

1. Die Entschlüsselung des Kodes

Die DNA trägt die Information für Proteine und Enzyme.

DNA besteht aus aneinandergereihten Nukleotiden,

Proteine aus aneinandergereihten Aminosäuren.

Die Umsetzung der genetischen Information auf DNA-Ebene erfolgt nicht direkt, sondern über den Umweg einer RNA.

Die Frage, die sich Ende der 50er Jahre stellte, war welche Aminosäure wird durch welche DNA-Sequenz kodiert. Dieser eigentliche Schritt der Entzifferung bedurfte einiger raffinierter Experimente, auch wenn das Problem auf den ersten Blick eigentlich einfach anmutete.

Experiment:

Man nimmt ein DNA-Fragment, dazu ein Zellextrakt mit den, für die Proteinbildung erforderlichen, wenn auch noch unbekanntem enzymatischen Aktivitäten und analysiere die gebildeten Eiweißmoleküle. Aus der Reihenfolge der Bausteine im Protein und der Reihenfolge der Bausteine im DNA hätte man dann auf die Instruktionen, auf den Kode, der dieser Information zur Übertragung zugrunde liegt, schließen können.

Leider fehlten in den 50er Jahren noch alle Voraussetzungen für diesen "einfachen" Versuch. Den "Kodeknackern" kam seinerzeit ein wichtiger Hinweis zu Hilfe, der sie auf die entscheidende Spur setzte. Schon lange war damals bekannt, dass es Viren gibt, die in ihrer Hülle nicht DNA, sondern RNA als Erbmaterial enthalten. Chemisch ist RNA der DNA auf das Engste verwandt. Um die RNA besser analysieren zu können, kam man auf RNA-Viren. Als Prototyp der RNA-Viren galt damals das Tabakmosaikvirus (TMV).

Der amerikanische Biochemiker und spätere Nobelpreisträger **Wendell Stanley hat im Jahre 1935** das TMV bereits kristallisiert, und damit eine weitverbreitete Vorstellung widerlegt, dass nur anorganische Moleküle, wie etwa das Kochsalz, Kristalle bilden kann - auch Proteine bilden Kristalle. Das TMV-Partikel besteht nicht nur aus RNA, sondern auch aus Proteinen. Man muß sich das Virus als eine Art Spiralfeder vorstellen, die Feder selbst wäre das spiralig aufgewickelte 6400 Bausteine lange RNA-Molekül,

Abb. Modell von TMV

6.390 es RNA

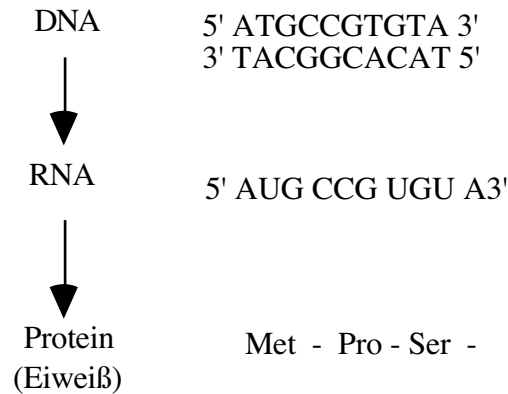
6 Gene

2130 identische Hüllproteine (á 158 AS)

das wiederum von 2130 identischen Proteinmolekülen umgeben ist. Jedes dieser umhüllenden Moleküle besteht aus einer Kette von 158 Aminosäuren, deren Synthese von eben dem erwähnten RNA-Molekül kodiert wird.

Wenn nun also dieses Virus offensichtlich zu einer durch RNA instruierten Proteinsynthese in der Lage ist, dann ist vielleicht auch in lebenden Zellen nicht DNA, sondern RNA der unmittelbare Vorläufer der Proteine.

Vor dem Hintergrund einer alten Beobachtung einiger Zellbiologen in den 30er Jahren, wonach es im Innern von Zellen eine kurzlebige Form von RNA-Molekülen gibt, formulierte daraufhin **Francis Crick im Jahre 1958** die Hypothese, dass der genetische Informationsfluß in folgender Reihenfolge fließt:



Der Zwischenwirt als Informationsträger zwischen DNA und Protein wurde Boten- oder messenger-RNA (mRNA) genannt. Dieses Konzept des Informationsflusses wurde als

"zentrales Dogma der Molekularbiologie"

bezeichnet.

Man muß sich fragen, warum die Zelle den Umweg über RNA geht? Zweifellos erhöht sich so die Flexibilität ihrer Arbeitsweise. Das Erbmaterial liegt stabil im Zellkern, RNA-Kopien werden davon nach Bedarf hergestellt, aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert, wo dann die Proteinbiosynthese stattfindet. Die DNA ruht in der Zelle also gleichsam als "Sphinx" als "üppig lächelnde Majestät der Dauer" wie **Thomas Mann** sie einst genannt hat, während die RNA sich als das Arbeitstier abrackert, das letztlich den individuellen Charakter der einzelnen Zelle ausmacht. **Manfred Eigen** hat die RNA als "geschwätzige Schwester" der DNA bezeichnet.

Auf der Grundlage dieser Erkenntnis konnte der genetische Kode geknackt werden, wobei zwei Ansätze zum Tragen kamen.

A) Mutagenese mit salpetriger Säure:

In einem Fall machte man sich zunutze, dass bestimmte Chemikalien oder Mutagene Bausteine der RNA verändern, z.B. von A nach G oder von C nach U. Wenn diese Austausche Veränderungen in der Sequenz des zugehörigen Proteins zur Folge haben, wenn man diese bestimmen könnte, dann müßte man aus den, von bestimmten Chemikalien erzeugten Veränderungen in der Proteinsequenz auf die RNA-Sequenz und damit auf den Kode zurückschließen können.

Das Mutagen, **salpetrige Säure** bewirkt einen sehr selektiven Austausch

von C nach U und nicht etwa von U nach C (also eine Transition).

CCU (Pro)	— — —>	UCU (Ser)
	— — —>	CUU (Leu)
	— — —>	UUU (Phe)

Solche Stellen sind in der Tat gefunden worden, wobei dies natürlich die Bestimmung der Reihenfolge der Aminosäuren des TMV-Hüllproteins in den jeweiligen Mutanten voraussetzte.

Die Sequenzbestimmung von Proteinen war, anders als die von DNA, damals schon technisch gelöst, nachdem der britische Biochemiker **Fred Sanger** bereits 1954 die Sequenz des Insulin aufgeklärt hatte. Man mußte also nur genügend viele TMV-Partikel nehmen, diese mit bestimmten Mutagenen behandeln, und die Reihenfolge der Aminosäuren in Hüllproteinen des Virus bestimmen. Auf das Mutageneseverfahren setzte vor allem die Tübinger Gruppe um **Ernst Freese** und **Heinz Günther Wittmann**.

Leider erwies es sich dieser Ansatz als extrem arbeitsintensiv und endlich auch nur begrenzt tauglich, da eben nur die allerwenigsten Mutagene so eindeutige Reaktionen mit der RNA eingehen wie die salpetrige Säure und dementsprechend klare Schlußfolgerungen erlauben.

B) synthetische RNA-Moleküle:

Der Durchbruch kam letztlich von anderer Seite, über die Verwendung künstlicher synthetischer RNA-Moleküle. **1955 hatten Severo Ochoa** und **Marianne Grunberg-Manago** in New York ein Enzym entdeckt, das zur Synthese von langen RNA-Strängen aus deren niedermolekularen Vorläufern in der Lage ist. Es baut die Vorläufer U, A, C und G in diejenigen Längenverhältnisse in RNA-Ketten ein, in denen sie zu Beginn der Reaktion vorliegen. Bietet man also dem Enzym nur U als Baustein an, dann baut es ein langes RNA-Molekül aus lauter U-Resten, bei 50% U und G, wird ein RNA-Polymer gebildet in dem die Bausteine U und G in diesem Mengenverhältnis aufweisen. Es handelte sich bei dem Enzym um die

Polynucleotid-Phosphorylase.

Es war übrigens gar nicht das Enzym, wonach die Forscher gesucht hatten. Eigentlich waren sie nämlich auf der Suche nach einer echten RNA-Polymerase, also eine matrizengesteuerten DNA-abhängigen RNA-Polymerase, die die Bausteine exakt entsprechend der Reihenfolge der Basen in der DNA kopiert und nicht einfach nach dem Mengenverhältnis der angegebenen Bausteine. Derartige Enzyme wurden erst sehr viel später entdeckt. Die Entdeckung **Ochoas** führte zu einem Nobelpreis, stimulierte gleichzeitig die Arbeiten der Kollegen **Nirenberg** und **Matthaei**.

Diese haben zu Anfang der 60er Jahre diese **Polynucleotid-Phosphorylase** benutzt, um RNA-Moleküle zu synthetisieren, die einheitlich aus lauter U-Resten aufgebaut waren. Als sie diese dann in einen Zellextrakt einsetzten, der zur Proteinsynthese befähigt war, gab es ein sensationelles Resultat: Das Reaktionsprodukt stellte sich als ebenso einheitlich heraus wie das Ausgangsmaterial, es bestand aus lauter aneinanderhängenden Phenylalaninresten.

5' UUUUUUUUUU 3'



Phe-Phe-Phe-Phe-

Nirenberg hat dieses Ergebnis auf einem legendären Genetikerkongreß in Moskau 1961 vorgetragen. Er hatte damals nicht einmal einen Hauptvortrag angemeldet. Auf Bitten von **James Watson** mußte er seinen Vortrag vor diesem Plenum noch einmal wiederholen, um auf diese Weise der Bedeutung seiner Ergebnisse Rechnung zu tragen.

Diese Tagung in Moskau war aus anderer Sicht ebenfalls legendär, auf diesem Kongreß wurde nämlich der Einfluß von **Trofim Lysenko** und seiner Schule beendet. Lysenko und seine Schule haben jahrzehntelang in der Sowjetunion mit Wissen und Rückhalt **Stalins** das falsche Dogma der Vererbung erworbener Eigenschaften gepriesen und sie hatten das Leben vieler russischen Genetiker, nachdem man sie in den Gulag geschickt hatte, auf dem Gewissen. Dadurch wurde auch die Landwirtschaft, die hier wie anderswo immer von guter Genetik begleitet sein muß, so weit zurück geworfen, dass sie sich bis heute nicht von dieser Irrlehre erholt hat. Es ist ein trauriges Beispiel, aber leider nicht das einzige in der Geschichte der Wissenschaft, das zeigt wozu Ideologie führen kann. Aufgrund dieses Beispiels, und auf Grund unserer Erfahrungen im 3. Reich, haben die Väter des GG der Freiheit der Forschung in Art. 3 GG Verfassungsrang eingeräumt.

Mit der Aufklärung des Kodons UUU für die Aminosäure Phenylalanin war der Weg geebnet, um den genetischen Kode gänzlich aufzuklären.

Als Mitte der 60-iger Jahre das "Zentrale Dogma der Molekularbiologie" von den wenigsten Wissenschaftlern angezweifelt wurde, glaubte man,

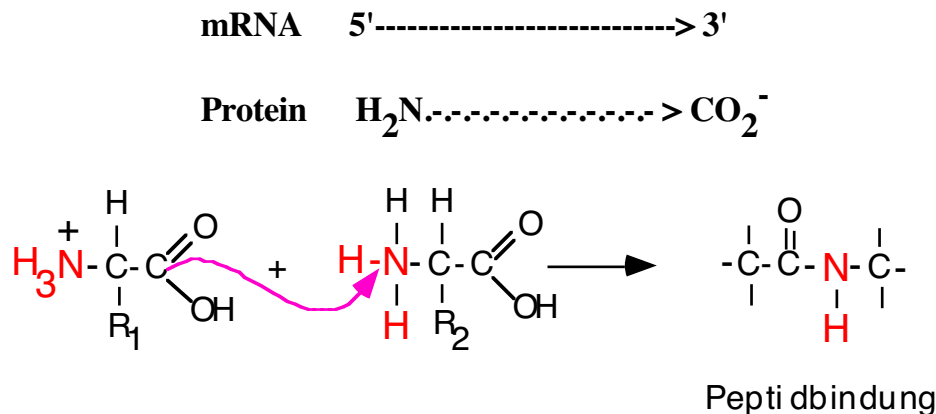
- a) dass alle RNA-Moleküle Matrizen RNAs wären
- b) dass, wenn die generelle Struktur der RNA aufgeklärt sei, man durch bloßes Hinsehen schon sagen könne, wie die Umsetzung in AS und ihre sequenzielle Anordnung erfolgt.

Heute wissen wir, dass diese Ansicht naiv war, und dass die Translation ein viel komplexerer Vorgang ist als der der DNA-Replikation oder Transkription.

Nicht jedes RNA-Molekül dient als Matrizen-RNA, die auch als messenger (boten-RNA) bezeichnet wird. Der Ausdruck rührt daher, dass in Eukaryoten die mRNA innerhalb des Zellkernes synthetisiert wird und dann erst in das Cytoplasma ausgeschleust wird. Da Procaryoten keinen Zellkern besitzen ist man dazu übergegangen, sie auch als (Matrizen-) mRNA zu bezeichnen.

Neben der m-RNA, gibt es noch die rRNA und die t-RNA die nicht als Matrize fungieren aber eine entscheidende Rolle bei der Proteinsynthese spielen.

Abb. 1: mRNA und Peptidbindung und Co-linearität



Die AS selbst haben keine spez. Affinität für die mRNA;
 Es ist daher unmöglich, dass sich diese AS passiv entlang der mRNA Sequenz in einer spezifischen und exakten Ordnung aneinanderreihen.
 Die AS werden chemisch modifiziert und an einen Adaptor (t-RNA) angeheftet; es ist schließlich die t-RNA die mit der m-RNA spezifisch in Wechselwirkung tritt. Zu keiner Zeit tritt der AS-Seitenrest in Kontakt mit der Matrize.

Der genetische Code:

- die RNA setzt sich aus 4 verschiedenen Basen (A,G,C,U) zusammen, welche in entsprechender Reihenfolge und Zusammensetzung die 20 verschiedenen Aminosäuren determinieren müssen.
- Wieviele Nucleotide muß eine Informationseinheit (Code) beinhalten, damit alle 20 Aminosäuren determiniert sind.

CODE (4 ⁿ)				
1-	2-	3-	4-	Buchstabenalphabet
4	8	64	256	AS-Determination
20 biogene AS				

Der genet. Code ist also ein **3-Buchstaben-Code**. Man könnte annehmen, dass die 64 Kombinationsmöglichkeiten für die Festlegung von nur 20 AS eine Art "Überfluß des Reichtums" darstellt und dass die Natur nur 20 Kombinationsmöglichkeiten verwendet. Das ist aber nicht der Fall. Bis auf 3 Codons, die Translationsstoppsignale darstellen, **codiert jedes einzelne der übrigen 61 Codons für je eine Aminosäure**.

Tabelle: Genetischer Code:

Base No1	Base No2				Base No3
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Term	Term	A
	Leu	Ser	Term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

- 1 AS kann durch mehrere Codons determiniert werden (z.B. Leu durch 6 Codons);
- aus diesem Grund wird der genetische Code als **degeneriert** bezeichnet.

Welche Komponenten werden für die Translation benötigt?

1. mRNA
2. Ribosomen
3. rRNA
4. tRNA
5. AA-tRNA-Synthetasen
6. Aminosäuren
7. Faktoren: Init. Elong. Term.
8. ATP + GTP

Die Translation läßt sich in verschiedene Stufen unterteilen:

INITIATION → ELONGATION → TERMINATION

A) Initiation der Translation

1. Ribosomen-Bindungsstelle:

Bei der Transkription ist es auf DNA-Ebene die Promoterregion vor einem Gen, die das Erkennungs- und Transkriptionsstartsignal für die RNA-Polymerase darstellt. Bei der Translation liegt das Startsignal in der Nähe des 5'-Endes der mRNA; es handelt sich dabei um eine Sequenz die von der kleinen ribosomalen Untereinheit erkannt wird und an die diese bindet.

Abb.: Ribosomale Bindestelle (SD-Sequenz und Startcodon)

-In vitro Ribosomen Bindungsversuche haben ergeben, dass das Ribosom ca 30 Nct. auf der mRNA bedeckt;

Ribosomen-Bindestelle (RBS);

-charakteristische Sequenzen sind dabei:

- a) das Startcodon (AUG/ GUG od. UUG)
- b) die SD-Region

-die SD-Region liegt in der sog. "leader" Sequenz, eine Nuct.- Sequenz, die der eigentlichen kodierenden Region vorangeht und

-die jede mRNA besitzt;

- die Länge des "leaders" kann sehr unterschiedlich sein.

-Die **S-D (Shine & Dalgarno, 1975)** ist im idealfall durch

5'	-AGGAGGU-	mRNA
3'	<u>AU<u>UCCUCCA</u></u>	16 sRNA

charakterisiert;

-bei *E.c.* findet man jedoch meist nur einen Teil dieser Sequenz;

-Diese SD-Sequenz ist komplementär zum 3' -Ende der 16S rRNA;

-Bei der Bindung der 30 S-UE an die mRNA ist die SD-Region für die Erkennung des Translations-Startes und der Ausbildung eines Initiationskomplexes entscheidend.

-Je ausgeprägter die Komplementarität ist, desto öfter können die Ribosomen die Translation initiieren.

-Zwischen der SD-Sequenz und dem START-Codon liegen ca 6-8 Nct.

FBS

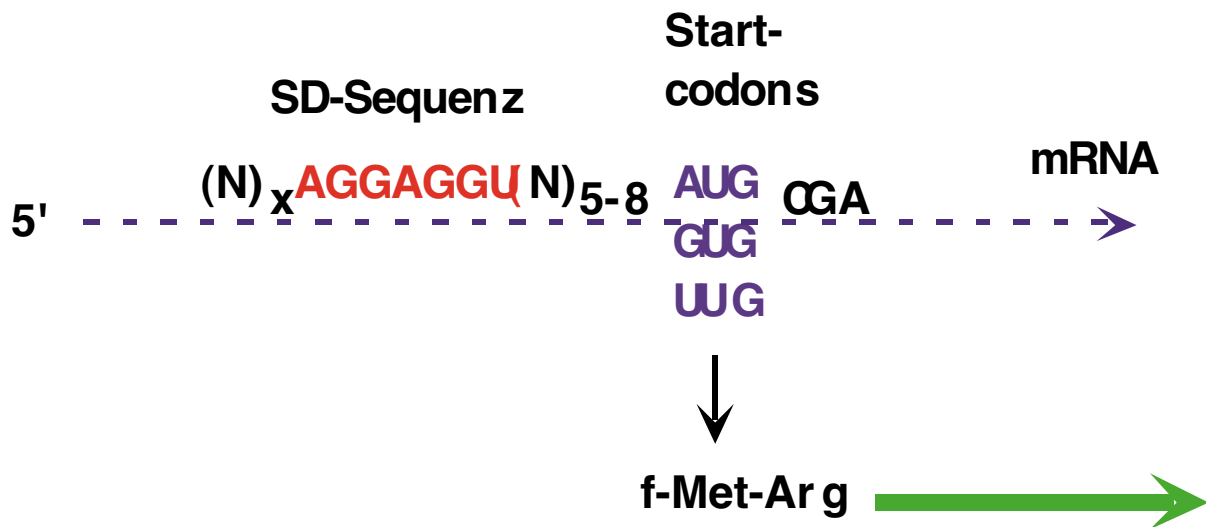


Abb.: SD-Sequenz

Abb.: Verschiedene RB-Stellen von E.c. Genen

Die Initiationsfaktoren IF 1 - 3

- mit der mRNA tritt zunächst nicht das ganze 70 S Ribosom in Wechselwirkung, sondern nur die 30 S UE;
- damit die 30 S UE aber mit der mRNA einen Initiations-Komplex eingehen sind 3 IF - Faktoren nötig:

Tabelle: IF-Faktoren

Faktor	MG (Kd)	Faktoren/Ribosom	GTP-Bindung	Funktion
IF1	9.0	0.15	-	Funktion ist nicht bewiesen könnte beim Recycling v. IF2,3 eine Rolle spielen bzw. deren Bindung unterstützen;
IF2	97.3	0.15	+	Bindung der Initiator t-RNA (f-Met-t-RNA); dirigiert dieses an Startcodon; bindet GTP das für die Ausbildung des I-Komplexes nötig ist;
IF3	23.0	0.15	-	1. Untereinheiten-

Trennung (Anti-Assoziationsfaktor od. Dissoziationsfaktor);

2. vermittelt Bindung von mRNA an 30S-UE; seine Bindung an 30S-UE ist für die Bindung der mRNA in *E.c.* unbedingt notwendig;

3. pro 30S-UE bindet nur 1 IF3; da es nur eine geringe Menge an IF3 in der Zelle gibt, bestimmt seine Konz. die Konz. der freien 30S-UE.

Mc Carthy et al. TIG 6: 78-85 (1990)

**Abb.: 5
Dissoziationsgleichgewicht der Ribosomen**

zu IF 2 und GTP:

- dieser Faktor bindet an die Initiator-tRNA (fMet-tRNA) und dirigiert diese fMet-tRNA an das Startcodon des 30S-mRNA Komplex;
- IF2 könnte auch direkt am 30S UE geb. sein u. von dort die Bindung der fMet-tRNA bewirken;
- er bindet auch GTP, das für die Ausbildung des Initiationskomplexes nötig ist.
- er besitzt eine ribosomen-abh. GTPase-Aktivität, die dazu dient, ein r-Protein zu aktivieren;
- die GTP-Hydrolyse erfolgt wahrscheinlich bei der Bindung der 50S UE zum 70S Initiationskomplex.
- Im Anschluß an GTP-Spaltung liegen P u. A-Stelle in der richtigen Position vor.

KOMPONENTEN DES 30 S - INITIATIONSKOMPLEXES

-
- | | |
|-------------------|----------------------|
| 1. 30 S UE | 4. IF 1-3 |
| 2. mRNA | 5. f-Met-tRNA |
| 3. GTP | |
-

- hat sich der 30S-I-Kompl. gebildet wird IF3 freigesetzt;
- dann kann die 50S-UE unter GTP-Hydrolyse und unter Freisetzung v. IF 1 u. 2 binden.

70 S Initiationskomplex

Abb.: Ausbildung des 70S Initiationskomplexes (Schema)

1. Elongation der Translation

- Ist der 70S Initiationskomplex gebildet, können die anderen tRNAs mit den entsprechenden Antikodons binden;

-Jede zur Codonsequenz komplementäre AA-tRNA (Ausnahme fMet- tRNA) kann an die A-Stelle binden;

Tabelle: Die 3 Elongationsfaktoren

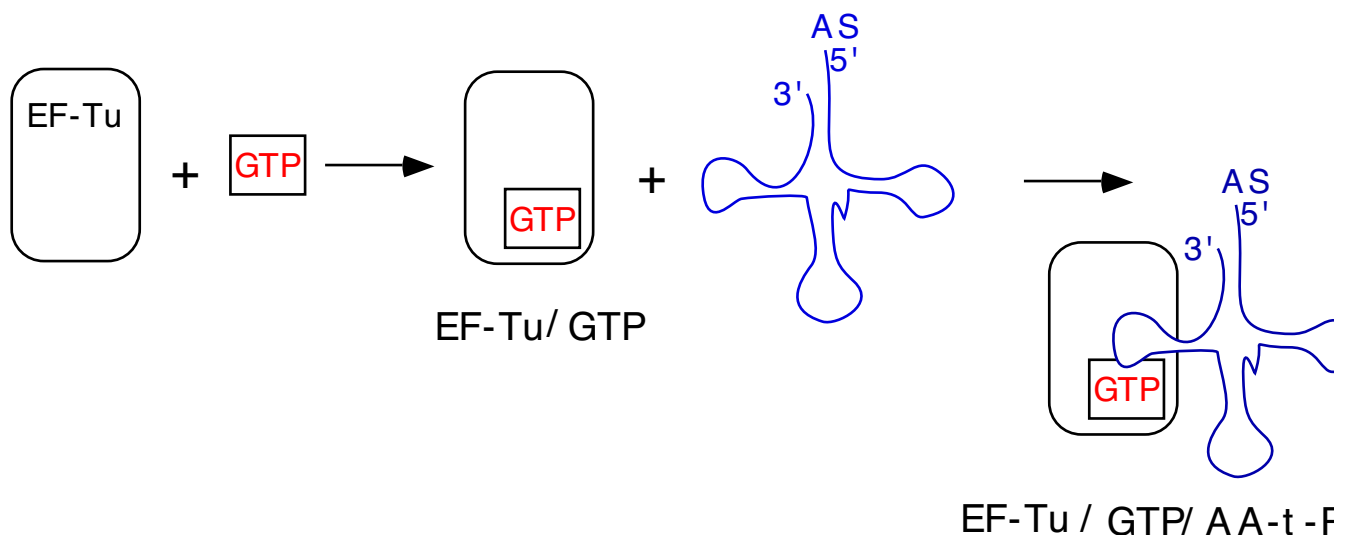
Faktor	MG (Kd)	Faktor/Ribosom	GTP- Bindung	Funktion
EF-Tu	45	10	+	Bindung von AA-tRNA an Ribosom;
EF-Ts	30	1	+	Regeneration von EF-Tu/GTP
EF-G 80	1		+	Translokation

Die Anwesenheit von GTP ist für die Bindung der AA-tRNA an die A-Bindungsstelle wichtig.

1. Elongationsfaktor EF-Tu: (temperature-unstable)

- Die Bindung der AA-tRNAs wird durch den EF-Tu vermittelt;
- Die aktive Form des Faktors hat ein GTP gebunden;
- Der Komplex EF-Tu/GTP bindet AA-tRNA → **tärnäerer Komplex**

EF-Tu - GTP - AA-tRNA



- bindet nur an die A-Bindungsstelle, wenn die P-Stelle schon durch PP-tRNA besetzt ist.
- Eine kritische Reaktion die sicherstellt, dass sich die PP-tRNA und AA-tRNA in der richtigen Position für die Peptidbindung befinden.

Hydrolyse von GTP:

- Nachdem eine AA-tRNA an die A-Stelle gebunden hat wird GTP hydrolysiert;
- Dann wird der binäre Komplex EF-Tu/GDP abgelöst;

2. EF-Ts: T-stabil

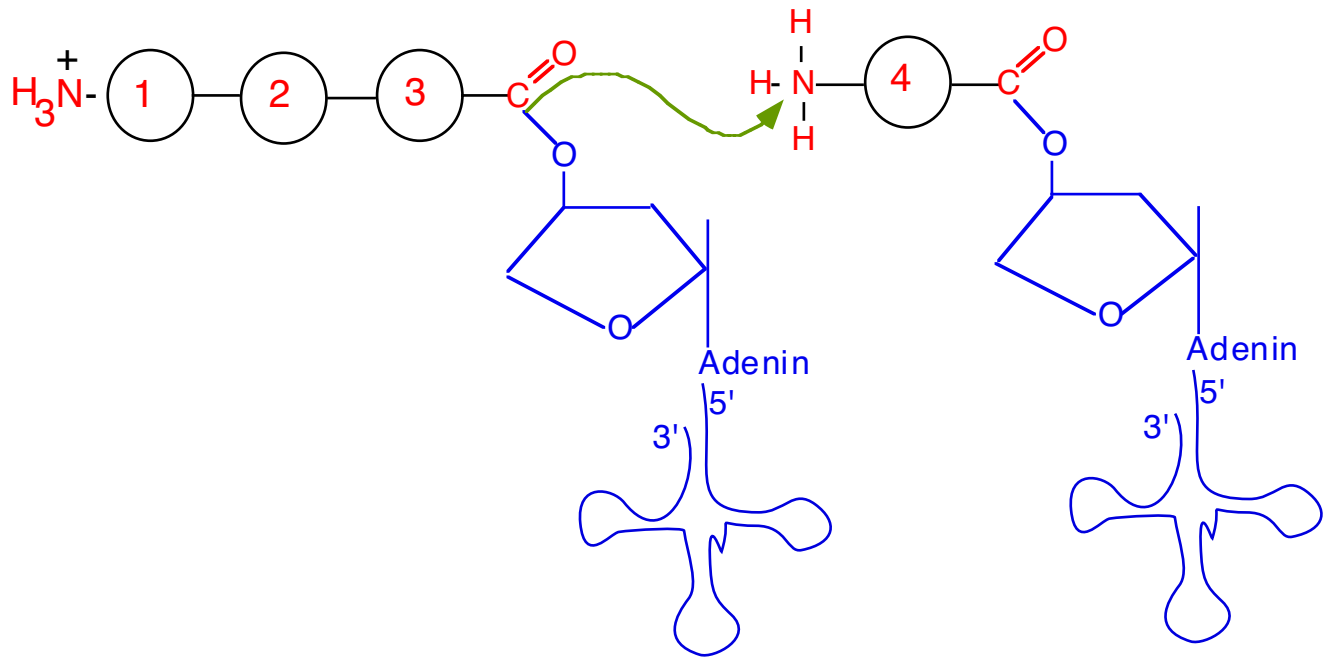
- dieser Faktor vermittelt die Regeneration des EF-Tu-GTP
 - a) Entfernung von GDP
 - b) Bindung an EF-Tu
 - c) Regeneration von EF-Tu-GTP
 - d) Bindung von GTP bewirkt Entfernung von EF-Ts

- EF-Tu/GTP kann wieder neue AA-tRNA binden;
- Während die Wechselwirkung zw. EF-Tu, GTP und EF-Ts reversibel ist, ist die Reaktion mit AA-tRNA irreversibel → dadurch wird die Reaktionsfolge in die Vorwärtsrichtung getrieben;

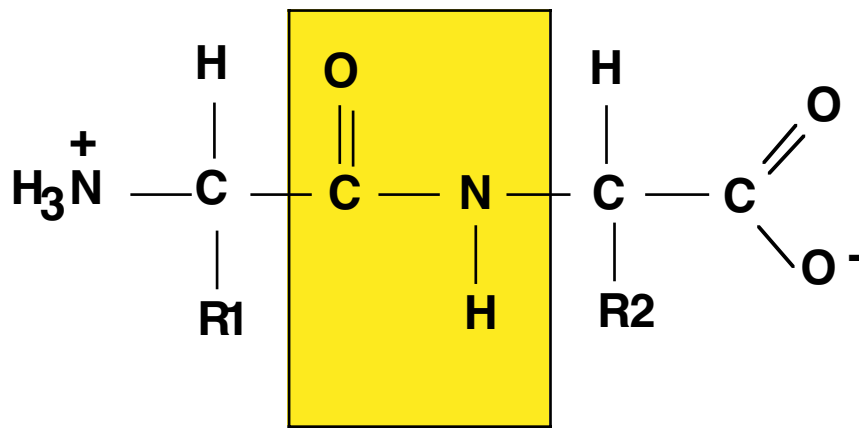
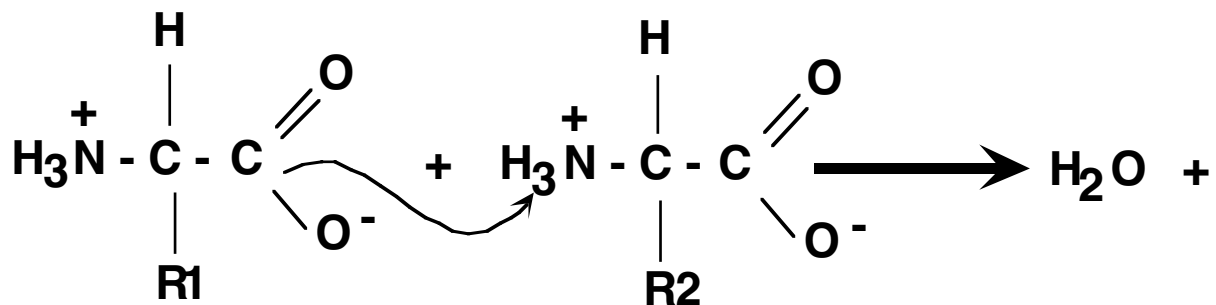
2. Die Peptidyltransferase

- bisher ist es nicht gelungen die Peptidyl-Transferase von der 50S UE zu dissoziieren und zu isolieren;
- am besten ist es als ein aktives Zentrum charakterisiert das die Peptidbindung katalysiert;
- Rekonstitutionsexperimente weisen auf eine Beteiligung von 6 L- Proteinen und der 23S rRNA hin;
- weitere 6 L-Proteine und die 5S-RNA spielen ebenfalls eine Rolle;
- Eine Beteiligung dieser Komponenten wurde durch die Wechselwirkung der AB **Chloramphenicol** und **Erythromycin** mit der 50S UE abgeleitet;
- da die AA-tRNAs aktivierte AS repräsentieren, sollte die Peptidyl-Transferase Reaktion spontan und ohne zusätzliche Energie erfolgen.

Abb.: 9 Peptidyltransferasereaktion



Die Aminosäureverknüpfung / Peptidbindung



3. Translokation der Translation

-Im Anschluß an die Peptidyl-Transferase-Reaktion trägt das Ribosom eine

- a) unbeladene tRNA an der P-Stelle und
- b) eine Peptidyl-tRNA an der A-Stelle.

-Bei der Translokation rückt das Ribosom um 3 Nucl. entlang der mRNA vor;

-in einer konzertierten Aktion wird durch die Translokation die unbeladene tRNA an der P-Stelle verdrängt - und gleichzeitig wird die P-tRNA an die P-Stelle plaziert;

-das Ribosom hat dann eine leere A-Stelle, die für die Aufnahme der nächsten AA-tRNA (mit entspr. Anticodon) bereit ist;

3. Elongations Faktor G: (GTP benötigender Faktor)

-der Bedarf eines zusätzlichen Faktors bei der Translokation wurde durch die Hemmwirkung des AB **PUROMYCIN** offenbar;

-Puromycin ist die **Imitation einer AA-tRNA**;

-es wird vom Ribosom so behandelt, als sei es eine ankommende AA-tRNA;

-die an der PP-tRNA hängende Polypeptidkette wird auf die $-\text{NH}_2$ -Gruppe des Puromycins übertragen.

- da Peptidyl-Puromycin nicht gespalten werden kann, kann die nächste AA-tRNA nicht übertragen werden;
- es wird vom Ribosom als Peptidyl-Puromycin abgelöst;
- > vorzeitige Termination der Proteinbiosynthese!!

Abb.: Puromycinwirkung

- Purom. ist letal;
- die Translokation ist nötig um Ribosomen empfindlich gegen Pur. zu machen.
- der Erwerb der Sensitivität erfordert bei in vitro Versuchen **GTP** und einen anderen Elongationsfaktor **EF-G**
- er bindet an das Ribosom zur Unterstützung der Translokation und wird abgelöst, wenn es zur GTP-Hydrolyse kommt.
- die GTP-Hydrolyse wird nicht durch den EF-G katalysiert; sie ist eine ribosomale Funktion;
- Ribosomen können nicht EF-Tu und EF-G gleichzeitig binden;
- daher läuft die Proteinsynthese in einem Zyklus ab, bei dem die Faktoren abwechselnd an das Ribosom gebunden und wieder von ihm abgelöst werden.
- So muß EF-Tu freigesetzt werden, damit EF-G binden kann.
- Dann muß EF-G abgelöst werden, bevor AA-tRNA-EF-Tu an die P-Stelle binden kann.

Abb.: Fusidinsäure-Wirkung

- Die Notwendigkeit der EF-G Freisetzung wurde durch das Steroid-AB Fusidinsäure entdeckt.
- Nach Bindung von Fusidinsäure an das Rib. läuft eine Translokationsrunde ab.
- EF-GTP bindet an das Ribosom; GTP wird hydrolysiert und das Ribosom wandert um 3 Nct. weiter;
- Fus. stabilisiert den Rib.EF-G/GDP Komplex; so dass diese auf dem Rib. bleiben;
- weil das Rib. keine AA-tRNA binden kann, wird auch keine weitere AS angehängt.

4. Termination der Proteinbiosynthese

- 61 Tripletts kodieren f. AS
- 3 " sind Terminationkodons, die zu einer Beendigung der Proteinsynthese führen:

— — —>	
U A G	U A A U G A
amber	ochre opal

- die Natur dieser Codons wurde durch Punktmutationen aufgeklärt;

a) **Missense** - Mutation:
AS-Substitution

b) **Nonsense** - Mutation:

Stop-kodon: vorzeitiger Kettenabbruch.
 Analyse solcher Mutationen ergab die 3 Terminationskod.
 Sie liegen hinter dem Codon der letzten C-term. AS;

- keines der Stopcodons wird durch eine tRNA vertreten;
- sie werden direkt von Proteinfaktoren erkannt;

Tabelle: Terminationsfaktoren: (RF = "releasing factors)

	MG (Kd)	Faktor/ Ribosom	GTP- Bindung	Funktion
RF1	36	1/20	-	erkennt UAA und UAG
RF2	38	1/20	-	erkennt UGA und UAA
RF3	46	?	+	Stimulation der Ablösung des kompletten Polypeptides von der letzten t-RNA

- RF1 und 2 wirken an der A-Stelle und benötigen Peptidyl-tRNA in der P- Stelle;
- sie haben nicht nur ähnliches MG sondern auch
- 30 % der AS-Sequenz ist homolog;
- verm. früher nur 1 Terminationsfaktor, der alle 3 Stop-codons erkannt hat.

-die Terminationsreaktion umfaßt:

- a) die **Ablösung** des kompl. Polypept.von der letzten P-tRNA,
- b) die **Verdrängung** der tRNA vom Rib. und
- c) die **Dissoziation** der mRNA;

- die Abspaltung des Peptidylrestes von der tRNA könnte durch eine der Peptidyltransferase-analogen Reaktion erfolgen.
- wie sich die Rib. von der mRNA trennen ist unklar; die Dissoziation könnte durch RF- ausgelöste Konformationsänderung bewirkt werden.

Tabelle: Antibiotika der Translation

Inhibitor	Wirtsspektrum	Hemmwirkung und resistente Mutanten
Streptomycin	Bakterien	Initiation; Sm^rMut. sind im

Kirromycin	Bakt.	30S-Protein (S12) mutiert; Elongation; EF-Tu/GTP kann nicht abgelöst werden
Erythromycin	Bakt./Mitoch.	Peptidyltransferase; Em^r bei Modifikation der 23S rRNA
Chloramphenicol	"	Peptidyltransferase; Cm^r in 50S-Protein
Fusidinsäure	Bakt.	Translokation; EF-G/GDP kann nicht abgelöst werden;
Thiostrepton	Bakt.	Translokation; hemmt die GTPase-Aktivität

Antibiotikum: **Kirromycin** hemmt die Wirkung von EF-Tu;

- wenn Kirromycin an EF-Tu bindet, kann weiterhin AA-tRNA an die A-Stelle angelagert werden, aber der EF-Tu-GDP-Komplex kann nicht vom Ribosom abgelöst werden; verhindert Peptidbindung;
- Ribosom frißt sich auf der mRNA fest; Proteinsynthese steht still.

Antibiotikum: **Puromycin**: hemmt ebenfalls die Elongation bewirkt vorzeitige Termination.

- 3'-Ende ist dem einer AA-tRNA ähnlich;
- Peptidyl-Transferase akzeptiert Puromycin;
- Kompetitive Hemmung - vorzeitiger Kettenabbruch;

Gentechnologie: Bedeutsame Entdeckungen und Entwicklungen

- 1869 **Miescher:** Erste DNA-Isolierung
- 1944 **Avery, MacLeod, McCarty:** Identifikation der DNA als Träger der genetischen Information
- 1953 **Watson, Crick:** Entdeckung der Doppelhelixstruktur der DNA
- 1960 **Marmur, Doty:** Entdeckung der Denaturierung und Renaturierung von Nucleinsäuren und damit des Prinzips der Nucleinsäurehybridisierung
- 1961-65 **Nirenberg, Khorana:** Entdeckung des genetischen Code
- 1967 **Gellert:** Entdeckung der DNA-Ligase
- 1968 **Arber:** Entdeckung der Restriktionsenzyme; **Nathans, Smith:** nachfolgend deren Reinigung und Anwendung
- 1970 **Baltimore, Temin:** Entdeckung der reversen Transkriptase
- 1972-73 **Boyer, Cohen, Berg:** Entwicklung von DNA-Klonierungstechniken
- 1975-77 **Sanger, Maxam, Gilbert:** Entwicklung von DNA-Sequenzanalysen
- 1976-81 **Khorana, Riggs, Itakura, Caruthers, Ogilvie:** Entwicklung von Oligonukleotid-/Gensynthesen
- 1986 **Mullins:** Entwicklung der DNA-/RNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion

VON DER RNA ZUM PROTEIN (TRANSLATION = ÜBERSETZUNG)

Entschlüsselung des genetischen Codes:

1935: Stanley kristallisierte das TMV, und widerlegte damit eine weitverbreitete Vorstellung, dass nur anorganische Moleküle, wie etwa das Kochsalz, Kristalle bilden kann;

1954: Sanger klärte die Sequenz des Hormons Insulin auf;

1955: Ochoa & Grunberg-Manago (New York) entdeckten die Polynucleotid-Phosphorylase, ein Enzym, das aus RNTs lange RNA-Stränge synthetisiert;

1958: Crick formulierte die Hypothese, dass der genetische Informationsfluß in folgender Reihenfolge fließt: DNA → RNA → Protein;

1960: Yanofsky (Stanford) & **Brenner** (Cambr. GB) erbrachten durch Mutationsanalyse eines bakteriellen Proteins die ersten experimentellen Hinweise für die Colinearität von Gen und Protein;

1961: Brenner & Crick brachten Hinweise und Berechnungen für den Triplet-Code;

1961: Nirenberg & Matthaei (NIH, Bethesda) zeigten, dass synthet. Poly-U (Polynucleotid-Phosphorylase) in einem zellfreien Translationssystem, in ein Phe-Polypeptid übersetzt wird; UUU codiert also Phe.

1966: Khorana (Madison, Wisc.) synth. RNA-Moleküle in allen 64 Kombinationsmöglichkeiten und trug so zur Aufklärung des genet. Codes bei.

1. In dieser DNA-Sequenz ist das Gen für ein kleines Peptid codiert:
Kennzeichnen Sie in dieser DNA-Sequenz:

- die Promoterregion mit ungefährem Start der mRNA
- Richtung der Transkription (Pfeil genügt)
- die ribosomale Bindestelle
- den Transkriptionsterminus
- Beginn und Ende des ORF (offener Leserahmen) 9 P

Richtung des Gens
→

ACAAATTCTTAAGAGTAAGCGTTTTTTTTTAATTTTTTTTAAAGTAAAGTATTTGACAAATC

AATTATTTTTTTCTATAATAGACATTGAAAGAGAAAAGCAAATGCGGAAAGAGGAGGTT

CAATAAATGAACCAAGAACAATTTGACAAAATAAAAATGGTAAAGGATTTATCGCAGCA

AAGCTTTAAATAATAACGAGCCCCTTCTTTGAAGGGGCTCGCTTTTTTGTATAATTCCA