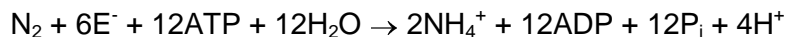


1 Versuchsgruppe 7 B: Aminosäuresynthese und DNA

1.1 Fixierung des Luftstickstoffes

Bei der Biosynthese der Aminosäuren muß man zuerst den Einbau von Stickstoff in die Pflanze betrachten. Stickstoff tritt typischerweise in reduzierter Form in die Pflanze ZB. als NH_4^+ ein (Der Vorgang der Nitratreduktion wird in Versuchsgruppe 6 ausführlich behandelt). Die dreifach Bindung des Stickstoffs ist sehr stabil (930 kJ/mol). Industriell wird NH_3 über das Haber-Born Verfahren gewonnen.

In Pflanzen macht dies der Nitrogenasekomplex. Der Komplex besteht aus zwei Untereinheiten, dem Nitrogenase- und dem Reduktase Komplex beides sind Fe-S-Proteine. Die Gleichung der von der Nitrogenase katalysierten Reaktion lautet :



Als erstes überträgt reduziertes Ferredoxin Elektronen auf die Reduktase Komponente. Dann lagert sich ATP an das Komplex an und verringert das Redox-Potential durch Konformationsänderung, dabei wird es zu ADP hydrolysiert. Diese Steigerung der Reduktionskraft ermöglicht der Reduktase Elektronen an die Nitrogenase abzugeben. Hier wird an dem aktiven Zentrum, das ein Molybdän-Eisen Komplex ist, N_2 zu NH_4^+ reduziert.

1.2 Einbau des NH_4^+

Der Einbau des entstandenen Ammoniums erfolgt über Glutamat und Glutamin. Die Aminogruppe der meisten Aminosäuren kommt über Transaminierung der Aminosäuregruppe des Glutamats. Glutamin kann auch sein N zur Biosynthese von vielen Verbindungen geben.

1.2.1 Glutamat-Dehydrogenase

Das einfachste Modell der Einbindung von NH_4^+ in autotrophe Organismen geht über eine Reaktion die von dem Enzym Glutamatdehydrogenase katalysiert wird. In einer reversiblen Reaktion wird NH_4^+ an α -Oxogluterat (= α -Ketogluterat) unter Oxidation von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ angelagert. Es entstehen dabei NADP, Wasser und L-Glutamat. Diese Reaktion ist irreversibel.

1.2.2 Glutamin-Synthetase/Glutamat-Synthase

Ein alternativer Weg des NH_4^+ Einbaus, der in Chloroplasten, Cytosol und Knöllchenbakterien stattfindet ist der Glutamin-Synthetase/Glutamat-Synthase Weg.

Das NH_4^+ wird unter ATP Verbrauch mittels dem Enzym Glutamin-Synthetase an das Glutamat angelagert, wobei das Amid Glutamin entsteht. Das Glutamin ist sozusagen ein „Aminogruppenspeicher“. Das amidartig gebundene NH_2 wird jetzt an α -Oxogluterat abgegeben, wobei aus dem α -Oxogluterat Glutamat produziert wird. Diese Reaktion wird von der Glutamat-Synthase katalysiert (früher wurde dieses Enzym GOGAT genannt), wobei reduziertes Ferredoxin oxidiert wird. Der Grund warum nicht gleich NH_4^+ an Oxogluterat gebunden wird, sondern erst über den Glutamat-Glutamin Zwischenschritt eingebaut wird ist, daß für die Glutamat-Synthase katalysierte Reaktion nur amid-gebundener Stickstoff benutzt werden kann.

Die Produkte der Reaktion eines Glutamin Moleküls sind also zwei Moleküle Glutamat, eines zur Wiederherstellung des Glutamins und eines zur weiteren Transaminierung.

Glutamat-Dehydrogenase und Glutamin-Synthetase kommen in allen Organismen vor. Beide kommen im Cytoplasma wie in Plastiden als Isoenzyme vor. Das Chloroplasten Enzym der Glutamat-Dehydrogenase kann statt Ferredoxin NADPH als Elektronendonator verwenden

Stellt NH_4^+ den limitierenden Faktor da (niedriges Angebot im Boden) wird hauptsächlich der zweite Weg bevorzugt, obwohl durch die Hydrolyse von ATP dieser Weg energetisch ungünstiger ist. Warum?

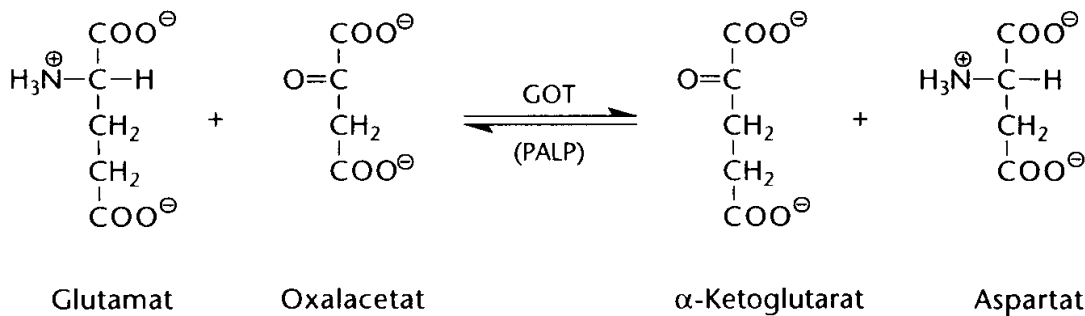
Die Antwort liegt im hohen K_m -Wert der Glutamat Dehydrogenase für NH_4^+ ; Dieses Enzym ist also nicht abgesättigt, wenn wenig NH_4^+ vorliegt. Dagegen besitzt die Glutamin-Synthetase eine sehr große Affinität zu NH_4^+ .

1.2.3 Transaminierungen

Die NH_2 -Gruppe des Glutamats kann nun an eine α -Ketosäure zB. Pyruvat oder Oxalacetat abgegeben werden. Dabei wird Glutamat zur α -Ketoglutarat, die α -Ketosäuren zu den entsprechenden Aminosäuren (Pyruvat zu Alanin und Oxalacetat zu Aspartat).

Diese reversible Anlagerung einer Aminogruppe an eine α -Ketosäure bezeichnet man als Transaminierung. Chemisch reagiert die α -Ketosäure mit Pyridoxaminphosphat zu einem Ketimin, daß im nächsten Schritt zu einer Schiff'schen Base, aus Aminosäure und Pyridoxalphosphat (=Aldimin) tautomerisiert. Der letzte Schritt ist die Transaminierung, wobei ein Lysin-Rest das Aldimin nucleophil angreift und die neugebildete Aminosäure und das wiederhergestellte Pyridoxamin freigesetzt werden. Bei dem Abbau der Aminosäuren läuft dieser Vorgang umgekehrt ab.

GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase



Das Pyridoxalphosphat (PALP oder PLP) ist ein Derivat des Pyridoxins (Vitamin B₆) und ist als Schiff'sche Base in vielen Reaktionen des Stickstoffzyklus im Körper vertreten.

1.3 Aminosäuresynthese

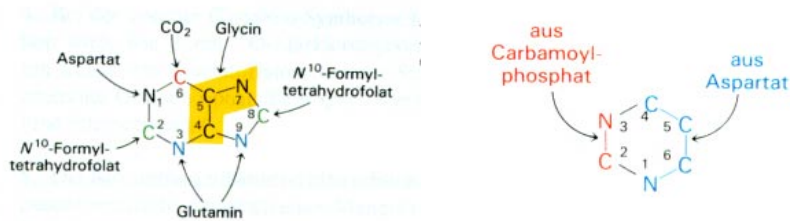
Aminosäuren werden auf ganz verschiedenen Wegen synthetisiert. Dennoch kann man allgemein sagen, daß die nichtessentiellen Aminosäuren auf einfachem Wege, die Essentiellen dagegen auf komplizierterem Wege, synthetisiert werden. Weiterhin haben alle Aminosäuren die Eigenschaft, daß ihre Kohlenstoffgerüste aus Zwischenprodukten der Glykolyse, des Pentosephosphatweges, oder des Citratzykluses stammen. Es gibt auch insgesamt nur 6 Biosynthesefamilien.

1.4 Genetik

1.4.1 Bausteine der DNA

Bausteine der DNA sind Nucleotidbasen, ein Zucker (Deoxyribose) und Phosphatreste. Diese bewirken den räumlichen Bau der DNA.

Die Stickstoffhaltigen Nucleotidbasen sind entweder Purin- (Adenin, Guanin) oder Pyrimidin (Thymin, Cytosin auch Uracil) Abkömmlinge.



• Abb. 1: Purin- und Pyrimidinsynthese

Die Purinabkömmlinge werden am Ribose-5'-Phosphat-Teil des Nucleotids synthetisiert aus mehreren Verbindungen.

Die Biosynthese der Pyrimidinbasen geht über Carbamoylphosphat und Aspartat (siehe auch Harnstoffzyklus), wobei hier zuerst der Pyrimidinring zusammengeknüpft wird, die Ribose (zusammen = Nucleosid) wird später zugefügt.

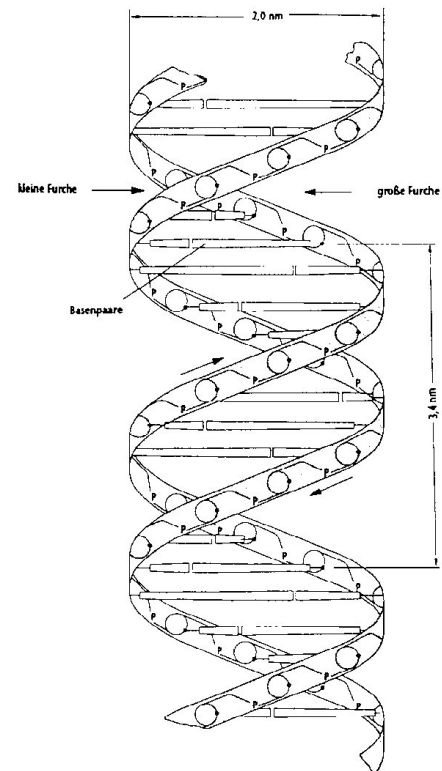
Als Nucleosid bezeichnet man den Zuckerrest der glycosidisch mit der Nucleotidbase verbunden ist. Ein Nucleotid beinhaltet zusätzlich noch ein Phosphorrest. Die DNA ist ein Polymer von Deoxyribonucleotid-Einheiten.

Die Nucleotidkette entsteht durch Verbindung der OH-Gruppe eines Zuckers über eine Phosphat-Verbindung zum nächsten Zuckerrest. Diese über die Phosphatgruppen verbundenen Zuckerreste bilden den invariablen Teil der DNA. Variabel ist nur die Sequenz der Nucleotidbasen A, T, C und G. Die DNA Nucleotid-Kette ist polar, es verbinden sich nämlich die OH-Gruppe an C5 eines Zuckerrestes über eine Phosphorbrücke mit der OH-Gruppe des nächsten Zuckerrestes an C3 verbunden. Deshalb existiert ein 5'-Ende und ein 3'-Ende der DNA.

Jeweils eine Pyrimidin- und eine Purinbase können sich zu einem Basenpaar über H⁺-Brückenbindung zusammensetzen. Dies bedingt die chemische Struktur der Basen, denn zwischen Cytosin und Guanin werden drei H⁺-Brücken, zwischen Adenin und Thymin nur zwei H⁺-Brücken ausgebildet. Dies sind die komplementären Basenpaare. Eine Verbindung aus Purin - Purin wäre zu klein, eine aus Pyrimidin - Pyrimidin zu groß. Die Sequenz des DNA-Stranges 5'-3' entspricht komplementär der des 3'-5' Stranges. Es ist also logisch das das Verhältniss von A:T und C:G 1:1 sein muß. Das Verhältniss von A,T zu C,G kann jedoch stark variieren. Speziell bei Bakterien die in heißen Quellen leben findet sich ein hoher Anteil C:G, da durch die 3 H⁺-Brücken die DNA nicht so schnell denaturiert. Die Spezifität der Basenpaarung ist das wichtigste strukturelle Merkmal der DNA.

1.4.1.1 DNA Struktur

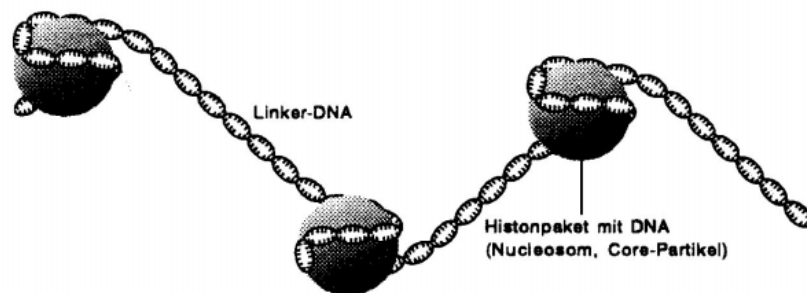
Die Doppelhelix ist das charakteristische Strukturmerkmal der DNA. Die helicalen Polynucleotidketten sind um eine gemeinsame Achse umeinander gewunden. Innen liegen die Basenpaare. Damit sind Wassermoleküle aus den Zwischenräumen ausgeschlossen. Der Durchmesser der Helix ist 20 Å. Benachbarte Basen liegen 3,4 Å auseinander. Die helicale Struktur wiederholt sich alle 10,5 Basenpaare (Abstand = 34 Å) und der Winkel zwischen Base und Helixachse ist 90°, die Basenpaare „sitzen“ praktisch auf der Helixachse. Durch diese Anordnung entstehen zwei Furchen, eine Große (major groove) und eine Kleine (minor groove). Diese Angaben gelten für die klassische Form der DNA, die sogenannte B-DNA. Sie ist in der Zelle oft sogenannten Topoisomerasen zu zu Supercoils verwunden.



• Abb. 2: B-DNA Strang

Die DNA von eukaryontischen Chromosomen liegt nicht nackt vor, sondern ist mit basischen Proteinen, den **Histonen**, (im Massenverhältnis 1:1) verpackt. Der Histon-DNA(Nucleoprotein-) Komplex wird als **Chromatin** bezeichnet. Die Aminosäuresequenz der fünf Histontypen (H1, H2A, H2B, H3, H4) ist im Laufe der Evolution außerordentlich konstant geblieben. Histone sind basische Proteine, mit einem hohen Anteil der basischen Aminosäuren **Arginin** und **Lysin**, die sich dadurch besonders gut an die negativ geladenen Phosphorsäurereste in der DNA anlagern können.

Die DNA ist mit den Histonen zu den sog. Nucleosomen organisiert, die elektronenmikroskopisch sichtbar sind. Die DNA ist (mit ca. 140 - 180 Basenpaaren) um ein **Histonokta-mer** (je zwei H2A, H2B, H3, H4) in 1 3/4 Windungen herumgewickelt.



• Abb. 3: Schema der Histone in Eukaryoten DNA

Diese kugelige Struktur wird als **Core-Partikel** bezeichnet, während ein ca. 20 bis 80 Basenpaare langes DNA-Stück als **Linker** zum nächsten Core-Partikel dient (Perlschnur). Das Histon H1 ist an der Bildung des Core-Partikels nicht beteiligt, es lagert sich von außen an die DNA und verstärkt so deren Verwindung.

Die Funktion der Histone ist zum einen in der engeren Verpackung der DNA zu sehen, zum anderen spielen die Histone möglicherweise eine Rolle bei der Regulation der Genaktivität (Transkription kann nur in histonfreien DNA-Abschnitten erfolgen).

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die mit der DNA assoziiert sind, faßt man unter dem Überbegriff der **Nicht-Histon-Proteine** zusammen. Es handelt sich dabei um kleine, saure Proteine (weshalb sie auch wegen ihrer schnellen Wandergeschwindigkeit in der Elektrophorese als HMG-Proteine (high mobility group) bezeichnet werden).

Die Nicht-Histon-Proteine sind eine inhomogene Gruppe, zu der u.a. Regulationsfaktoren, Gerüstproteine, DNA- und RNA-Polymerasen gehören.

Die kleinste Einheit der Vererbung auf der DNA wird als ein Gen bezeichnet. Es trägt die Information für die Sequenz eines vollständigen Proteins und ist zur identischen Reduplikation fähig. Die Gesamtheit der Gene ist das Genom.

Man darf aber nicht denken, daß die Form der B-DNA rigide und unveränderlich ist, denn unter bestimmten Bedingungen (Dehydrierung mit der damit verbundenen starken Versalzung) verändert sich die Form der DNA in die seltne A-DNA.

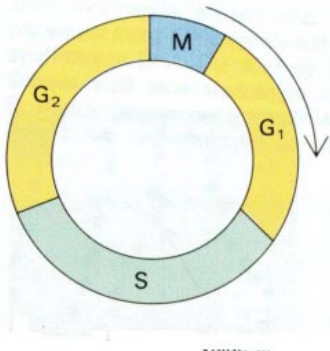
Wie die B-DNA ist diese rechtsdrehend, aber die Konformation des Zuckers verändert sich (von C2'-endo auf C3'-endo). Dadurch verkürzt sich der Abstand der Phosphorreste zueinander um 1 Å. Die DNA wird dadurch breiter und flacher, es sind nun 11 Basenpaare pro Windung vorhanden. Die Basenpaare sind nicht mehr rechtwinkelig zur Helixachse sondern neigen sich um 20°. Es entsteht dadurch ein zentraler Hohlzylinder von 0,6 Å Durchmesser.

Eine weitere bekannte DNA-Form ist die Z-DNA, die im Gegensatz zu den anderen linksdrehend ist. Die Polynucleotidkette folgt einem ausgesprochenem Zickzackmuster. Dies bedeutet, daß die Z-DNA nur eine einzige Furche besitzt. Diese Form ist zwar thermodynamisch instabil, lässt sich aber in Abschnitten aus CG-Paaren, wo das Cytosin am C5 Atom methyliert ist, nachweisen (Die hydrophobe Methylgruppe ist gegenüber dem Lösungsmittel besser geschützt als bei B-DNA).

1.4.1.2 DNA-Replikation

Die genetische Information einer Zelle muß an die Tochterzellen möglichst unverändert weitergegeben werden. Grundlage hierfür ist die DNA-Replikation.

In Prokaryoten, die eine ringförmige DNA besitzen, beginnt die Replikation an einer festgelegten Stelle (=ORI - origin of replication). Von hier wird neue DNA in beide Richtungen mit gleicher Geschwindigkeit gebildet bis sich die gesamte DNA verdoppelt hat.



Die DNA-Synthese findet in einer definierten Phase des Zellzyklus statt, der S-Phase.

M-Phase : Zellteilungsphase (Mitose)

G₁-Phase: Gap (=Pause)

S-Phase : Synthesephase

G₂-Phase: Gap (=Pause)

Zelltypen, die sich nicht selbst vermehren können, sondern nach der Teilung spezialisiert und ausdifferenziert sind, gehen von der G₂ nicht wieder in die M sondern in eine stabile G₀-Phase über.

• Abb. 4: Phasen der Zellteilung (Stryer 1994)

In Eukaryoten liegt das Molekül nicht ringförmig, sondern in einem langen Strang vor. Das längste DNA-Molekül von *Drosophila melanogaster* z.B. hat die Länge von 2,1 cm und enthält $6,2 \cdot 10^7$ Basenpaare. Man kann sich vorstellen, daß dies das Molekül sehr anfällig gegenüber mechanischer Schädigung macht. Als plastischen Vergleich kann man sich eine mehrere Kilometer lange Spaghetti vorstellen.

Würde dieses DNA-Molekül nur an einer Stelle repliziert werden, wie bei den Prokaryoten der Fall, so würde dies sehr lange dauern. Tatsächlich beginnt die Replikation an mehreren Stellen (**Replikons**). Auch hier schreitet sie in beide Richtungen fort, bis benachbarte Replikons ineinander übergehen, damit das gesamte Molekül verdoppelt ist.

Nach dieser generellen Einführung, wollen wir nun betrachten was bei der Replikation auf molekularer Ebene passiert. Die DNA liegt wie gesagt in der Zelle nicht als langer Strang vor, sondern ist stark aufgewunden (oder spiralisiert) zu einer sogenannten suprahelikalen Struktur.

Zuerst muß diese superhelikale Struktur entwunden werden. Dies geschieht durch eine **DNA-Gyrase** (Typ-II-**Topoisomerase**), die unter ATP Verbrauch negative Überwindungen in die DNA einbauen, somit die DNA „entwinden“.

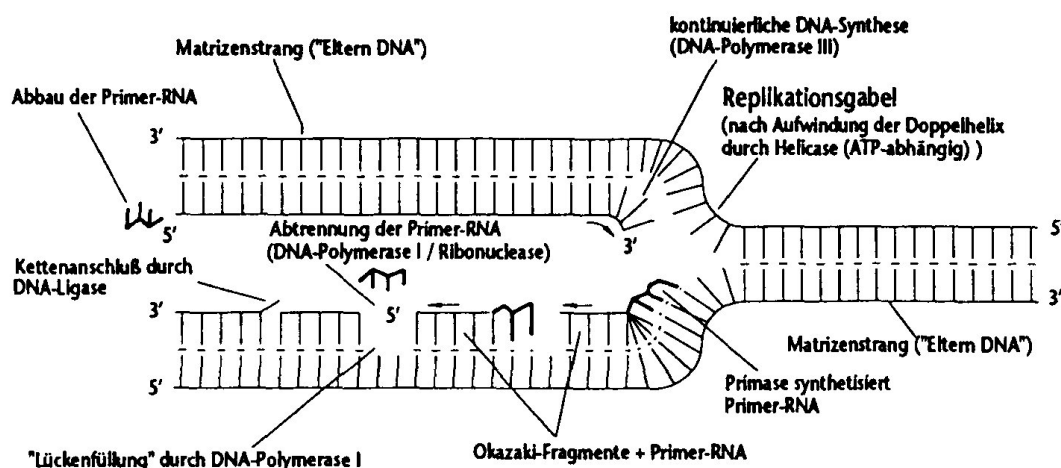
Danach muß der DNA Strang an der Replikationsgabel getrennt werden, ferner muß gewährleistet werden, daß sich die Einzelstränge nicht wieder zusammenlagern bevor sie repliziert werden. Die Entwindung der Doppelhelix und die Trennung der DNA-Stränge an der Replikationsgabel geschieht durch eine **Helicase** (=Rep-Protein; Stryer), die unter ATP Verbrauch die H⁺-Brücken spaltet¹. Die Einzelstränge werden dann von einem **SSB** (=single strand binding protein) umgeben, der verhindert, daß die Einzelstränge sich erneut paaren können. Durch den Aufbau der DNA sind nun ein 5' - 3' (=Leit-) und ein 3' - 5' (=Folge-) Strang entstanden. Ein kompliziertes Holoenzym, **die DNA-Polymerase-III** bindet nun dATP, dCTP, dGTP und dTTP (die frei in winzigen Mengen in der Zelle vorliegen) unter Diphosphatabspaltung am DNA-Leitstrang an. Dabei wird gleichzeitig eine Korrekturfunktion der ε-Untereinheit bewerkstelligt.

Bei dem 3' - 5' Folgestrang kann keine Polymerase-III arbeiten, da diese nur in 5' - 3' Richtung aktiv sind. In diesem Strang ist für den Beginn der Replikation ein kurzes Stück RNA als Primer erforderlich, diese wird durch eine RNA-Polymerase, die **Primase**, gebildet. Die Primer-Stücke werden von der DNA-Polymerase III zu **Okazaki-Fragmenten** von 1000 - 2000 Bp verlängert.

Dies könnte man mit einer Schleifenbildung des Folgestranges an der Replikationsgabel erklärt werden. Der RNA-Primer wird nun durch die **5'3'-Exonuclease** entfernt und die dadurch entstandenen Lücken durch die **DNA-Polymerase-I**² geschlossen. Aufeinander folgende Okazakifragmente werden durch ein weiteres Enzym, die **DNA-Ligase** über Phosphor-diesterbrücken verbunden. Die Fehlerkorrektur und -eliminierung ist so genau, daß eine Fehlerquote von 10⁻¹⁰ Bp bei der Replikation von *E. coli* existiert.

Diese ganze Art der Replikation nennt man semikonservativ.

• Abh. 5: Schema einer Replikationsgabel (Kreutzia 1994)



1.4.2 RNA

Die DNA ist der Träger des Erbgutes, sie ist zuständig für die Realisierung der genetischen Information, kann aber jedoch bei manchen Viren auch Genträger sein, was vermuten lässt, daß RNA evolutiv zuerst vorhanden war. Die Hauptaufgabe der RNA ist jedoch die Synthese von Proteinen.

RNA ist wie DNA aus einer Kette von Nucleotiden aufgebaut, der Zucker ist jedoch nicht Deoxyribose, sondern Ribose und statt Thymin ist das Pyrimidin Uracil vorhanden. Ein weiterer Unterschied ist die einfache hydrolytische Spaltung der RNA, die die geringe Lebensdauer der m-RNA bewirkt.

1.4.2.1 Transkription der m-RNA

Die Transkription ist die Überschreibung der Nucleotidsequenz der DNA Helix in ein komplementäres m-RNA Molekül. Hierfür braucht man sowohl ATP, CTP, GTP und UTP wie auch Mg²⁺. Die Kontrolle der Transkription ist sehr wichtig bei der regulierung der Genaktivität.

Die Transkription erfolgt durch eine RNA-Polymerase. Bakterien besitzen nur eine, eukaryotische Zellen besitzen 4 oder 5 verschiedene Typen, von denen jedes ein anderen RNA-Typ synthetisiert.

¹ nach Voet :Helicase II entwindet 5' → 3', Rep-Protein entwindet 3' → 5'; Voet, S. 961

² Poly I besitzt auch eine korrekturlesende und eine fehlerkorrigierende Funktion

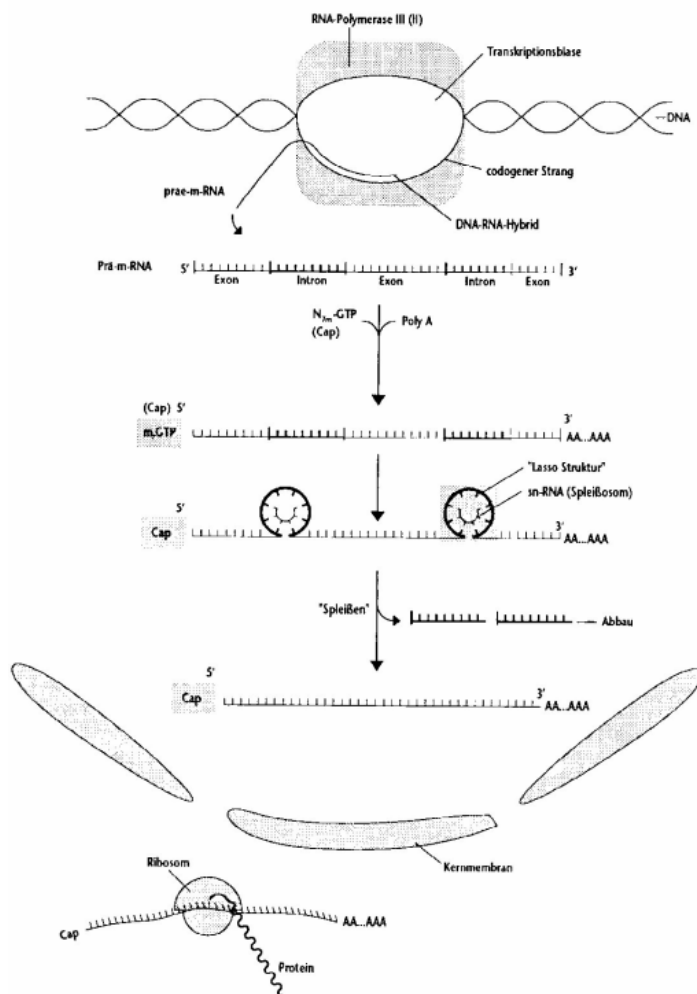
Am Anfang eines Gens (Abschnitt der für die Codierung eines Proteins zuständig ist) liegt eine Erkennungsstelle, der sogenannte Promotor. Bei -10 Bp vor dem Anfang der Translation liegt eine Pribnow-Box ($\approx 5'$ -TATAAT-3'), -35 Bp vor dem Anfang der Transkription liegt eine weitere Box ($\approx 5'$ -TTGACA-3'), beide gehören zum Promotor. Diese beiden Sequenzen sind sehr konservativ und werden consensus Sequenzen genannt.

Oberhalb (teilweise auch überlappend) des Promotors liegen die regulatorischen Sequenzen. Das hier codierte Protein (auch über RNA hergestellt) kann als Repressor oder Aktivator der Polymerase Aktivität wirken, indem er sich an das Promotor/Operator ansetzt und zB. die Bindung der polymerase verhindert.. Wenn mehrere Gene koordiniert reguliert werden, dh. wenn mehrere Strukturgene von

einem Regulatorgen und Promoter reguliert werden, spricht man von einem Operon.

Die RNA-Polymerase bindet nun schwach an die DNA und gleitet an ihr entlang, bis sie eine Promotor-Sequenz findet. Hier bleibt sie stabil gebunden. Die DNA wird nun zwischen -9 und +3 entwunden und ein Purin (meist ATP) an die korrespondierende Base angehaftet. Das Enzym kann den DNA-Strang nur in 3' - 5' Richtung ablesen. Terminiert wird die RNA-sSynthese durch ein inverted repeat Bereich, der sich zu einer „Terminator-Haarnadel“ ausbildet. außerdem kann ein Rho-Faktor die Transkription beenden.³

Bei Eukaryoten entsteht die fertige m-RNA durch Verarbeitung einer vorläufigen RNA durch entfernen von Introns (m-RNA-splicing), dies geschieht an einer Splice-Junction, wobei ein Exon immer mit GT, ein Intron immer mit AG endet, da durch Fehler beim Herausschneiden des Introns es zu einer Verschiebung des Leserasters kommen würde. Weiterhin wird eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe am 5' Ende und zahlreiche Adeninreste durch eine Poly A-Polymerase hinzugefügt. Lediglich m-RNA's die Proteine für Histone codieren besitzen keinen Poly A-Terminus.

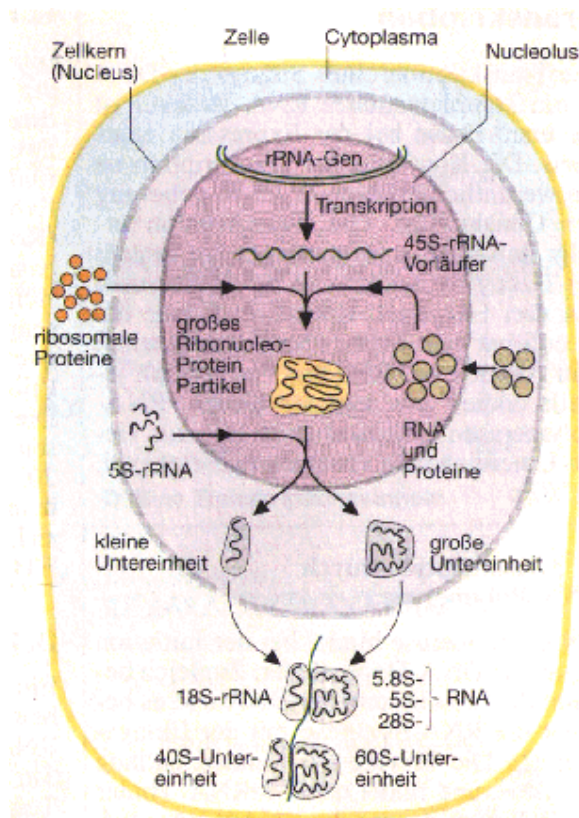


• Abb. 6: Schema der Transkription (Kreutzig 1994)

1.4.2.2 Translation

Transkription und Verarbeitung des primären Transkripts (RNA-Splicing) findet im Zellkern statt (bei Eukaryoten). Zur Stabilisierung ist die RNA im Zellkern an bestimmte Proteine gebunden. Die fertige m-RNA wird dann aus dem Zellkern ausgeschleust und dient im Cytoplasma bei der Translation als Vorlage für die Bildung eines Polypeptids. Das Polypeptid und das durch Faltung fertige Protein wird an den Ribosomen gebildet.

³ Siehe Voet, S 868

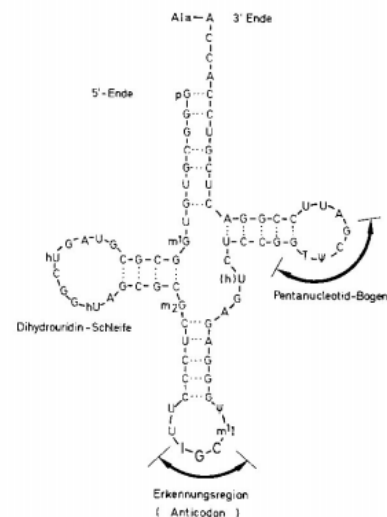


• Abb. 7: Nucleolus und Synthese von Ribosomen

Wo kommen nun die Ribosomen her ?

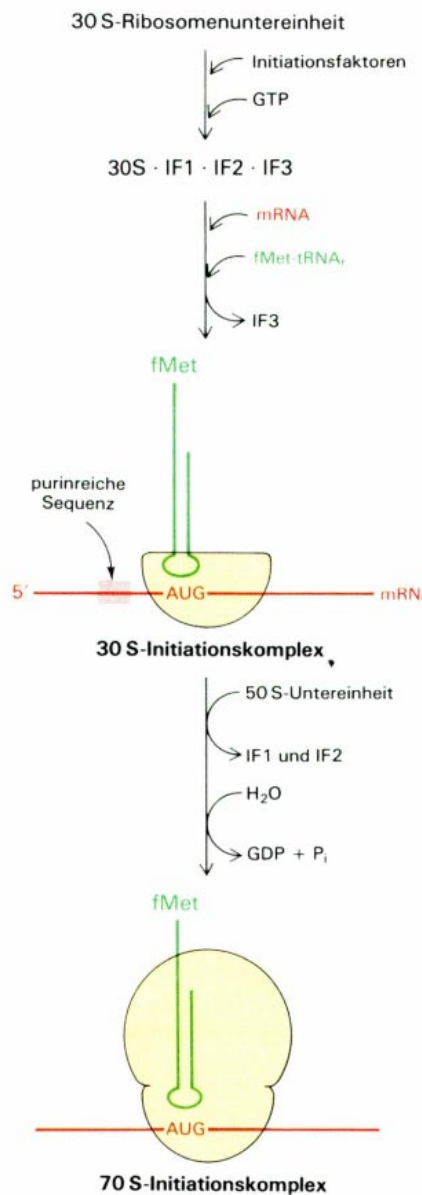
Ribosomen werden im Nucleolus gebildet, eine bestimmte Region im Zellkern. Die Bildung der zahlreichen Untereinheiten eines Ribosoms erfolgt durch die Transkription eines 45S-rRNA-Vorläufermoleküls. Danach wird ein großes Ribonucleo-Protein-Partikel aus ribosomalen Proteinen des Cytoplasmas und RNA Proteine des Nucleus und Nucleolus **spontan** gebildet. Ribosomale Untereinheiten sind also selbstassemblierend. Die rRNA Gene liegen in Gruppen auf bestimmten chromosomalen Abschnitten beieinander, lediglich die 5S-rRNA wird von einem Gen in einer anderen chromosomalen Region gebildet⁴. Durch Verbindung mit weiteren proteinen entsteht das aus einer 40S- und einer 60S-Untereinheit bestehende 80S-Ribosom (S-Werte sind nicht additiv). Ein Ribosom hat 2 tRNA Bindungsstellen auf der großen Untereinheit und eine mRNA Bindungsstelle auf der kleinen Untereinheit.

Die Translation geschieht durch Zwischenschaltung einer weiteren Klasse von RNA, die tRNA. Diese besitzen zwei funktionelle Merkmale, ein Anticodon, der komplementär zum Codon der m-RNA (es gibt 60 verschiedene Codons, also auch 60 verschiedene tRNAs) ist, und eine Stelle an der eine spezifische Aminosäure gebunden wird (da es nur 20 Aminosäuren aber 60 tRNAs gibt, gibt es synonyme tRNA Arten). Das 3' Ende wird durch ein Enzym, Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit der Aminosäure beladen, und das resultierende Molekül wird dann aminoacyl-tRNA genannt. Eine weitere Besonderheit, ist daß in tRNA auch modifizierte Nucleoside, wie Inosin oder Lysidin vorhanden sind.



⁴ dies gilt für H.sapiens, wo fast alle anderen Gruppen im kurzen Arm der akrozentrischen Chromosomen liegen.

• Abb. 8: Kleeblattstruktur der t-RNA (Richter 1988)



Initiation:

Die Translation wird durch die Bildung eines aus mRNA, Ribosom und tRNA bestehenden Initiationskomplexes eingeleitet. Dies erfordert auch die Teilnahme von Protein-Initiationsfaktoren. (Bei E.coli sind 3 bekannt IF1, IF2, IF3 ; in Eukaryoten gibt es >20). Zuerst bindet sich ein Initiationsfaktor (IF-3; aber auch IF-1, das eventuell die IF-3 Bindung fördert) an die kleine Untereinheit des Ribosoms, wobei dieses noch mit der größeren Untereinheit verbunden ist. Durch diese Bindung erfolgt die Dissoziation der zwei Untereinheiten in ein größeres und ein kleineres (Bei Prokaryoten in 30S und 50S, bei Eukaryoten in 40S und 60S). Nun binden sich ein Komplex von IF-2, GTP und Methionin-tRNA an die kleine Untereinheit⁵. Schließlich verbinden sich in einem Schritt, dem die Ablösung von IF-3 vorausgeht, die große Untereinheit mit dem Initiationskomplex der kleinen Untereinheit, wobei das gebundene GTP zu GDP + P hydrolysiert. bei dieser irreversiblen reaktion wird die Konfirmation der kleinen Untereinheit verändert und IF-1 und IF-2 zur Teilnahme an neuen Initiationsreaktionen freigesetzt.

• Abb. 9: Initiation der Proteinsynthese (Stryer 1994)

Verlängerung:

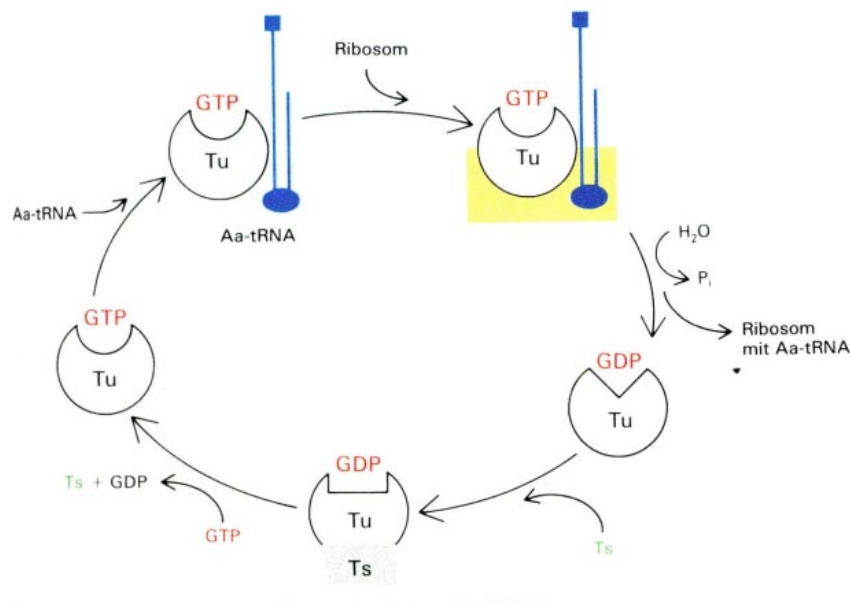
1. Die Aminoacyl-tRNA bildet ein Komplex mit einem Protein, dem Elongationsfaktor (EF-Tu bei Prokaryoten, eEF-1 bei Eukaryoten), und einem GTP Molekül. Der dabei entstehende Komplex bindet an das Ribosom. Die Aminoacyl-tRNA wird an die ribosomale A-Bindungsstelle gebunden, wobei GTP zu GDP + P hydrolysiert wird. Der EF*GDP Komplex wird dabei freigesetzt und durch Verdrängung des GDP durch ein weiteren EF (EF-Ts bei Prokaryoten, eine weitere Untereinheit eEF-1 bei

⁵ bei Prokar ist das Met-tRNA formyliert, bei Eukar. nennt man den Initiations Faktor: eIF-2

Eukaryoten), entsteht ein EF*EF Komplex. Das EF-Ts wird nun wiederum von einem GTP Molekül verdrängt, wobei der ursprüngliche EF*GTP Komplex wiederhergestellt ist.

2. Die Peptidbindung wird während der zweiten Stufe des Zyklus gebildet. Die Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA an der A-Bindungsstelle substituiert nucleophil die tRNA an der P-Bindungsstelle, wobei das wachsende Polypeptid auf die tRNA der A-Bindungsstelle übertragen wird. Dies wird vom Enzym Peptidyl - Transferase katalysiert. Die wachsende Polypeptidkette wird somit um eine Aminosäure verlängert. Eine tRNA mit +1 Aminosäuren befindet sich nun am A-ort, eine „leere“ tRNA am P-Ort.

3. In der letzten Stufe des Elongationscyclus wird die nun unbeladene tRNA der P-Bindungsstelle zur Austrittsstelle überführt und freigesetzt. Ein Enzymkomplex (EF-G Prokaryoten, eEF-2 Eukaryoten) mit einem GTP verbunden bewirkt die Wanderung des Ribosoms um 3Bp am mRNA Faden entlang richtung 3' Ende. In einem als Translokation bezeichnetem Prozeß wird die mit +1 Aminosäure beladene tRNA von der A- zur P-Bindungsstelle befördert. Dabei wird das GTP zu GDP hydrolysiert und EF-G bzw eEF-2 verlässt das Ribosom. Der Ursprungszustand ist wieder hergestellt.



• Abb. 10: Der Reaktionszyklus des Elongationsfaktors Tu (Stryer 1994)

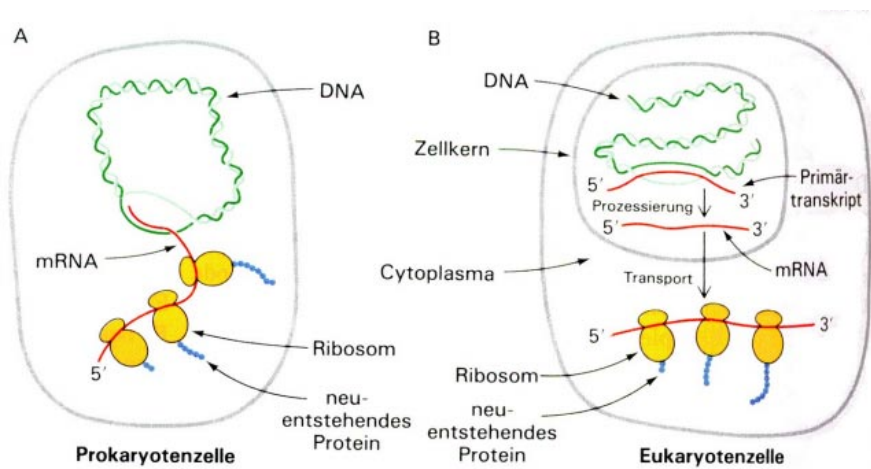
Der Translationsvorgang wird durch die meisten Antibiotika blockiert.

Termination:

Die Bindung eines Release Faktors (RF-1, RF-2 prokaryoten, eRF Eukaryoten) an eines der 3 Stop-Codons (UAG, UAA, UGA) bewirkt den Zerfall des Ribosoms in die beiden Untereinheiten. Die mRNA und die Polypeptidkette lösen sich.

1.4.3 Unterschied Pro- und Eukaryotischer Gene

Prokaryoten	Eukaryoten
Alle RNA Typen von 1. RNA Polymerase	3 verschiedene RNA Polymerasen für die RNA Klassen
mRNA ohne Anhänge	mRNA mit Cap und Poly-A-Schwanz
mRNA bereits bei der Transkription translatiert	mRNA wird nach Modifikation im Cytoplasma translatiert
Gene besitzen durchgehende nicht unterbrochne DNA-Sequenzen	Gene durch invertierende Sequenzen (Introns) unterbrochen
mRNA oft polycistronisch (mehrere Proteine von einer mRNA)	mRNA monocistronisch



• Abb. 11: Vergleich der Biosynthese von AS bei Pro- und Eukaryoten (Stryer 1994)