova et al., 2001). Das Ribosom liegt nun als Initiator-Komplex (P_i Komplex) vor und ist bereit für den Übergang in die Elongationsphase.



1.3.1.2 70S Initiation

Einen alternativen Weg der bakteriellen Initiation der Proteinbiosynthese beschreibt die 70S Initiation, die insbesondere für die regulierte und gekoppelte Translation der ribosomalen Proteine von Bedeutung ist. Die meisten bakteriellen mRNAs sind polycistronisch und entstehen durch Transkription benachbarter Gene, die in Transkriptionseinheiten (Operonen) organisiert sind und die Informationen für verschiedene, aber oft funktionell zusammengehörige Proteine tragen. In *E. coli* enthalten polycistronische mRNAs durchschnittlich vier Cistrone. Theoretisch ist die Translation der Cistrone unabhängig voneinander durch 30S *de novo* Initiation möglich. Oft liegt, wie zum Beispiel bei den Operonen für ribosomale Proteine, die Initiationsstellen der darauf folgenden Cistrone in Sekundärstrukturen verborgen, so dass eine 30S *de novo* Initiation nicht möglich ist. Eine Initiation an diesen verborgenen Initiationsstellen kann nur erfolgen, wenn die Sekundärstruktur durch die Translation des vorangegangenen Cistrons aufgelöst wird. Dieses Phänomen wird Translationskopplung (*translational coupling*) genannt. Die Translationskopplung wird bei der autogenen Translationsregulation der Expression der ribosomalen Proteine genutzt. Die Translationsregulation erfolgt durch ein Repressorprotein, das häufig auf der zu regulierenden mRNA selbst kodiert ist. Dieses Repressorprotein bindet an die mRNA und unterdrückt die Translation der nachfolgenden Cistrone. Ohne Repression erfolgt die Re-Initiation auf dem nachfolgenden Cistron durch 70S Initiation. Nach der Translationstermination des vorhergegangenen Cistrons und dem Freisetzen des Proteins, dissoziiert das 70S Ribosom nicht in die Untereinheiten, sondern schreitet mit der Translation des nächsten Cistrons fort. Die nächste Initiationsstelle kann dabei durch eindimensionale Diffusion entlang der mRNA durch das „leere“ Ribosom erkannt werden. Dabei ist es möglich, dass das 70S Ribosom bis zu 40 Nukleotide in 5' oder 3' Richtung der mRNA diffundiert, um eine erneute Initiation auszuführen. Eine 70S Initiation wurde auch für so genannte „leaderless“ mRNAs beschrieben (Moll et al., 2004). „Leaderless“ mRNAs zeichnen sich durch das Fehlen des 5' nichttranslatierten Bereichs aus, sie beginnen mit dem Startcodon (AUG) unmittelbar am 5'-Ende.

1.3.2 Elongation

In der Elongationsphase erfolgt die schrittweise Übersetzung der Ribonukleinsäuresequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz. Die Elongation ist ein zyklischer Prozess (Abbildung 1.9) in dem das Ribosom zwischen zwei definierten Zuständen (PRE und POST) oszilliert.

Die beiden Zustände sind durch eine hohe Energiebarriere (120 kJ/mol) von einander getrennt (Schilling-Bartetzko et al., 1992a; Schilling-Bartetzko et al., 1992b). Die Energiebarriere kann durch die Elongationsfaktoren EF-Tu (POST zu PRE) und EF-G (PRE zu POST) herabgesetzt werden. EF-Tu bildet mit GTP und der Aminoacyl-tRNA einen ternären Komplex, der die Aminoacyl-tRNA in die freie A-Stelle des Ribosoms leitet. Nach erfolgter Dekodierung findet die Akkomodation und anschließend der Peptidyltransfer von der Peptidyl-tRNA (oder der Initiator-Aminoacyl-tRNA) auf die Aminosäure der A-Stellen Aminoacyl-tRNA statt. Durch die Bindung des ternären Komplexes wird der POST Zustand in den PRE Zustand überführt. Der Peptidyltransferreaktion folgt die Translokation des mRNA*tRNA₂ Komplexes um ein Codon bzw. drei Nukleotide. Unter Beteiligung von EF-G*GTP wird der PRE Zustand in den POST Zustand überführt. Bei diesem Prozess erfolgt die GTP-Hydrolyse und EF-G verlässt das Ribosom in der GDP-gebundenen Form. Durch die Wirkung der beiden G-Proteine erfolgt die Elongation gerichtet vom 5'- in Richtung 3'-OH-Ende der mRNA.

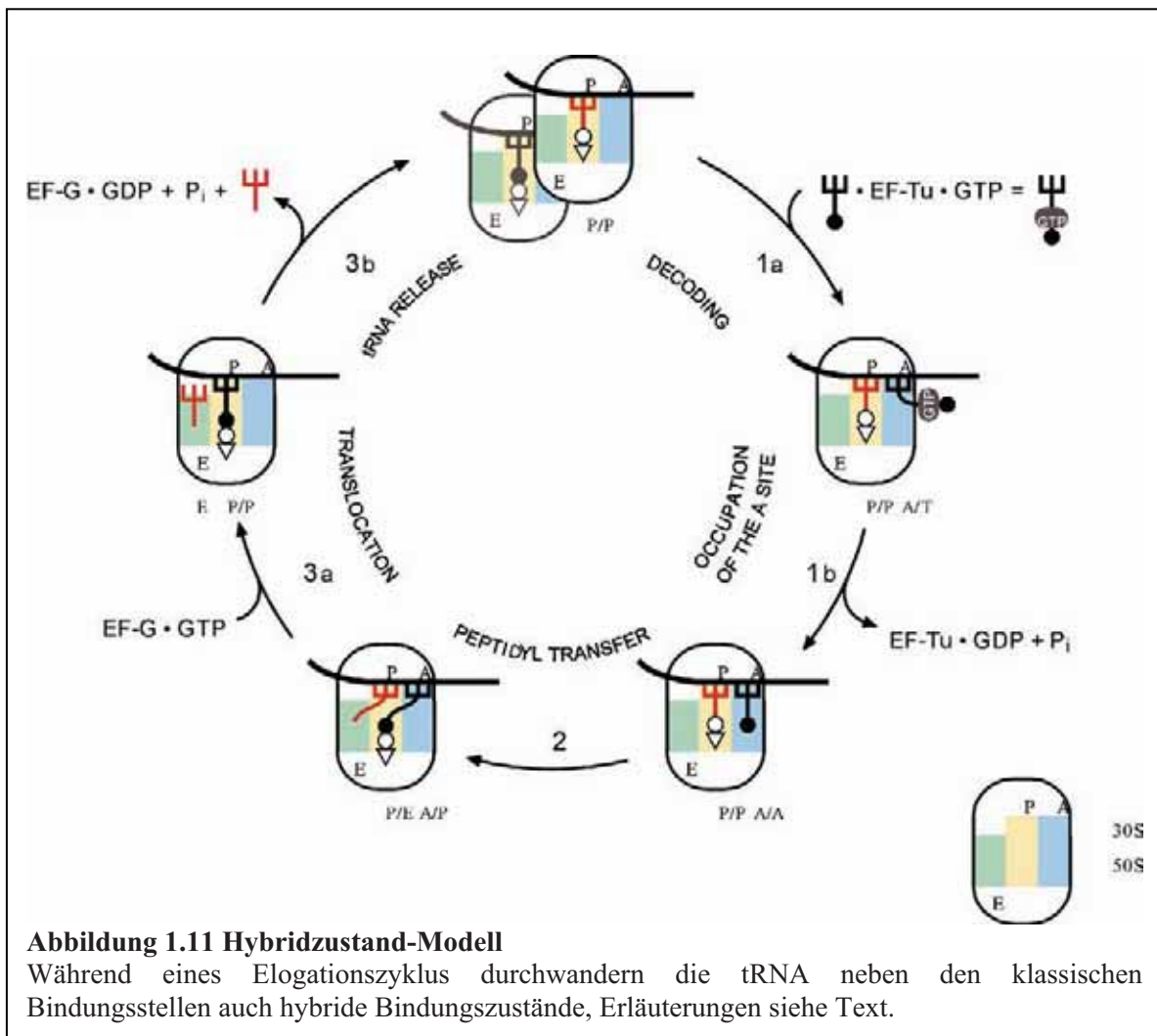
1.3.3 Elongationsmodelle

Die Translokation von zwei tRNA Molekülen und der mRNA ohne Verlust des Leserasters innerhalb des Ribosoms ist ein entscheidender Prozess während der Proteinbiosynthese. Die Überführung von PRE zu POST und POST zu PRE ist begleitet von strukturellen Änderungen innerhalb des Ribosoms (Polacek et al., 2000).

Zwei Modelle des Elongationszyklus versuchen die strukturellen Änderungen sowie auch funktionelle Aspekte zu beschreiben: (a) Hybridzustand-Modell (Hybrid-State Model) (Moazed and Noller, 1989b) und (b) α - ϵ -Modell (Nierhaus, 1996) (Dabrowski et al., 1998), das eine Weiterentwicklung des allosterischen Drei-Stellen Modells ist.

1.3.3.1 Hybridzustand-Modell

Das Hybridzustand-Modell (Abbildung 1.11) beruht auf der Beobachtung, dass bestimmte Nukleotide der rRNAs durch die Stellen spezifische Bindung von tRNAs in A-, P-, und E-Stelle vor chemischen Reagenzien (Ketoxal und Dimethylsulfat (DMS)) geschützt werden. Dieses Modell beschreibt eine sequentielle Wanderung der tRNAs innerhalb der Untereinheiten. Nach der Peptidübertragungsreaktion wandert der Akzeptorstamm der tRNAs innerhalb der 50S Untereinheit, der Anticodonstamm verbleibt dabei unverändert in der 30S Untereinheit. Dadurch gelangen die tRNAs in die Hybridzustände. Die zwei in der



Elongationsphase entstehenden Hybridzustände werden mit A/P und P/E bezeichnet. Hier bezeichnet der Buchstabe vor dem Schrägstrich die Art des Schutzmusters in der 30S Untereinheit und der Buchstabe hinter dem Schrägstrich die Art des Schutzmusters in der 50S Untereinheit. Durch die Wirkung von EF-G erfolgt die Translokation der tRNAs aus den hybriden Zuständen in die klassischen Bindungsstellen (P- und E-Stelle). Die E-Stelle zeigt in diesem Modell nur ein Schutzmuster auf der 23S rRNA (50S Untereinheit), nicht aber für die 16S rRNA (30S Untereinheit). Die Bindung eines ternären Komplex zu einem posttranslokationalen Zustand eines Ribosoms mit einer Peptidyl-tRNA in der P-Stelle liefert einen weiteren Hybridzustand A/T, bei der sich der Anticodonstamm der tRNA des ternären Komplexes in der A-Stelle der 30S Untereinheit befindet, aber der Akzeptorstamm durch die Wechselwirkung von EF-Tu mit dem Ribosom nicht in die A-Stelle der 50S Untereinheit eintreten kann.

Die Definition der drei Hybridzustände beruht auf der Beobachtung von 16 geschützten Positionen der 23S rRNA (Moazed and Noller, 1989b) (Moazed and Noller, 1991), die unter Verwendung des konventionellen Puffersystems (hohe Magnesiumkonzentration, keine

Polyamine) erhalten wurden. 14 dieser 16 geschützten Positionen innerhalb der 23S rRNA beruhen auf dem flexiblen 3'-CCA Ende des Akzeptorstammes der tRNA (Moazed and Noller, 1991). Im konventionellen Puffersystem konnten die Hybridzustände kryoelektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, in den so genannten *in vivo* nahen Pufferbedingungen (geringe Magnesiumkonzentration, Polyaminsystem) waren diese Hybridstellen jedoch nicht detektierbar (Agrawal et al., 1999b; Agrawal et al., 2000).

Kürzlich publizierte Ergebnisse mit fluoreszenzmarkierten tRNA Molekülen erfordern eine Modifikation des Hybridzustand-Modells. Die Gruppe von Cooperman ermittelte ein zusätzliches Hybrid-Intermediat, das unter Verwendung des Antibiotikums Viomycin detektiert wurde (Pan et al., 2007). In diesem Intermediat liegt die Peptidyl-tRNA in der klassischen A-Stelle (A/A) während das Akzeptorende der deacyl-tRNA der P-Stelle sich bereits in die E-Stelle bewegt hat (P/E). Die Analyse in der Gruppe von Blanchard konnte zeigen, dass es sich bei den Hybridzuständen (A/A und P/E), sowie (A/P und P/E), um metastabile Intermediate handelt, die im Millisekundenbereich aus dem klassischen PRE Zustand (A/A und P/P) hervorgehen können und wieder in diesen zurückgewandelt werden konnten (Munro et al., 2007). Der klassische PRE Zustand lag unter den gegebenen Experimentalbedingungen mit 60% als dominierender Zustand vor. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine sequentielle Wanderung der tRNA durch das Ribosom während der Translokation wahrscheinlich ist, diese Intermediate aber nur unter bestimmten Experimentalbedingungen beobachtet werden können.

1.3.3.2 α - ϵ -Modell

Das zweite Modell, das α - ϵ -Modell basiert auf einer anderen Methode von Schutzexperimenten. Bei dieser Methode, der Thiophosphat-Methode (Dabrowski et al., 1998), werden Positionen des Zucker-Phosphatrückrats innerhalb der tRNAs durch die Stellen spezifische Bindung der tRNA an das Ribosom vor der Spaltung durch Jod geschützt. Die Schutzmuster der tRNAs für die verschiedenen funktionellen Stadien des Ribosoms (P_i , A, P_{PRE} und P_{POST}) wurden unter *in vivo* nahen Pufferbedingungen (geringe Magnesiumkonzentration, Polyaminsystem) bestimmt. Die Ergebnisse dieser Schutzexperimente zeigen, dass sich das Schutzmuster einer tRNA in der A-Stelle von dem Schutzmuster einer tRNA der P-Stelle unterscheidet, sich jedoch dieses Schutzmuster während des Elongationsschrittes kaum ändert. Obwohl im Verlauf der Translokation die tRNA von der A-Stelle in die P-Stelle und die tRNA von der P-Stelle in die E-Stelle bewegt wird, zeigen die tRNAs vor und nach der Translokation ein identisches Schutzmuster. Diese

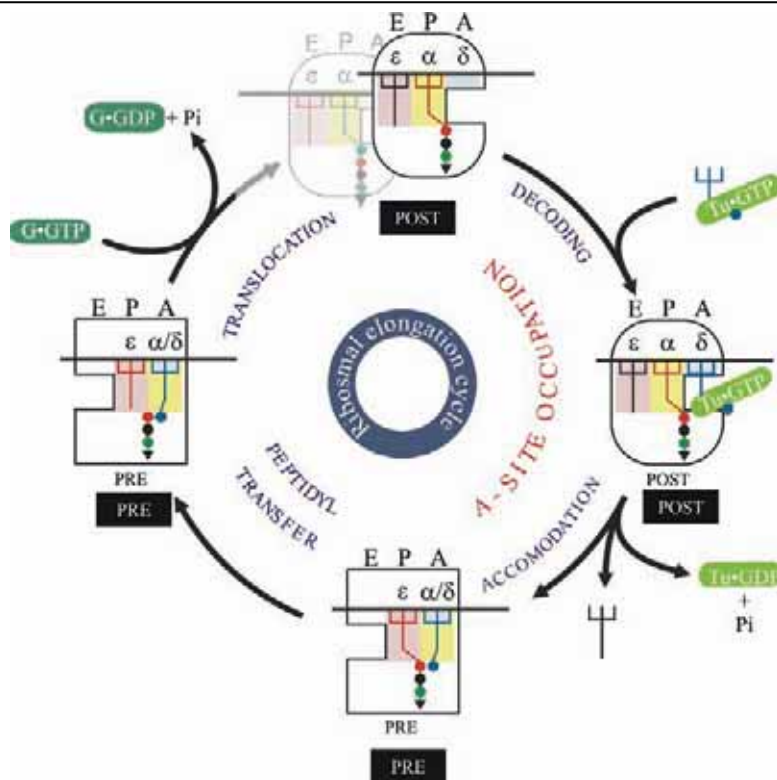


Abbildung 1.12 α - ϵ - Modell:

Die Bewegung der beiden tRNA während des Translokationsschrittes erfolgt simultan durch eine bewegliche Domäne. Die Bewegliche Domäne trägt die α - und die ϵ Bindestellen. Die Dekodierungsdomäne (δ) ist in der A Stelle lokalisiert. Modifiziert nach Dabrowski, 1998 #11781

Beobachtung führte zur Annahme, dass durch eine bewegliche Domäne mit zwei Bindestellen die A-Stellen tRNA in die P-Stelle und gleichzeitig die P-Stellen tRNA in die E-Stelle bewegt werden. Die Entdeckung, dass die tRNAs in A- und P-Stelle und die rRNA innerhalb des PT Zentrums Rotationssymmetrie zeigen (Bashan and Yonath, 2005), verstärkt die Annahme, dass eine bewegliche Domäne zur Beförderung der tRNAs existiert.

Eine dieser Bindestellen liefert das α -Schutzmuster, die andere Bindestelle liefert das ϵ -Schutzmuster. Die Selektion der cognaten tRNA in der ribosomalen A-Stelle erfordert eine spezielle Dekodierungsdomäne (δ), die nicht beweglich ist. Diese befindet sich auf der 30S Untereinheit und verbleibt stabil in der A-Stelle. Im prätranslokationalen Zustand (PRE) des Ribosoms überlagern sich die δ - und die α -Bindestelle (Abbildung 1.12).

Das α - ϵ -Modell ist eine Weiterentwicklung des allosterischen Drei-Stellen-Modells (Rheinberger and Nierhaus, 1983 ; Rheinberger, 1991), das bereits die reziproke Kopplung zwischen E-Stellen tRNA und A-Stellen Aminoacyl-tRNA beschreibt. Über das Drei-Stellen-Modell hinaus erklärt das α - ϵ -Modell die reziproke Kopplung über die beweglichen Domänen.

Im posttranslokationalen Zustand (POST) weist die A-Stelle nur eine geringe Affinität für tRNAs auf, da sich die beiden Bindestellen α und ϵ in der P- und E-Stelle befinden. Im

prätranslokationalen Zustand (PRE) überlagert die α -Bindestelle die Dekodierungsstelle δ und schafft so eine hochaffine A-Stelle im Ribosom, während die ε -Bindestelle in der P-Stelle lokalisiert ist. Die E-Stelle ist nun ohne Bindestelle und zeigt eine niedrige Affinität für die tRNA (vgl. Abbildung 1.12).

Das α - ε -Modell steht nicht im Widerspruch zum Hybridzustand Modell, sondern liefert eine strukturelle Erklärung für die Bewegung der tRNAs durch das Ribosomen ohne Verlust des Leserasters, da in diesem Modell die ribosomale Umgebung für definierte Bewegungen der tRNAs sorgt. Diese Bewegung könnte prinzipiell auch sequentiell für die Untereinheiten erfolgen.

1.4 Termination der Proteinbiosynthese

Die Elongation schreitet mit 10-20 Aminosäureverknüpfungen pro Sekunde voran, bis eines der Stoppcodone (UAA, UAG oder UGA) in die A-Stelle des Ribosoms eintritt und die Termination einleitet. Die basalen Ereignisse der Termination sind das Erkennen des Stoppcodons der mRNA in der A-Stelle und das Freisetzen des Proteins von der Peptidyl-tRNA in der P-Stelle. Diese beiden Ereignisse erfolgen durch Terminationsfaktoren der Klasse I (*class I peptide release factors*), die auch als Entlassungsfaktoren der Klasse I oder Dekodierungsterminationsfaktoren bezeichnet werden. In den meisten Eubakterien gibt es zwei der Klasse I Terminationsfaktoren, RF1 und RF2, die sich in der Dekodierungsmöglichkeit der Stoppcodone unterscheiden. RF1 erkennt UAA und UAG, während RF2 UGA und UAA dekodiert (Caskey et al., 1969) (Scolnick et al., 1968). In Eukaryoten und Archaeobakterien werden die Stoppcodone nur durch einen einzigen Faktor erkannt (eRF1 und aRF1) (Frolova et al., 1994) (Dontsova et al., 2000). Obwohl zwischen den bakteriellen und den eukaryotischen Terminationsfaktoren keine Sequenz- oder Faltungsähnlichkeiten bestehen, d.h. dass sich die Mechanismen der Termination erst nach der Domäntrennung vor etwa 2.7 Milliarden Jahren herausgebildet haben, konnte innerhalb der Klasse I Terminationsfaktoren aller drei Domänen des Lebens eine konservierte Aminosäure-Triade gefunden werden: Das konservierte Aminosäure-Sequenzmotiv, das Tripeptid GGQ, ist in allen Klasse I Faktoren zu finden (Frolova et al., 1999). Dieses Motiv ist wichtig für die Hydrolyse des Polypeptides. Die Notwendigkeit des GGQ Motivs für die Peptidfreisetzung konnte *in vitro* (Zavialov et al., 2002) und *in vivo* (Mora et al., 2003) für RF1 und RF2 aus *E. coli* gezeigt werden, obwohl die genaue Funktion des Sequenzmotivs weiterhin offen bleibt.

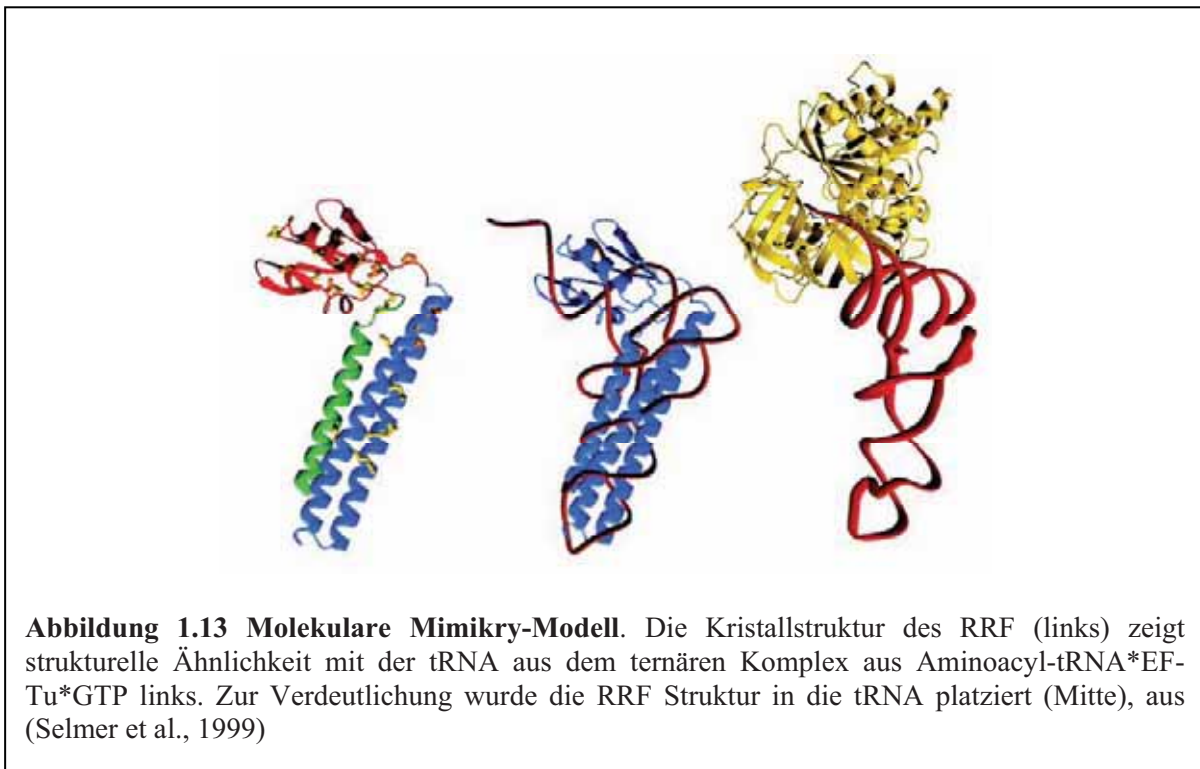
Ein zweites, weniger stark konserviertes Sequenzmotiv der Terminationsfaktoren der Klasse I, TASNIKS für eRF1 und aRF1, sowie die in *E. coli* gefundenen Motive PAT (in RF1) und SPF (in RF2) sind maßgeblich an der Dekodierung der Stoppcodone beteiligt (Ito et al., 1998; Ito et al., 2000) (Nakamura et al., 2000). Somit erfüllen die Klasse I Terminationsfaktoren zwei Funktionen: I) Erkennung (Dekodierung) der Stoppsignale und II) das Freisetzen der Polypeptidkette.

Nach erfolgtem Freisetzen des Polypeptids wird der Terminationsfaktor der Klasse I durch die Wirkung eines Terminationsfaktors der Klasse II (RF3, eRF3) vom Ribosom entfernt. RF3 und eRF3 zeigen die typische Struktur eines G-Proteins, aber eine atypische Funktion (Pel et al., 1998). Die Funktionsweise von RF3 in *E. coli* wurde in einer Serie von Experimenten von Ehrenberg und Mitarbeitern aufgeklärt (Freistroffer et al., 1997) (Pavlov et al., 1997a; Pavlov et al., 1997b) (Zavialov et al., 2001) (Zavialov et al., 2002). RF3 bindet in der GDP Form an den Terminationskomplex. Nach Hydrolyse des Peptids erfolgt der Austausch von GDP durch GTP. Dies führt zu einer Konformationsänderung innerhalb des RF3 und zur Entlassung des Klasse I Terminationsfaktors. Anschließend erfolgt die GTP Hydrolyse und die Dissoziation von RF3*GDP. Im Gegensatz zum RF3 Gen (*prfC*) aus *E. coli* ist das eukaryotische Gen für eRF3 (*sup35* in *S.cerevisiae*) ein essentielles Gen, die Wirkungsweise des eRF3 unterscheidet sich von dem bakteriellen RF3 (Inge-Vechtomov et al., 2003; Kisselev et al., 2003).

Mit der Bindung des RF3 beginnt der Prozess des Recyclings des eubakteriellen Ribosoms.

1.4 Ribosomrecycling

Das Ribosomrecycling wird als vierte Phase der Proteinbiosynthese angesehen. Obwohl eine Vielzahl von Experimenten zum Ablauf des Ribosomrecyclings der Eubakterien innerhalb der letzten 40 Jahren veröffentlicht wurden, lässt sich noch kein klares Bild für das Ribosomrecycling zeichnen (Hirokawa et al., 2006 ; Vesper and Wilson, 2006). In Eubakterien sind ein weiterer Terminationsfaktor der Klasse II, der Ribosomrecycling Faktor (RRF), und EF-G an diesem Prozess beteiligt (Hirashima and Kaji, 1972a; Hirashima and Kaji, 1973). Weiterhin wird die Teilnahme des Initiationsfaktors 3 am Prozess der Dissoziation des 70S Ribosoms in die Untereinheiten diskutiert (Karimi et al., 1999) (Umekage and Ueda, 2006) (Peske et al., 2005).

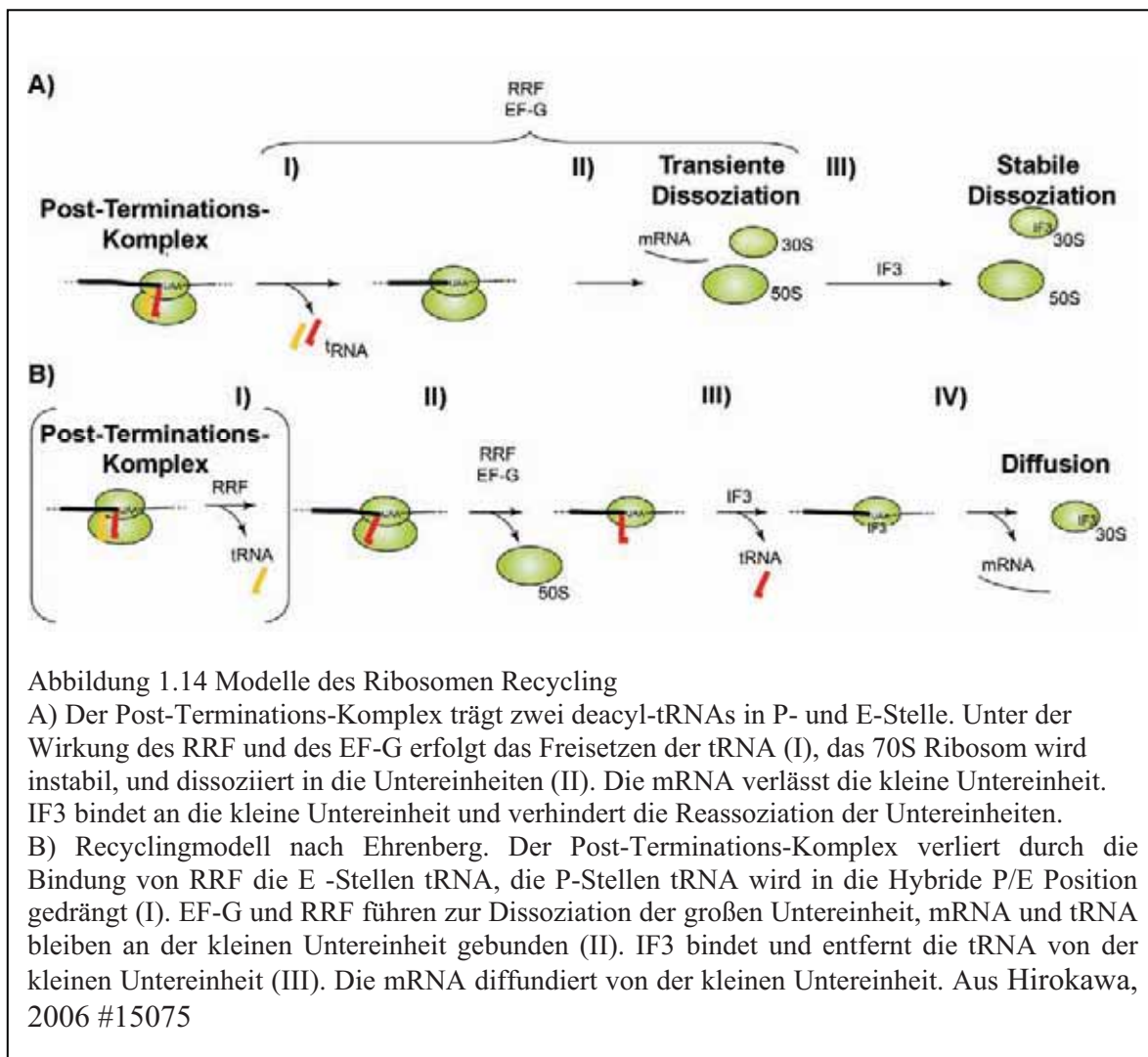


Die Kristallstruktur des RRF aus *Thermotoga maritima* zeigt eine erstaunliche Ähnlichkeit zu der Struktur einer tRNA (Selmer et al., 1999) und führte zu der Idee der molekularen Mimikry der Terminationsfaktoren, Abbildung 1.13.

Kaji und Mitarbeiter schlagen für die Wirkung des RRF einen Mechanismus der strukturellen und funktionellen Mimikry vor. Die Ähnlichkeit der Kristallstruktur von RRF mit einer tRNA lieferte die Idee, dass RRF in der ribosomalen A-Stelle bindet und wie eine tRNA transloziert werden könnte. Eine Codon-RRF-Wechselwirkung und eine Akzeptorarm-Wechselwirkung mit dem Peptidylübertragungszentrum werden in diesem Modell nicht vorausgesetzt. Aus der ribosomalen A-Stelle erfolgt durch die Wirkung von EF-G, analog der Funktion im Elongationszyklus, die Translokation des RRF anstelle einer tRNA in die P-Stelle. Es entsteht dadurch ein instabiler Ribosom*Protein*mRNA*tRNA-Komplex, der ohne Codon-Anticodon-Wechselwirkung in der P-Stelle in seine Bestandteile dissoziiert (Hirokawa et al., 2002) (Selmer et al., 1999). Initiationsfaktor 3 (IF3) bindet an die kleine Untereinheit und verhindert eine Reassoziierung der Untereinheiten (Abbildung 1.14A).

Ehrenberg und Mitarbeiter schlagen ein Modell vor, bei dem das Ribosom durch die Wirkung von RRF und EF-G in die Untereinheiten dissoziiert wird, aber sowohl die mRNA als auch die tRNA der P-Stelle an der kleinen Untereinheit gebunden bleiben. Die Entfernung der

mRNA und der tRNA von der kleinen Untereinheit erfolgte bei diesem Modell durch den IF3 (Karimi et al., 1999), (Abbildung 1.14B).



Eine andere Möglichkeit des Ribosomrecycling, die auf der Annahme einer Translokation von RRF durch EF-G beruht, besteht darin, dass durch die Translokation von RRF die Untereinheiten auseinandergedrückt werden können und dadurch die Dissoziation des Ribosoms eingeleitet wird.

Strukturanalysen und Bindungsstudien zeigten eine Bindungsstelle von RRF innerhalb des Ribosoms, in der RRF gänzlich unerwartet die beiden tRNA Bindestellen, A- und P-Stelle überlappt und nicht, wie ursprünglich angenommen, die tRNA Mimikry nutzt und in die ribosomale A-Stelle bindet (Gao et al., 2005; Lancaster et al., 2002 ; Nakano et al., 2003 ; Wilson et al., 2005). Ein anderes Modell, in dem EF-G die Domäne II von RRF gegen eine der wichtigsten Brücken (Bridge 2a) zwischen den Untereinheiten drückt und damit die Dissoziation einleitet, wurde vorgeschlagen (Gao et al., 2005; Wilson et al., 2005).

Das zur Zeit wahrscheinlichste Szenario des Ribosomrecycling ist, das RRF und EF-G*GTP ausreichend sind, um den Post-Terminations-Komplex in die ribosomalen Untereinheiten zu spalten, also eine transiente Dissoziation herbeizuführen. Der Initiationsfaktor 3 ist notwendig, um die Reassoziierung der Untereinheiten zu verhindern und somit eine stabile Dissoziation aufrecht zu erhalten. (Hirokawa et al., 2006; Vesper and Wilson, 2006).

1.5 Inhibition der Proteinbiosynthese durch Antibiotika

Die komplexen Vorgänge der Proteinbiosynthese und die Interaktionen des Ribosoms mit den Initiationsfaktoren, Elongationsfaktoren und Aminoacyl-tRNAs bieten zahlreiche Angriffstellen für die Hemmung durch Antibiotika. Nahezu jeder Schritt der Initiation und der Elongation kann spezifisch durch Antibiotika inhibiert werden (Abbildung 1.15).

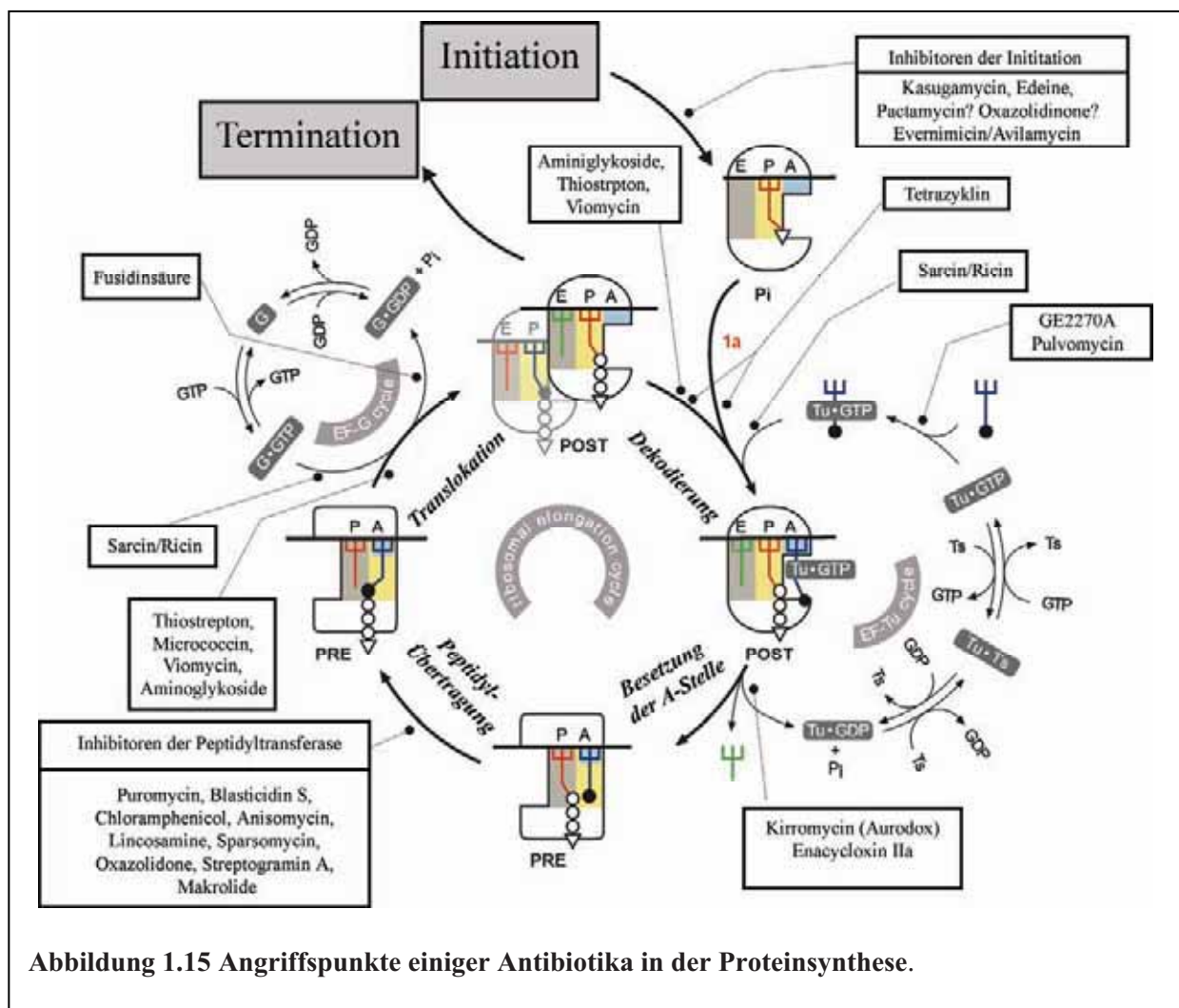


Abbildung 1.15 Angriffspunkte einiger Antibiotika in der Proteinsynthese.

Die Kombination aus Biochemie und Strukturbiologie ermöglicht den Einsatz der Antibiotika zur Aufklärung der molekularen Details der Proteinbiosynthese. Im Umkehrschluß lassen sich

mit den etablierten Methoden und der Strukturbiologie die Funktionsweise der Antibiotika und deren Derivate untersuchen. Gerade die Entwicklung neuer Antibiotika und die zielgerichtete Veränderung bekannter Antibiotika erfolgten durch die Kenntnis der Ribosomenstruktur. Die immer häufiger auftretenden multiplen Resistenzen einiger Bakterienstämme gegen die klinisch verwendeten Antibiotika durch unsachgemäße Verwendung der zur Verfügung stehenden Antibiotika, macht eine Entwicklung neuer oder derivatisierter Antibiotika zwingend notwendig.

1.6 Zielsetzung

Mit der Lösung der Kristallstruktur des *E. coli* 70S Ribosoms erfolgte ein weiterer Schritt zum besseren Verständnis der Vorgänge der Proteinbiosynthese im Modellorganismus *E. coli*. Die hohe Konservierung des Mechanismus der Proteinbiosynthese, der Ribosomenstruktur und der Elongationsfaktoren boten die Möglichkeit Experimente und Strukturen der Faktoren und des Ribosoms aus verschiedenen Organismen zu nutzen, um ein Gesamtbild der Proteinsynthese zu erstellen. Und obwohl die generellen Vorgänge der Proteinsynthese immer klaren werden, kam es zu fehlerhaften Interpretationen der Ergebnisse. Die biochemische Aufklärung, meistens in *E. coli* durchgeführt, passte gelegentlich nicht mit den strukturellen Daten, z.B. aus *T. thermophilus* oder *H. marismortui*, überein (Tu et al., 2005; Wilson, 2004). Die Kombination aus biochemischen Daten aus *in vitro* und *in vivo* Experimenten können zusammen mit Strukturdaten zur Aufklärung der Mechanismen der Proteinsynthese genutzt werden. Eine Fehlerquelle, die zur Fehlinterpretation der Daten über die ribosomale E-Stelle führte, war die Verwendung der konventionellen Pufferbedingungen in *in vitro* Experimenten (Rheinberger and Nierhaus, 1987 ; Wintermeyer et al., 1990) (Agrawal et al., 1999b ; Blaha and Nierhaus, 2001). Erst die Einführung des Polyaminpuffersystems (Bartetzko and Nierhaus, 1988) ermöglichte die stabile Bindung der E-Stellen tRNA und erleichterte die Analyse der Bedeutung der deacyl-tRNA der E-Stelle in der Proteinbiosynthese (Übersichtsartikel von (Dinos et al., 2005; Márquez et al., 2002)).

Ziel dieser Doktorarbeit war es, bestehende *in vitro* Systeme zur weiteren Analyse der molekularen Details der Elongationsprozesse zu optimieren. Die optimierten Systeme sollen in odifizierter For in der Analyse der Prozesse der Termination und des Ribosomrecyclings Anwendung finden. Die Optimierung der *in vitro* Systeme dient dazu ein *in vivo*-nahe *in vitro*-Systeme zu erstellen. Hierfür sollen etablierte Systeme (Stellenspezifische tRNA Bindung (Watanabe) und Poly Uridin-abhängige Poly-Phenylalaninsynthese) bezüglich

Effizienz und Genauigkeit verbessert werden. Neue Testsysteme zur Aktivitätsprüfung isolierter Proteine (RFs, RRF und EF4 (LepA) und RelA) sollen entwickelt werden. Die Analyse von Elongationsprozessen mittels „toeprint“-Experimenten soll unter *in vivo*-nahen Pufferbedingungen etabliert werden, um neue Aspekte der Translokationsreaktion bzw. der Termination und des Ribosomrecyclings zu erhalten. Die Bindung von RelA an das Ribosomen und die Aufklärung der Bindungsposition sollen Aufschlüsse über den Regulationsmechanismus des RelA in Aminosäuremangelsituationen (*stringent response*) geben.

Zum Aufbau eines *in vivo*-nahen Terminations- und Ribosomrecycling-Systems sollten die beteiligten Komponenten (Ribosomen, mRNAs, tRNAs und Proteinfaktoren) isoliert und auf ihre Aktivität getestet werden. Zur Ermittlung der Funktion und der Wirkungsweise des Ribosomrecycling Faktors (RRF, *ribosome recycling factor*), wurden synthetische mRNAs entworfen, hergestellt und isoliert, die in einem „toeprint“-Experiment eingesetzt werden können (Hartz et al., 1989). Mit diesem „toeprint“-Experiment soll eine mögliche Translokation der mRNA, bzw. der tRNA(s) durch RRF und EF-G geprüft werden.

Die Kombination der biochemischen Methoden mit der kryoelektronenmikroskopischen Rekonstruktion von ribosomalen Komplexen soll die noch offenen Fragen der Termination und des Ribosomrecycling beantworten. Insbesondere der Zeitpunkt des Freisetzens der tRNAs und die Bindeposition des RRF sind von großem Interesse für das Verständnis des Mechanismus des Ribosomrecycling.