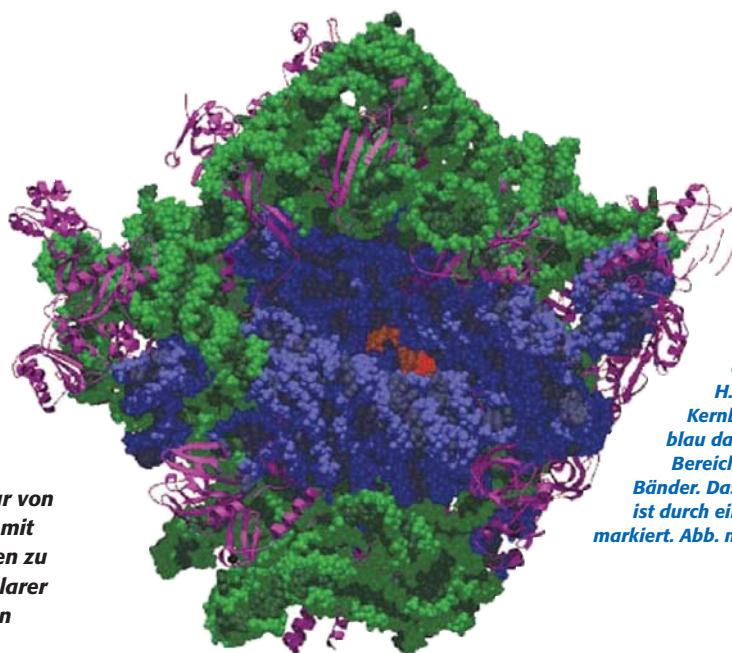


# Das Ribosom: Struktur und Funktionen eines Mega-Ribozyms

Marina V. Rodnina und Wolfgang Wintermeyer

Institute für Physikalische Biochemie und Molekularbiologie, Universität Witten/Herdecke



**Abb. 1:** Struktur der großen Untereinheit des Ribosoms aus *H. marismortui*. Der konservierte Kernbereich der 23S/28S rRNA ist in blau dargestellt, weniger konservierte Bereiche in grün, Proteine als violette Bänder. Das Peptidyltransferase-Zentrum ist durch einen gebundenen Inhibitor (rot) markiert. Abb. mit Erlaubnis nachgedruckt aus Science.

**Die Aufklärung der atomaren Struktur von Ribosomen und funktionelle Studien mit schnellen kinetischer Methoden haben zu einem vertieften Verständnis molekularer Mechanismen der Ribosomenfunktion geführt. Für wesentliche Funktionen des Ribosoms, Decodierung und Peptidverknüpfung, ist die ribosomale RNA die essentielle Komponente, während die ribosomalen Proteine überwiegend strukturelle Funktionen haben. Insbesondere besteht das katalytische Zentrum des Ribosoms nur aus RNA. In diesem Artikel wird der Kenntnisstand hinsichtlich Struktur und Mechanismus der RNA-katalysierten Peptidverknüpfung zusammengefasst.**

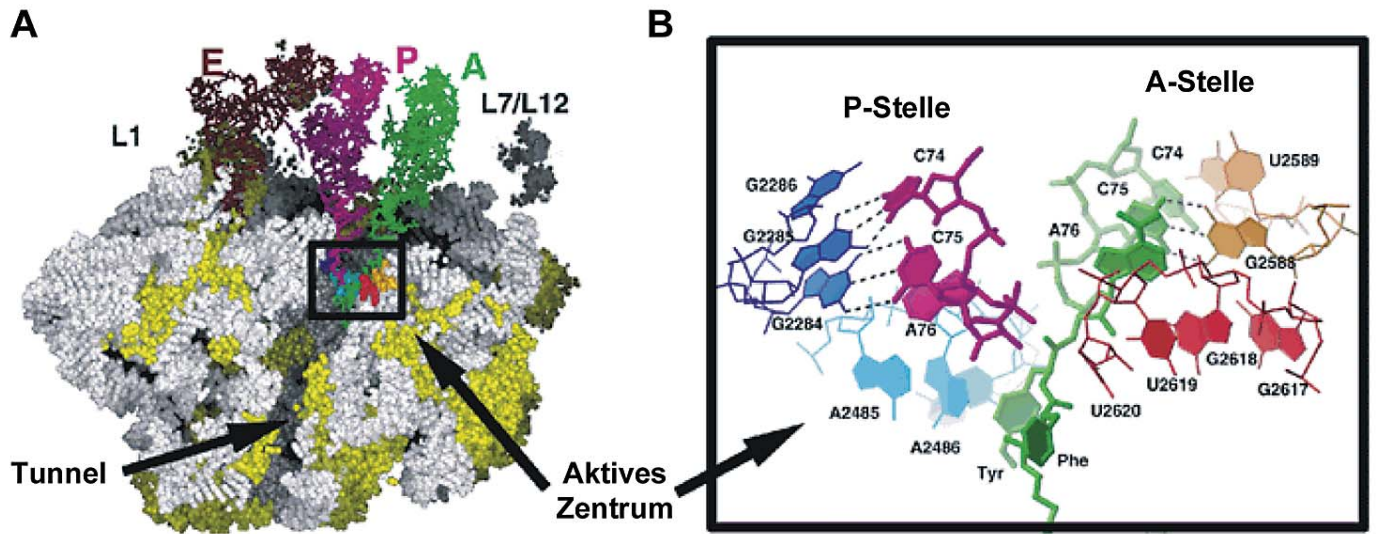
## Struktur des Ribosoms

► Der Aufbau der Ribosomen ist in allen Organismen ähnlich. Es sind Ribonucleoprotein-Partikel mit einem Durchmesser um 20 nm, deren zwei Untereinheiten aus mehreren RNA-Molekülen und zahlreichen Proteinen bestehen. Bakterielle Ribosomen enthalten in ihrer kleinen Untereinheit (30S) ein Molekül 16S rRNA und 21 Proteine, in der großen Untereinheit (50S) je ein Molekül 23S rRNA und 5S rRNA sowie mehr als 30 Proteine. Cytosolische Ribosomen eukaryontischer Zellen sind größer, da sie größere RNAs und mehr Proteine enthalten.

Der wesentliche Durchbruch bei der Strukturaufklärung von Ribosomen war die Bestimmung der Kristallstruktur der 50S-Untereinheit des Ribosoms aus einem halophilen Archaeon, *Haloarcula marismortui*, bei 2,4 Å Auflösung (Abb. 1; BAN *et al.*, 2000). Die Struktur zeigte – wie auch die wenig später veröffentlichte Struktur der 30S-Untereinheit des Ribosoms aus dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* (WIMBERLY *et al.*, 2000; SCHLUENZEN *et al.*, 2000) und die bei geringerer Auflösung (5,5 Å) bestimmte Struktur von 70S-Riboso-

men aus *T. thermophilus* mit gebundenen tRNA-Liganden (YUSUPOV *et al.*, 2001) –, dass die rRNA das strukturelle Gerüst des Ribosoms bildet, an das die ribosomalen Proteine, die überwiegend globuläre Gestalt aufweisen, angelagert sind. Die 50S-Struktur aus dem Bakterium *Deinococcus radiodurans* (HARMS *et al.*, 2001) ist sehr ähnlich der aus *H. marismortui*. Besonders im Bereich der funktionellen Zentren – Decodierzentrum, Peptidyltransferase-Zentrum – sind die rRNAs stark konserviert (Abb. 1).

Die Struktur der rRNA ist hochkomplex. Unter den Wechselwirkungen, die zur Stabilisierung der räumlichen Struktur beitragen, finden sich neben den von kleineren RNAs bekannten Tertiärstrukturmotiven auch neue Motive, z.B. das „A-minor“-Motiv, bei dem ein Adenosin Wasserstoffbrückenbindungen mit Basenpaaren in der kleinen („minor“) Furche benachbarter Doppelhelices und deren Rückgrat ausbildet. Diese Art der Wechselwirkung spielt bei der Stabilisierung der tRNA-Bindung im Decodierzentrum der 16S rRNA sowie bei der Bindung des 3'-terminalen Adenosins der tRNA an 23S rRNA im Peptidyltransferase-Zentrum eine Rolle.



**Abb. 2:** Substratbindung im Peptidyltransferase-Zentrum. **A.** Schnitt durch die große Untereinheit mit gebundenen tRNAs. Die tRNA-Positionen in A-Stelle (grün), P-Stelle (violett) und E-Stelle (braun) sind aus der 70S-Kristallstruktur (Yusupov et al., 2001) übernommen. Der Tunnel, durch den das Peptid austritt, ist im Schnitt gezeigt. **B.** Basenpaarungen der tRNA-CCA-Sequenzen mit 23S rRNA in P- und A-Stelle. In der P-Stelle ist das Oligonucleotid CCA (violett) an Basen der P-Schleife (dunkelblau) der 23S rRNA gebunden. In der A-Stelle ist als Analog der Peptidyl-tRNA ein Derivat von CCA-Pm-Phe (grün) an die A-Schleife (braun) gebunden. Basen sind nummeriert nach der Sequenz der 23S rRNA von *H. marismortui*. Die im Text diskutierten Basen im aktiven Zentrum sind A2585 (*E. coli*: A2450) und A2486 (*E. coli*: A2451) (hellblau). Abb. mit Erlaubnis nachgedruckt aus Nature.

**Das Ribosom ist ein Ribozym**

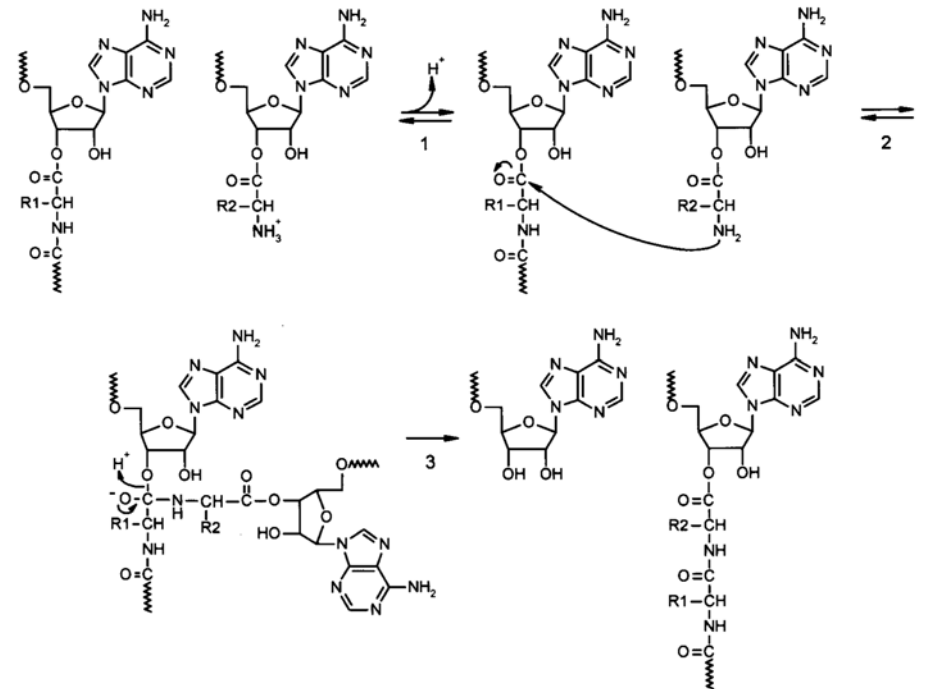
Das Peptidyltransferase-Zentrum (PT-Zentrum) ist in der großen Untereinheit des Ribosoms lokalisiert. 50S-Untereinheiten, die durch Proteinextraktion weitgehend proteinfrei gemacht worden waren, zeigten noch PT-Aktivität, was auf eine wesentliche Rolle der 23S rRNA bei der Katalyse der Peptidverknüpfung hinwies (NOLLER et al., 1992). Die Aufklärung der atomaren Struktur der 50S-Untereinheit hat nun gezeigt, dass das PT-Zentrum, das durch einen dort gebundenen Inhibitor eindeutig lokalisiert wurde (Abb. 1), tatsächlich nur aus RNA besteht (BAN et al., 2000; NISSEN et al., 2000). Damit ist das Ribosom als Ribozym identifiziert, in dem die RNA Träger der enzymatischen Aktivität ist.

Die bisher beschriebenen, natürlich vorkommenden Ribozyme katalysieren Phosphoryltransfer-Reaktionen, bei denen eine 2'-OH-Gruppe („self-splicing“-Introns; „hammerhead“-Ribozym) oder ein Wassermolekül (RNase P) für den nucleophilen Angriff auf eine benachbarte Phosphodiestergruppe aktiviert werden, häufig unter Beteiligung zweiwertiger Kationen (DOHERTY und DOUDNA, 2000). Die PT-Aktivität des Ribosoms ist das erste Beispiel für ein natürlich vorkommendes Ribozym mit (Aminosäure-)Polymerase-Aktivität. Ein synthetisches Ribozym mit PT-Aktivität konnte durch *In-vitro*-Selektion hergestellt werden (ZHANG und CECHE, 1997).

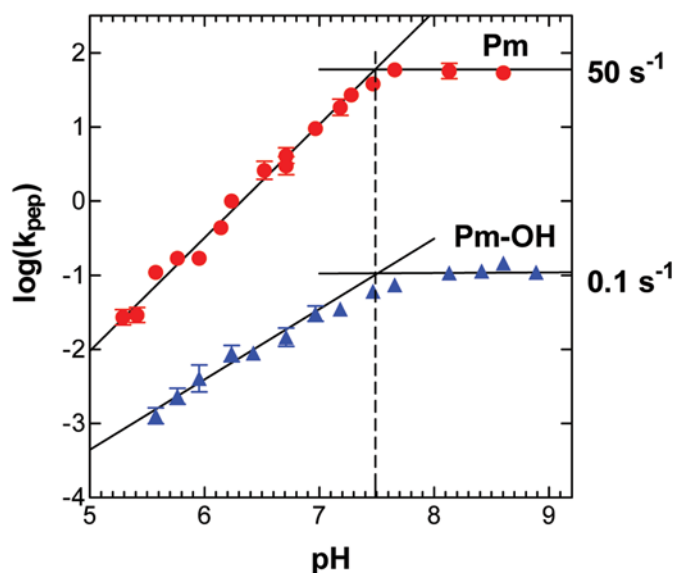
**Struktur des Peptidyltransferase-Zentrums**

Kristallstrukturen von *H. marismortui* 50S-Untereinheiten mit gebundenen Modellsubstraten und -produkten (Abb. 2) zeigen

die Anordnung der CCA-Sequenzen in P- und A-Stelle des PT-Zentrums (SCHMEING et al., 2002; HANSEN et al., 2002). In der P-Stelle sind C74 und C75 gepaart mit G2252 und G2251 (*E. coli*-Nummerierung), die zur



**Abb. 3:** Peptidyltransferase-Reaktion. Die 3'-Enden von Peptidyl-tRNA (links) und Aminoacyl-tRNA (rechts) sind schematisch gezeigt. **Reaktion 1:** Deprotonierung der nucleophilen Aminogruppe; **2:** Nucleophiler Angriff der Aminogruppe auf die Ester-carbonylgruppe und Bildung des tetraedrischen Zwischenprodukts; **4:** Zerfall des Zwischenprodukts unter Protonierung der austretenden Gruppe.



**Abb. 4:** pH-Abhängigkeit der Peptidyltransferase-Reaktion. Ribosomen mit Dipeptidyl-tRNA in der P-Stelle wurden mit Puromycin (Pm) oder einem Hydroxylderivat (Pm-OH) bei verschiedenen pH-Werten umgesetzt und die Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{pep}}$ ) der Tripeptid-Bildung gemessen. Für die Reaktion mit Pm ist die Steigung 1.5; ein Modell mit zwei protonierbaren Gruppen ergibt  $k_{\text{pep}}=50 \text{ s}^{-1}$  bei vollständiger Deprotonierung ( $\text{pH}>7.7$ ),  $k_{\text{pep}}=0.5 \text{ s}^{-1}$  bei einfacher Protonierung ( $\text{pK}_a=7.5$ ),  $k_{\text{pep}}<0.01$  bei zweifacher Protonierung ( $\text{pK}_a=6.9$ ). Für Pm-OH ist die Steigung nahe 1, und die protonierbare Gruppe hat  $\text{pK}_a=7.5$ .

P-Schleife der 23S rRNA gehören. Ähnlich ist C75 in der A-Stelle mit G2553 gepaart. Zusätzlich geht A76 in beiden Bindungsstellen „A-minor“-Interaktionen mit 23S rRNA ein (NISSEN *et al.*, 2001). Danach sind die CCA-Sequenzen der beiden Reaktionspartner durch zahlreiche Wechselwirkungen im aktiven Zentrum fixiert (Abb. 2), sodass die nucleophile Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA und die Ester-carbonylgruppe der Peptidyl-tRNA unmittelbar reagieren können. Diese Strukturmodelle, die natürlich noch der Bestätigung durch Kristallstrukturen ganzer Ribosomen mit den entsprechenden tRNA-Liganden bedürfen, sind im Einklang mit kinetischen Befunden, nach denen die sterisch günstige Anordnung der Reaktanden im aktiven Zentrum einen wesentlichen Teil der Katalyse ausmacht.

#### Mechanismus der Peptidyltransferase-Reaktion

Die Peptidverknüpfung zwischen Aminoacyl-tRNA und Peptidyl-tRNA (Abb. 3) läuft am Ribosom ab, ohne dass weitere Faktoren beteiligt sind. Die Geschwindigkeit der unkatalysierten Reaktion wird auf  $<10^{-4} \text{ s}^{-1}$  geschätzt. Am Ribosom muss die Reaktion mindestens mit der Geschwindigkeit des Elongationszyklus, etwa  $10 \text{ s}^{-1}$ , ablaufen, d.h. mehr als  $10^5$ -mal schneller sein.

Die starke pH-Abhängigkeit der PT-Reaktion hat schon früh zu der Vermutung geführt, dass eine protonierbare Gruppe des

Ribosoms durch Säure-Base-Katalyse an der Reaktion beteiligt ist (MADEN und MONRO, 1968; FAHNESTOCK *et al.*, 1970). Bei diesen frühen Messungen war die Reaktion allerdings so langsam (Minuten), dass der chemische Schritt kaum geschwindigkeitsbestimmend sein konnte. Dasselbe gilt für einige kürzlich veröffentlichte Messungen der PT-Reaktion an mutanten Ribosomen mit Basenaustauschen in der 23S rRNA (BAYFIELD *et al.*, 2001; POLACEK *et al.*, 2001). Die erste quantitative kinetische Untersuchung der PT-Reaktion wurde kürzlich mit Hilfe der „quench-flow“-Technik durchgeführt (KATUNIN *et al.*, 2002). Hierfür wurden *E. coli*-Ribosomen verwendet, die Dipeptidyl-tRNA in der P-Stelle trugen. Da die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen den natürlichen Substraten durch die Bindung der Aminoacyl-tRNA begrenzt wird (PAPE *et al.*, 1999), wurde stattdessen das Analog Puromycin (Pm) verwendet, dessen Bindung bei hoher Konzentration die Reaktion kinetisch nicht begrenzt.

Die PT-Reaktion mit Pm zeigte eine starke pH-Abhängigkeit (Abb. 4), wobei bei  $\text{pH}>7.7$  die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wurde und bei tiefen pH-Werten praktisch keine Reaktion mehr zu beobachten war. Die quantitative Analyse zeigte, dass zwei protonierbare Gruppen an der Reaktion beteiligt sind, deren  $\text{pK}_a$ -Werte bei 7.5 und 6.9 liegen (Abb. 4). Die Aminogruppe von Pm hat einen  $\text{pK}_a$  von 6.9, sodass der  $\text{pK}_a$  von 7.5 einer protonierbaren

Gruppe des Ribosoms zugeschrieben werden muss. Die Bestätigung wurde durch Versuche mit einem Pm-Derivat erhalten, bei dem die Aminogruppe durch eine Hydroxylgruppe ersetzt war (Pm-OH) (FAHNESTOCK *et al.*, 1970). Die Reaktion mit Pm-OH war wesentlich langsamer, im Einklang mit der geringeren Nucleophilie der OH-Gruppe im Vergleich zur  $\text{NH}_2$ -Gruppe. Die quantitative Analyse zeigte, dass an der PT-Reaktion mit Pm-OH nur eine protonierbare Gruppe beteiligt ist, deren  $\text{pK}_a$ -Wert bei 7.5 liegt (Abb. 4). Diese Gruppe muss ribosomal sein, da Pm-OH keinen  $\text{pK}_a$  um 7.5 aufweist.

Die kinetische Analyse erlaubt die Aufteilung der PT-Reaktion in eine pH-abhängige Reaktion, die etwa einen Faktor 100 der Gesamtbeschleunigung ausmacht, und eine pH-unabhängige Reaktion, die auch nach Protonierung des Ribosoms abläuft und immer noch  $>1000$ -mal schneller ist als die unkatalysierte Reaktion. Dieser Anteil der Reaktion ist auf die sterisch günstige Ausrichtung der Substrate im katalytischen Zentrum zurückzuführen (positionelle Katalyse), die demnach den größten Teil der Katalyse ausmacht. Die pH-abhängige Reaktion wird im folgenden diskutiert.

#### Säure-Base-Katalyse der Peptidyltransferase-Reaktion?

Die pH-Abhängigkeit der PT-Reaktion aufgrund der Protonierung einer ribosomalen Gruppe kann zwei Gründe haben: Säure-Base-Katalyse und/oder eine pH-induzierte Konformationsveränderung. Wie oben ausgeführt, besteht das ribosomale PT-Zentrum nur aus RNA. RNA-Basen – und nur diese kommen eigentlich für die Katalyse in Frage, da keine zweiwertigen Metallionen im aktiven Zentrum gefunden wurden – haben normalerweise  $\text{pK}_a$ -Werte um 3.5 (z.B. N1 von Adenin) oder tiefer. Ein  $\text{pK}_a$ -Wert von 7.5, wie er beobachtet wurde, erfordert also besondere Wechselwirkungen mit benachbarten Gruppen. So wurde vorgeschlagen, dass der  $\text{pK}_a$ -Wert eines bestimmten Adenin-Restes im aktiven Zentrum (A2451 in *E. coli*), dessen N3 eine Wasserstoffbrücke mit der nucleophilen  $\text{NH}_2$ -Gruppe des Substrats in der A-Stelle bildet (HANSEN *et al.*, 2002), durch Wechselwirkung mit benachbarten Basen (u.a. G2447) so weit verschoben sein könnte, dass er die Deprotonierung der  $\text{NH}_2^+$ -Gruppe bei der Bildung des tetraedrischen Zwischenprodukts begünstigen und damit die Reaktion beschleunigen könnte (NISSEN *et al.*, 2000).

Tatsächlich führte der Austausch von A2451 gegen andere Basen zu einem dominant-lethalen Phänotyp in *E. coli* (MUTH *et al.*, 2000; THOMPSON *et al.*, 2001). *In vitro* zeigten Ribosomen mit einer A2451U-Mu-



tation eine etwa 100-fach verlangsamte PT-Reaktion und der  $pK_a$ -Wert von 7.5 wurde nicht mehr beobachtet (KATUNIN *et al.*, 2002). Diese Befunde sind zwar im Einklang mit einer katalytischen Funktion von A2451 als protonierbarer Gruppe (NISSEN *et al.*, 2000), jedoch ist die postulierte, sehr weitgehende  $pK_a$ -Verschiebung experimentell nicht belegt.

Eine mögliche Alternative ist die Protonierung des N1 des A2450, das mit A2451 eine Stapelungswechselwirkung eingeht und ein Basenpaar mit C2063 bildet. Die Bildung eines A-C-Basenpaars erfordert (und erleichtert) die Protonierung des N1 des Adenins; der  $pK_a$ -Wert kann dadurch bis auf etwa 7 verschoben werden (CAI und TINOCO, 1996). Es ist also möglich, dass das N1 des A2450 die Gruppe im aktiven Zentrum ist, deren Protonierung die Reaktion hemmt. Ob es auch die Funktion einer katalytischen Base ausüben könnte, hängt von der sterischen Anordnung ab. Für die unmittelbare Übernahme eines Protons müsste der N1 des A2450 im Wasserstoffbrückenabstand vom Stickstoff des tetraedrischen Zwischenprodukts sein (~3 Å). Im 50S-Kristall ist der Abstand 7 Å, wobei hier das Basenpaar A2450-C2063 mit protoniertem A2450 bereits vorliegt. Es ist denkbar, dass die sterischen Verhältnisse während der Bildung des tetraedrischen Zwischenprodukts eine katalytische Funktion des A2450 zulassen. Um die Spekulation noch einen Schritt wei-

ter zu führen: Eine durch Protonierung und Bildung des A-C-Basenpaars induzierte Konformationsänderung, die bei der Bildung der Produkte durch Übertragung des Protons auf die austretende Gruppe rückgängig gemacht wird, wäre eine attraktive Möglichkeit, strukturelle Änderungen im aktiven Zentrum an den Reaktionsfortgang zu koppeln und so die Reaktion zu beschleunigen.

Die strukturellen Daten und die Befunde der kinetischen Analyse zeigen, dass die Bindung und Positionierung der Substrate ein wesentliches Element der enzymatischen Aktivität des Ribosoms ist. Die Beteiligung einer protonierbaren Gruppe des Ribosoms an der Reaktion deutet auf zusätzliche Säure-Base-Katalyse hin, ohne sie jedoch zu beweisen. Strukturelle und funktionelle Untersuchungen an weiteren Ribosomenmutanten sind erforderlich, um diesen Teil der katalytischen Funktion des Ribosoms besser zu verstehen.

#### Literatur

**Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2000):** The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905–920

**Doherty, E.A. and Doudna, J.A. (2000):** Ribozyme structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 597–615

**Fahnestock, S., Neumann, H., Shashoua, V. and Rich, A. (1970):** Ribosome-catalyzed ester formation. *Biochemistry* 9, 2477–2483

**Hansen, J.L., Schmeing, T.M., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2002):** Structural insights into peptide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11670–11675

**Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F. and Yonath, A. (2001):** High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* 107, 679–688

**Katunin, V.I., Muth, G.W., Strobel, S.A., Wintermeyer, W. and Rodnina, M.V. (2002):** Important contribution to catalysis of peptide bond formation by a single ionizing group within the ribosome. *Mol. Cell* 10: 339–346

**Maden, B.E. and Monro, R.E. (1968):** Ribosome-catalyzed peptidyl transfer. Effects of cations and pH value. *Eur. J. Biochem.* 6, 309–316

**Muth, G.W., Ortoleva-Donnelly, L. and Strobel, S.A. (2000):** A single adenosine with a neutral  $pK_a$  in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science* 289, 947–950

**Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2000):** The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920–930

**Noller, H.F., Hoffarth, V. and Zimniak, L. (1992):** Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256, 1416–1419

**Pape, T., Wintermeyer, W. and Rodnina, M.V. (1999):** Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J.* 18: 3800–3807

**Schmeing, T.M., Seila, A.C., Hansen, J.L., Freyborn, B., Soukup, J.K., Scaringe, S.A., Strobel, S.A., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2002):** A pre-translocational intermediate in protein synthesis observed in crystals of enzymatically active 50S subunits. *Nat. Struct. Biol.* 9: 225–230

**Thompson, J., Kim, D.F., O'Connor, M., Lieberman, K.R., Bayfield, M.A., Gregory, S.T., Green, R., Noller, H.F. and Dahlberg, A.E. (2001):** Analysis of mutations at residues A2451 and G2447 of 23S rRNA in the peptidyltransferase active site of the 50S ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9002–9007

**Schluenzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. and Yonath, A. (2000):** Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* 102: 615–623

**Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vonrhein, C., Hartsch, T. and Ramakrishnan, V. (2000):** Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407: 327–339

**Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H. and Noller, H.F. (2001):** Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292: 883–896

**Zhang, B. and Cech, T.R. (1997):** Peptide bond formation by in vitro selected ribozymes. *Nature* 390: 96–100

#### Korrespondenzadressen:

**Prof. Dr. Marina V. Rodnina**  
Institut für Physikalische Biochemie  
Universität Witten/Herdecke  
D-58448 Witten  
Tel.: 02302-669-205; Fax: -117  
rodnina@uni-wh.de

**Prof. Dr. Wolfgang Wintermeyer**  
Institut für Molekularbiologie  
Universität Witten/Herdecke  
D-58448 Witten  
Tel.: 02302-669-140; Fax: -117  
winterme@uni-wh.de



Marina V. Rodnina

Geboren 1960; Biologiestudium in Kiew, Ukraine; Promotion 1989; Humboldt-Stipendium 1990–92; Habilitation 1998; Professur 1998–2000; Lehrstuhl Physikalische Biochemie, Universität Witten/Herdecke, seit 2000.



Wolfgang Wintermeyer

Geboren 1942; Chemiestudium in München; Promotion 1972; Habilitation 1979; Heisenberg-Stipendium der DFG 1982–87; Lehrstuhl Molekularbiologie, Universität Witten/Herdecke, seit 1987.