

Einführung in die Molekularbiologie
Prof. Dr. Martin Hagemann

Vorlesung 10

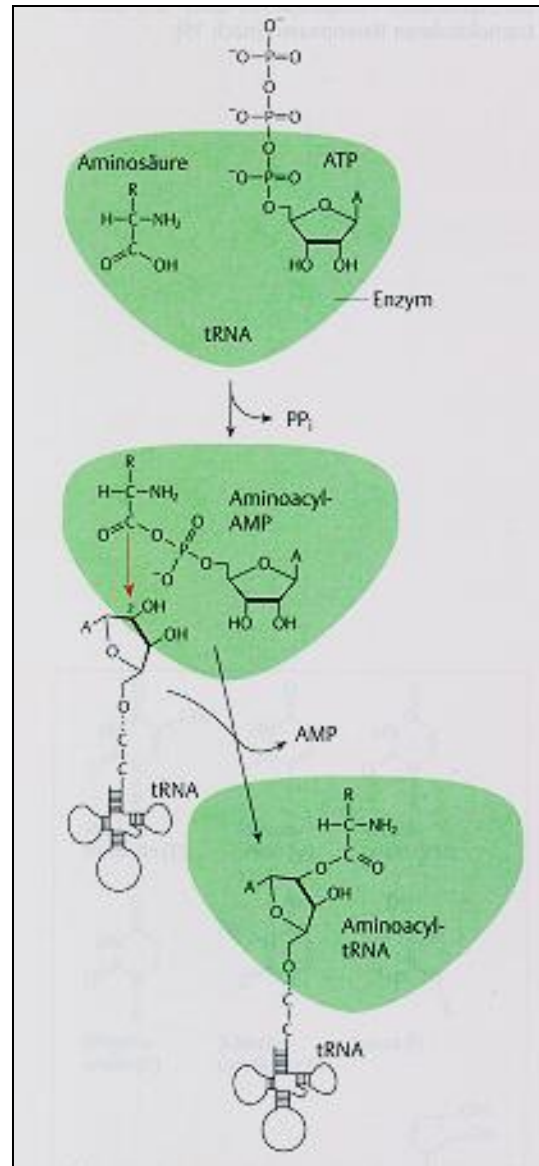
Proteinbiosynthese

Regulation der Translation
Proteinexport



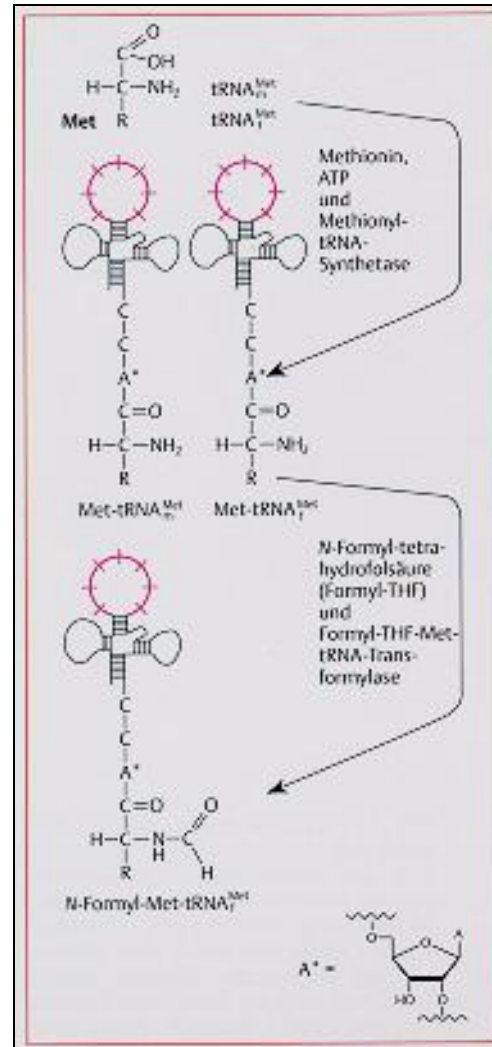
Proteinbiosynthese

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen beladen die tRNA in einer 2Schrittreaktion
2. Genetischer Code



Proteinbiosynthese

Spezifische Initiator-tRNAs binden im P-Ort
In Prokaryoten trägt Methionin am N-Atom eine Formylgruppe
Alternative Startcodons zu AUG sind GUG und UUG



Proteinbiosynthese

Das allosterische Dreistellen-Modell erklärt, wie Geschwindigkeit und Genauigkeit bei der Proteinbiosynthese realisiert werden.

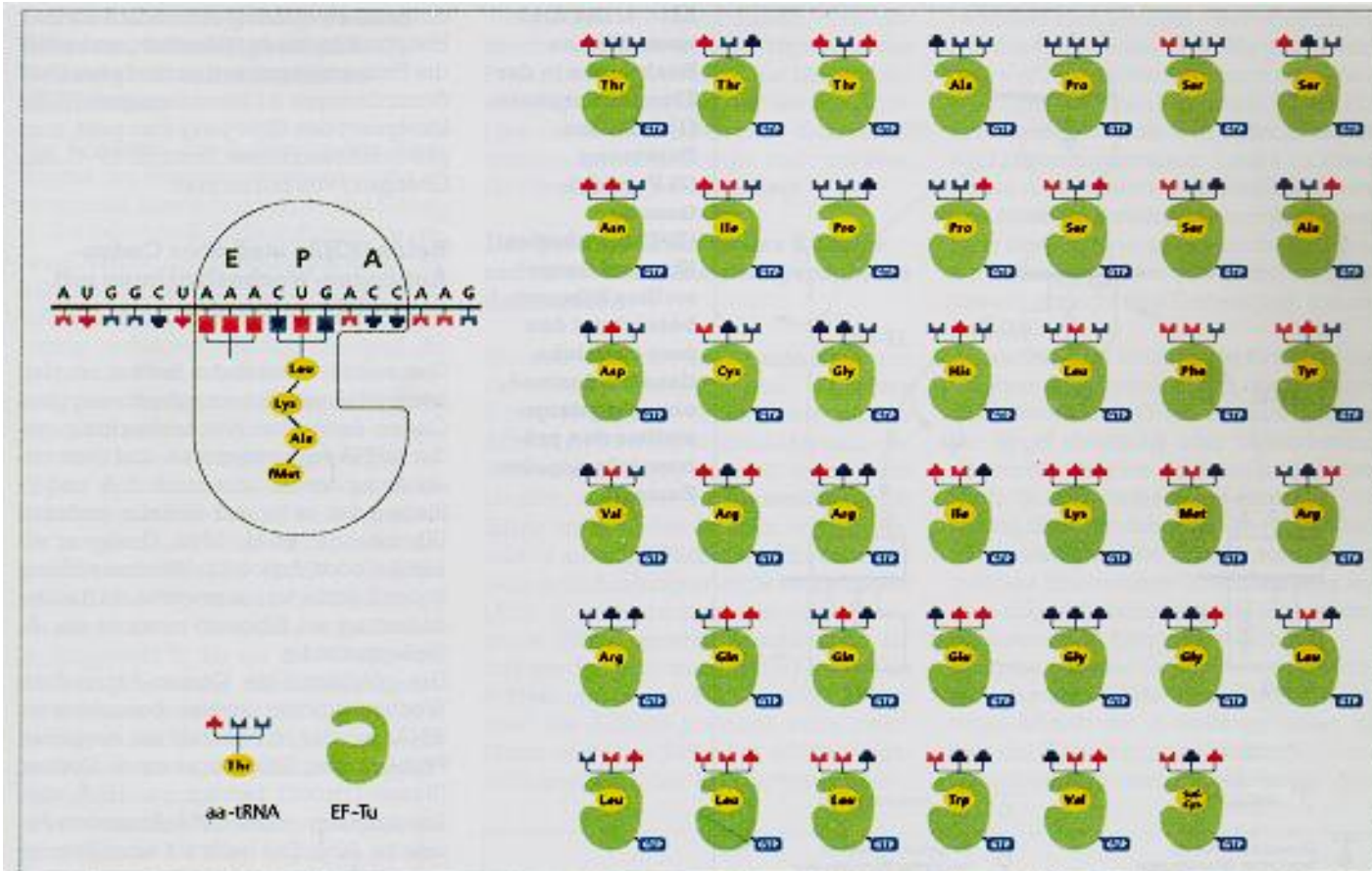
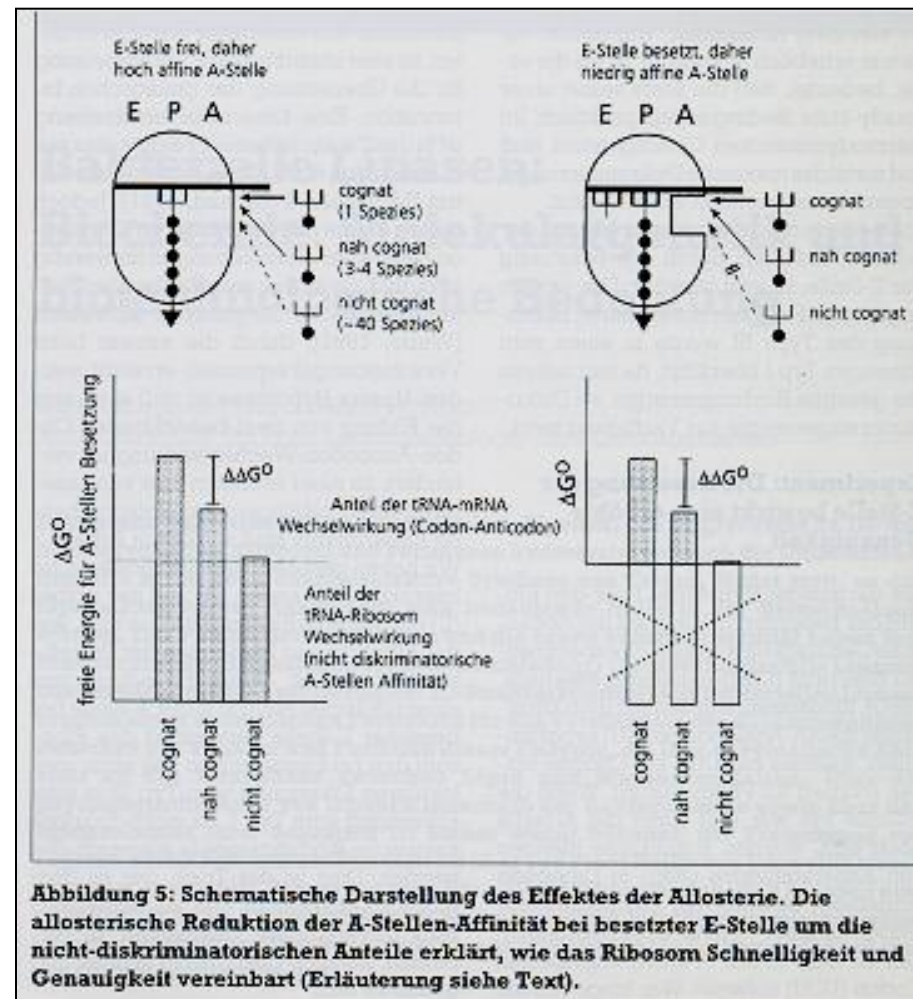
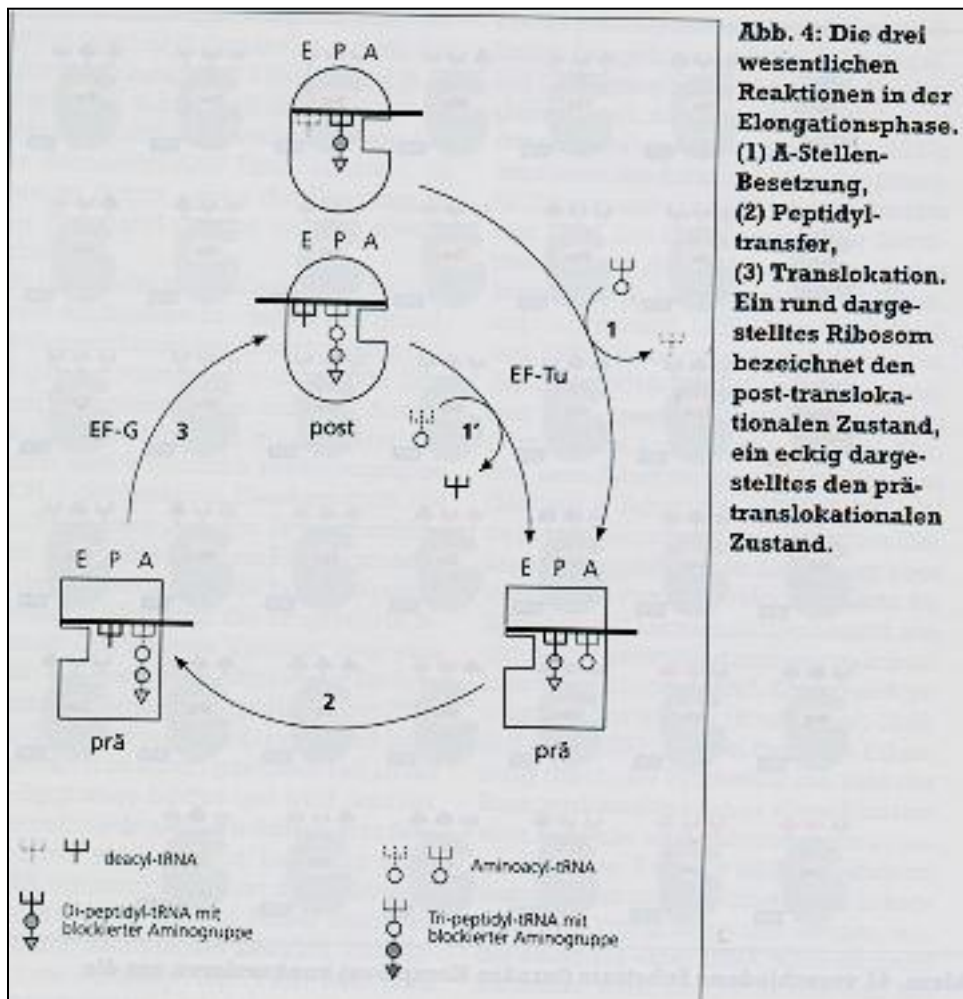


Abb. 3: Das ribosomale Erkennungsproblem. 41 verschiedene Substrate (ternäre Komplexe) konkurrieren um die ribosomale A-Stelle.

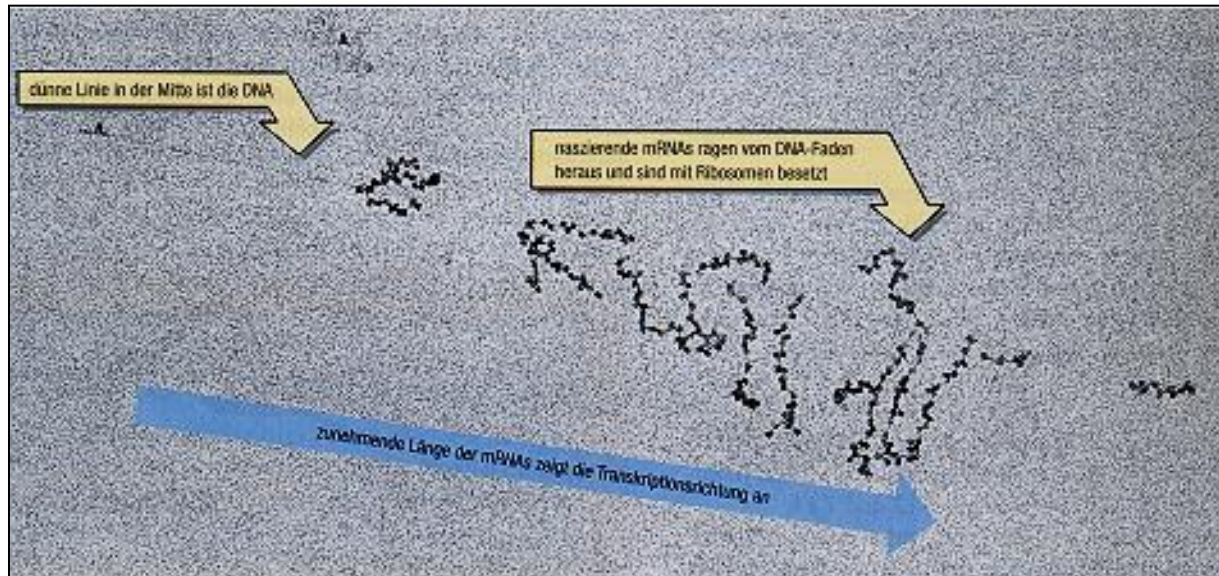
Proteinbiosynthese

Das allosterische Dreistellen-Modell nimmt 2 allost. Zustände am Ribosom an. Eine geringe Affinität der A-Stelle bei der AA-tRNA-Bindung (E- und P-Stelle besetzt) erklärt, wie schnell richtige tRNAs selektiert werden.

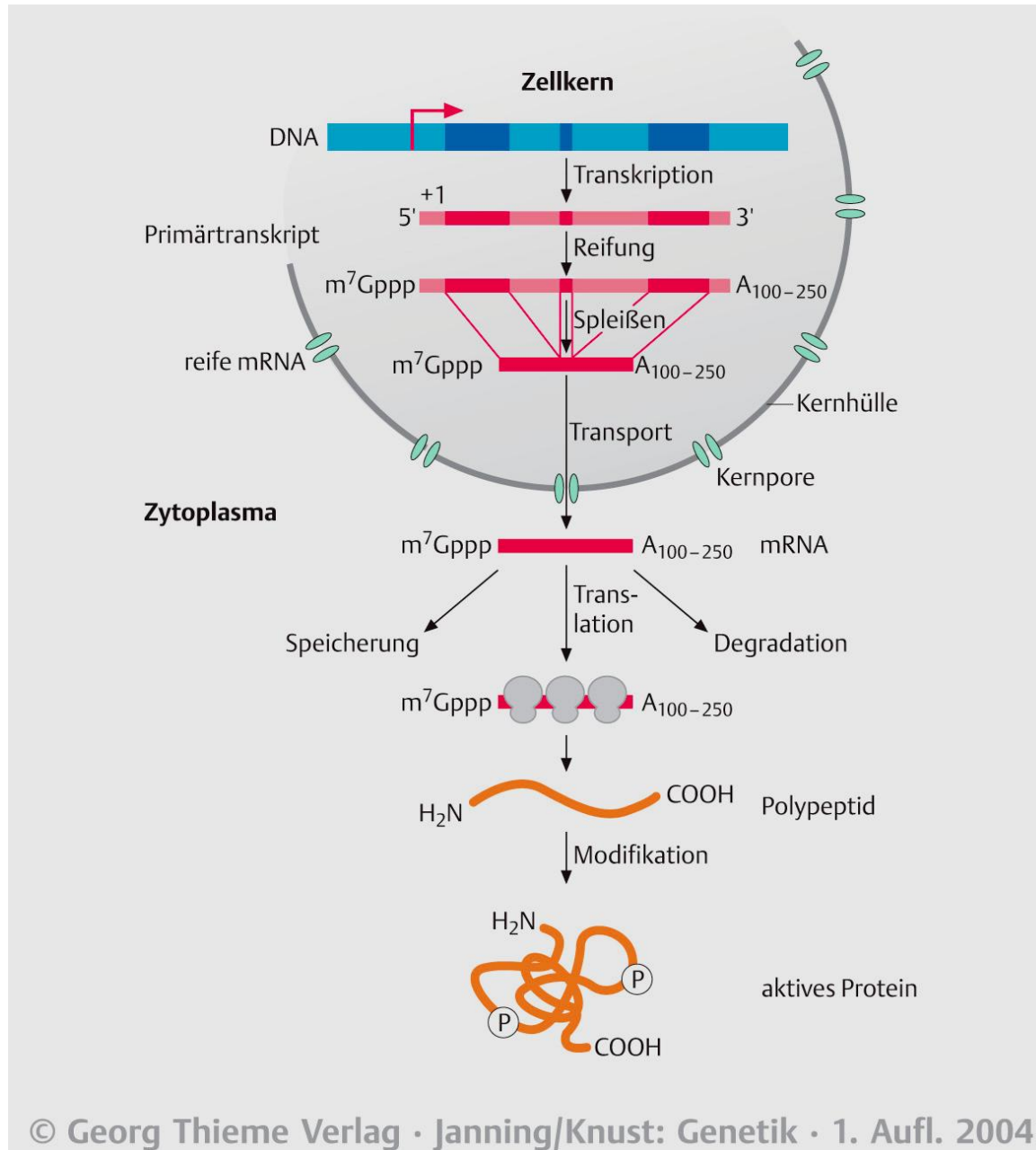


Proteinbiosynthese

Proteinbiosynthese findet an Polysomen statt
Kopplung von Transkription und Translation bei Prokaryoten erklärt,
warum eher wenig Translationskontrolle bei diesen Organismen stattfindet.

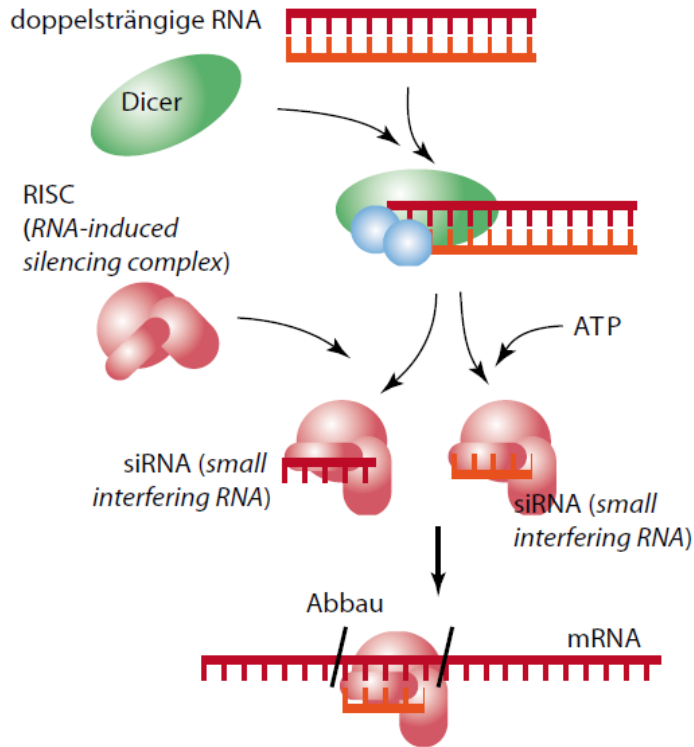


Ebenen der Genregulation bei Eukaryoten

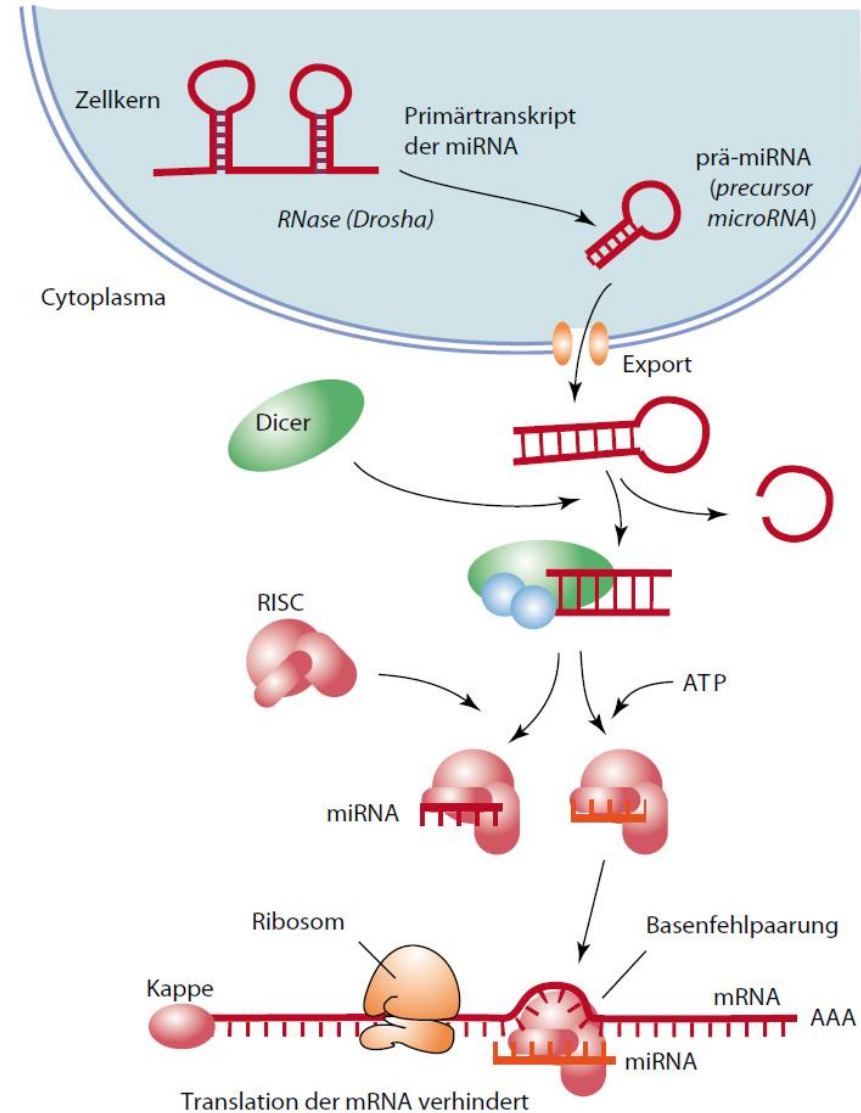


Wirkungsweise von kleinen RNAs auf mRNAs

Wichtigster Mechanismus zur Translationskontrolle spezifischer mRNAs



Abbau der mRNA durch RNA-Interferenz:
Rolle der siRNA

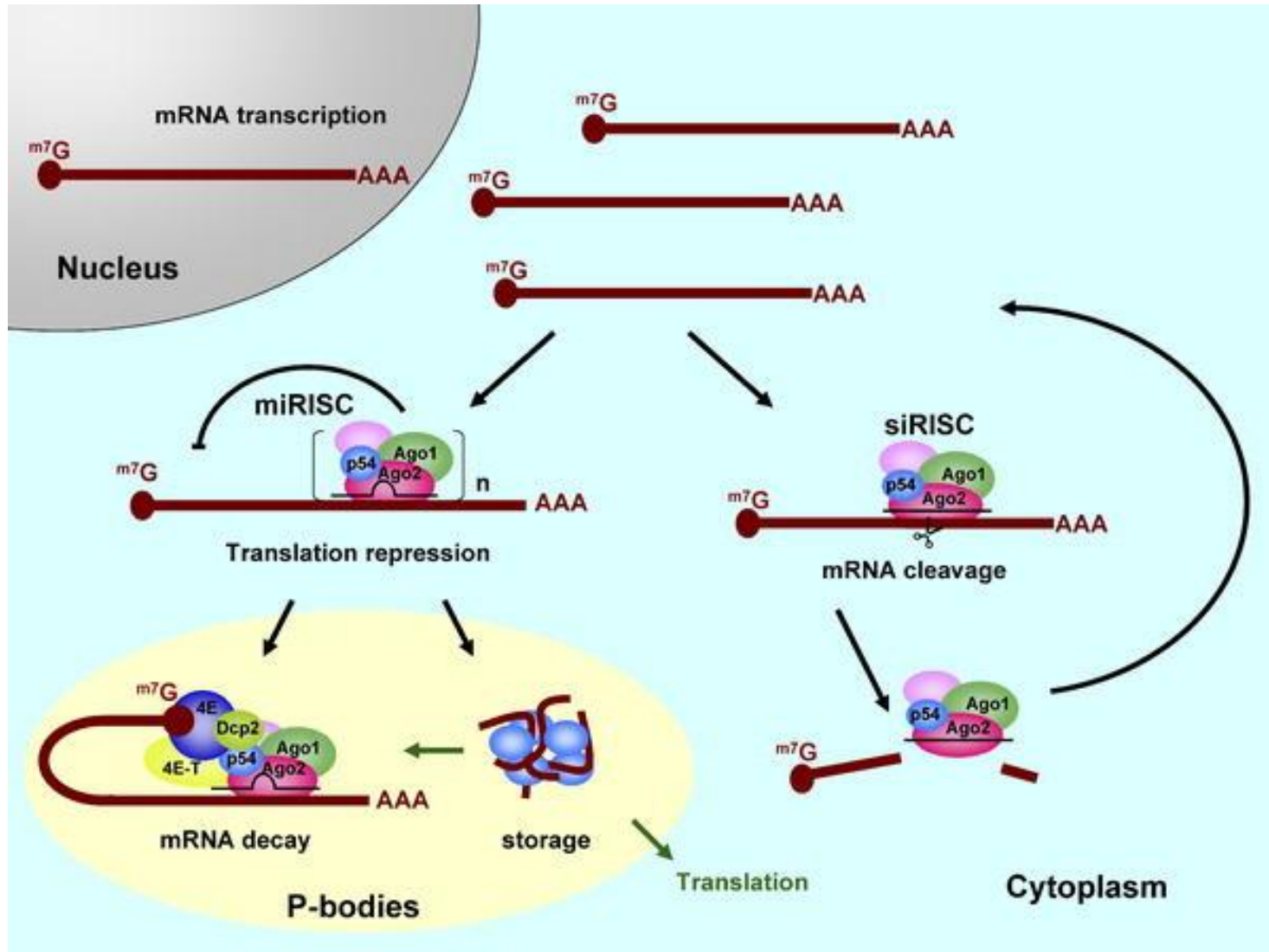


Hemmung der Translation durch RNA-Interferenz: Rolle der miRNA

Wirkungsweise von kleinen RNAs mit Hilfsproteinen

Blockierung der Translation bzw. Lagerung spezifischer mRNAs

P-bodies: processing bodies, Mikrokompartment in der eukaryotischen Zelle



Regulation der Proteinbiosynthese

„Codon usage“ bestimmt Translationsgeschwindigkeit

Aminosäure	Codons	sehr hoch	hoch	mittel	niedrig
Leu	UUA	0,11	0,17	0,39	0,74
	UUG	0,11	0,36	0,55	0,79
	CUU	0,22	0,33	0,49	0,54
	CUC	0,20	0,45	0,57	0,64
	CUA*	0,04	0,07	0,11	0,18
	CUG	5,33	4,62	3,89	3,12
Ile	AUU	0,47	0,96	1,14	1,64
	AUC	2,53	2,03	1,78	1,24
	AUA*	0,01	0,01	0,08	0,12
Ser	UCU	2,57	1,75	1,32	0,83
	UCC	1,91	1,75	1,35	0,83
	UCA	0,20	0,26	0,55	0,59
	UCG*	0,04	0,48	0,84	0,95
	AGU	0,22	0,24	0,43	0,87
	AGC	1,05	1,52	1,51	1,93
Pro	CCU	0,23	0,47	0,45	0,55
	CCC*	0,04	0,07	0,15	0,52
	CCA	0,44	0,50	0,72	0,75
	CCG	3,29	2,97	2,68	2,19
Arg	CGU	4,39	3,86	3,33	2,17
	CGC	1,56	2,00	2,16	2,76
	CGA*	0,02	0,06	0,18	0,29
	CGG*	0,02	0,03	0,21	0,57
	AGA*	0,02	0,02	0,09	0,13
	AGG*	0,00	0,03	0,04	0,09
Gly	GGU	2,28	2,23	1,80	1,34
	GGC	1,65	1,50	1,67	1,74
	GGA*	0,02	0,08	0,20	0,33
	GGG*	0,04	0,19	0,33	0,59
		sehr hoch	hoch	mittel	niedrig
gesamt Codons		6240	9223	25010	22459
seltene Codons		20	116	682	1083
% seltene Codons		0,32	1,26	2,73	4,82

Effektom – Gruppe von Genen mit besonders starker Abweichung vom normalen codon usage, d.h. Gene mit besonders hoher Translationsgeschwindigkeit.

Diese Gruppe wird dominiert von Genen für Proteine der:

Proteinbiosynthese, -Faltung, Stressbewältigung
Grundstoffwechsel, Energieerzeugung

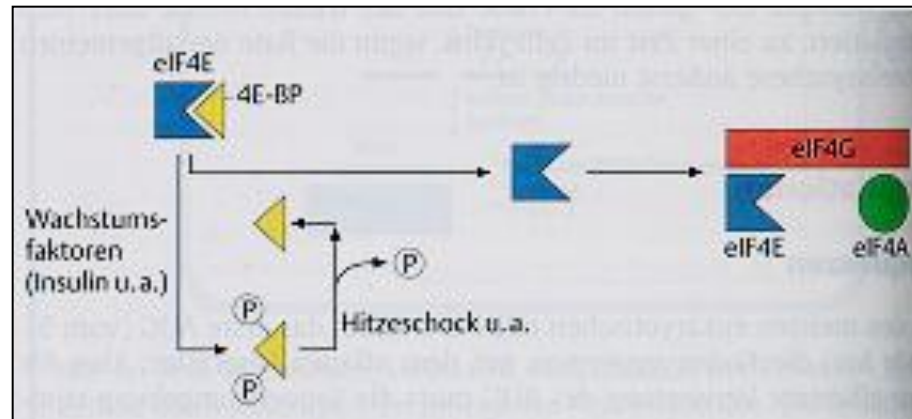
Praktisch wichtig bei der Expression heterologer Gene in Wirtszellen – Anpassen!!!



Regulation der Proteinbiosynthese

Regulation an der Kappe

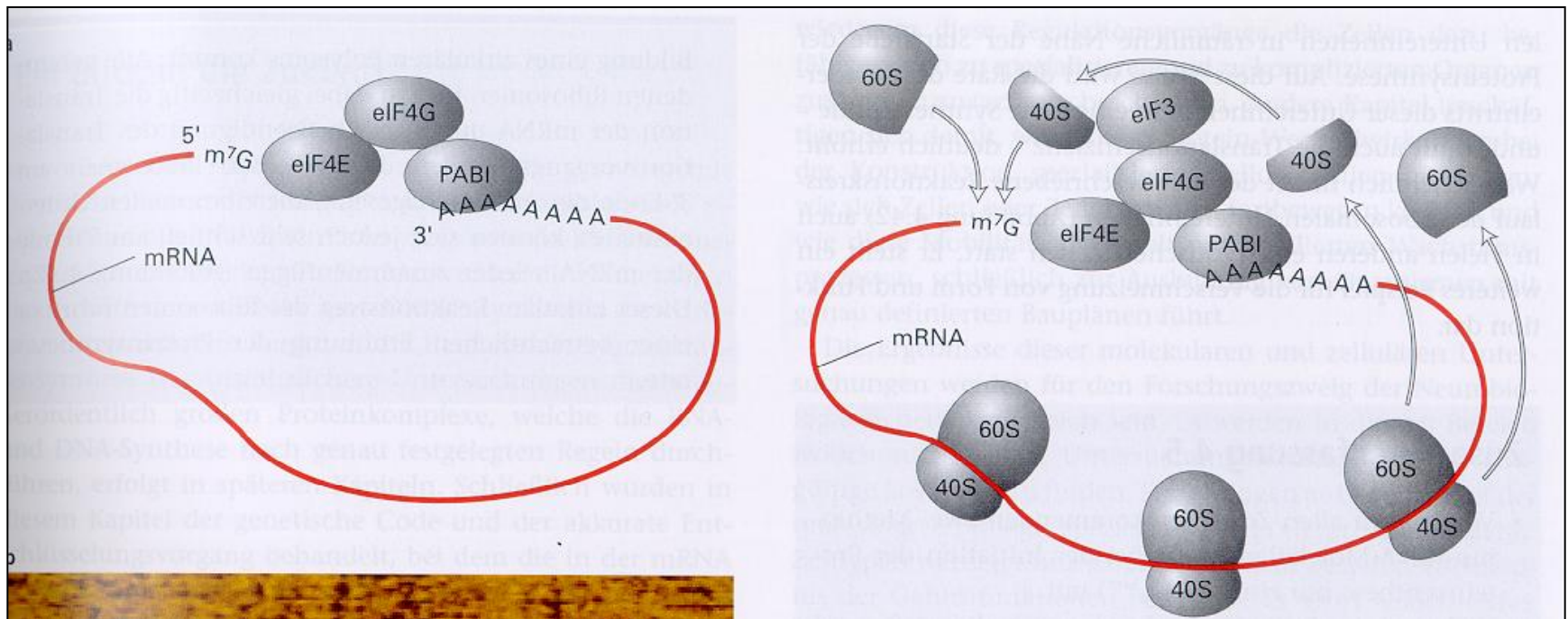
eIF4E-Bindeproteine (4E-BP) regulieren cap-Bindeaktivität durch Phosphorylierung, die zur Freisetzung von eIF-4E und Translation führt.
eIF4G – durch Phosphorylierung oder Proteolyse (Polio) reguliert



Regulation der Proteinbiosynthese

Regulation an der Kappe

Kappen-bindende Proteine binden das 3'-Ende über PABP
Recycling von Ribosomenuntereinheiten

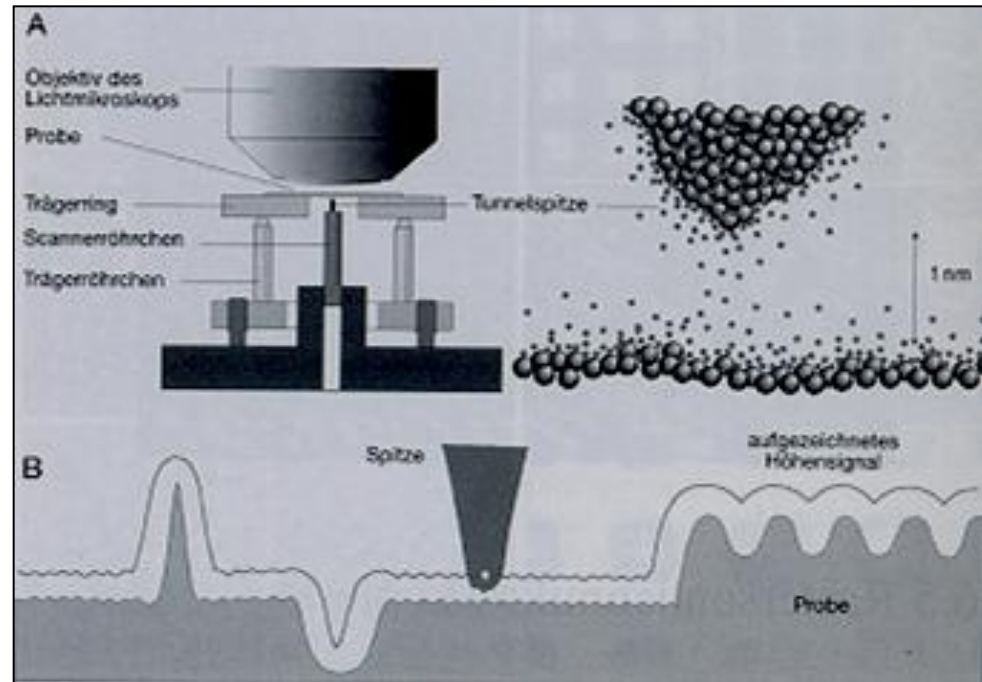
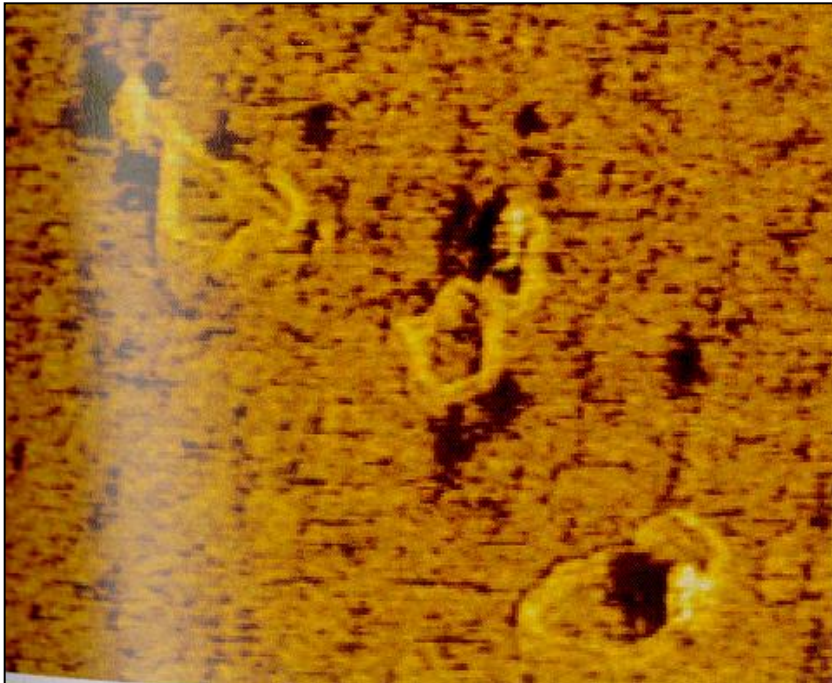


Regulation der Proteinbiosynthese

Regulation an der Kappe

Kappen-bindende Proteine binden das 3'-Ende über PBP

Atomic-Force-Mikroskopie von Komplexen aus mRNA, PABP, eIF4E+G



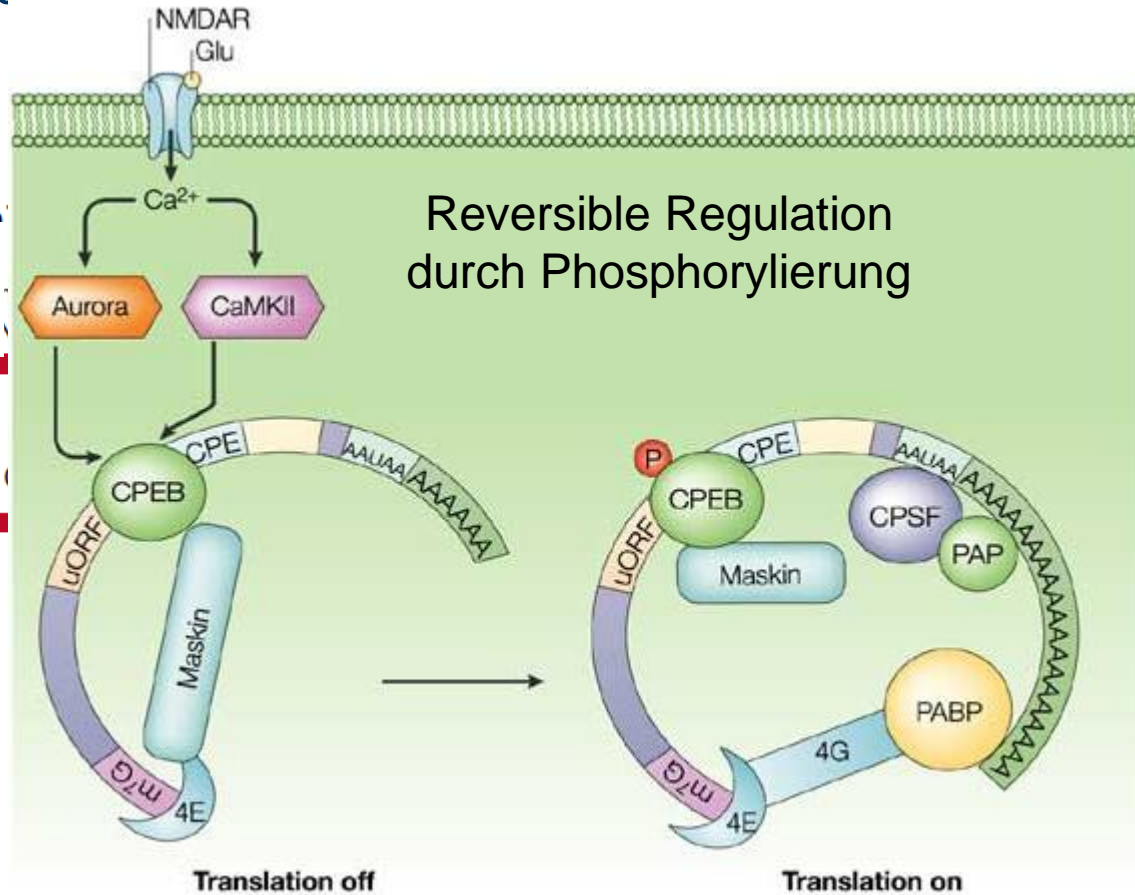
Regulation der Proteinbiosynthese

Rolle d

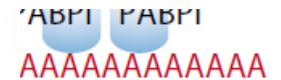
Reifung

Hemmung
der Translation

ruhend



Freigegebene
Translation nach
weiterer Poly-
Adenylierung



Nature Reviews | Neuroscience

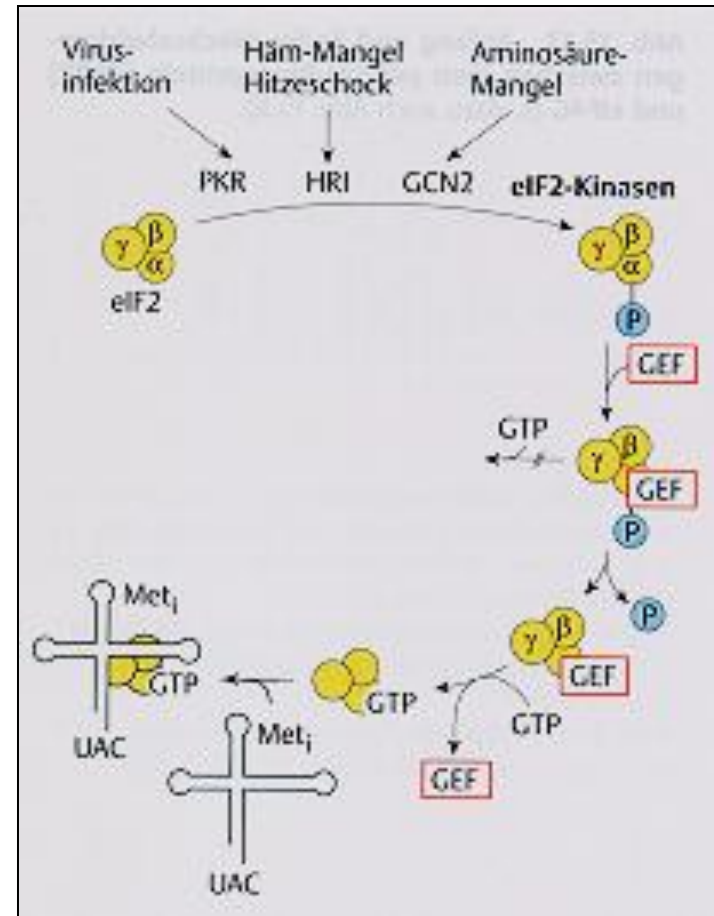
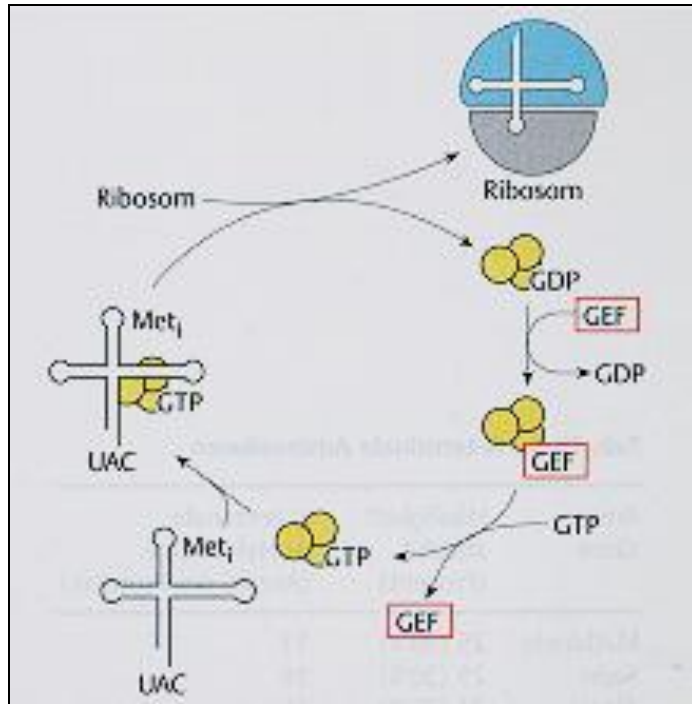
The 3'-untranslated region of a specific class of messenger RNA (mRNA) contains sequences that allow the binding of cytoplasmic polyadenylation element-binding protein (CPEB) and polyadenylation specificity factor (CPSF). Translation of transcripts that are bound to CPEB and its binding partner Maskin is inhibited, but can be de-repressed by extension of the poly (A) tail. NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor (NMDAR) activation results in calcium influx and activation of Aurora and/or calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), which then phosphorylates (P) CPEB. This leads to the interaction between CPEB and CPSF and the subsequent recruitment of poly(A) polymerase (PAP) to lengthen the poly(A) tail. Poly(A)-binding protein (PABP) then binds to the extended poly(A) tail, interacts with eIF4G to circularize the mRNA, which releases eIF4E from Maskin, and results in enhanced translation of the CPE-containing mRNAs. m7G, 7-methyl-GTP; uORF, upstream open reading frame.



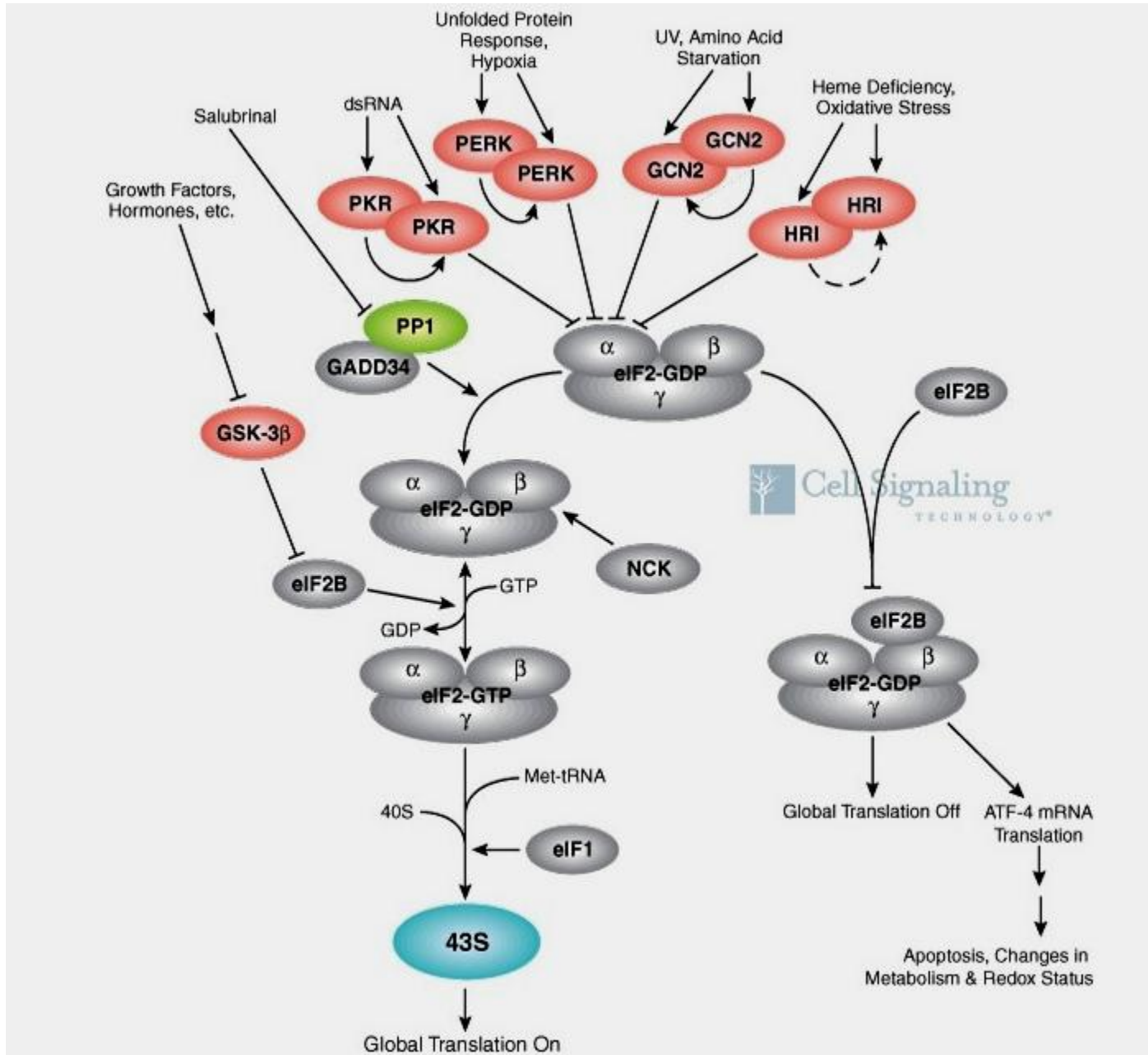
Regulation der Proteinbiosynthese

Regulation über das Protein eIF2

Proteinkinasen schalten Translation ab, da GEF (eIF2B) stabil an eIF2 gebunden bleibt und GDP/GTP-Austausch unterbleibt!

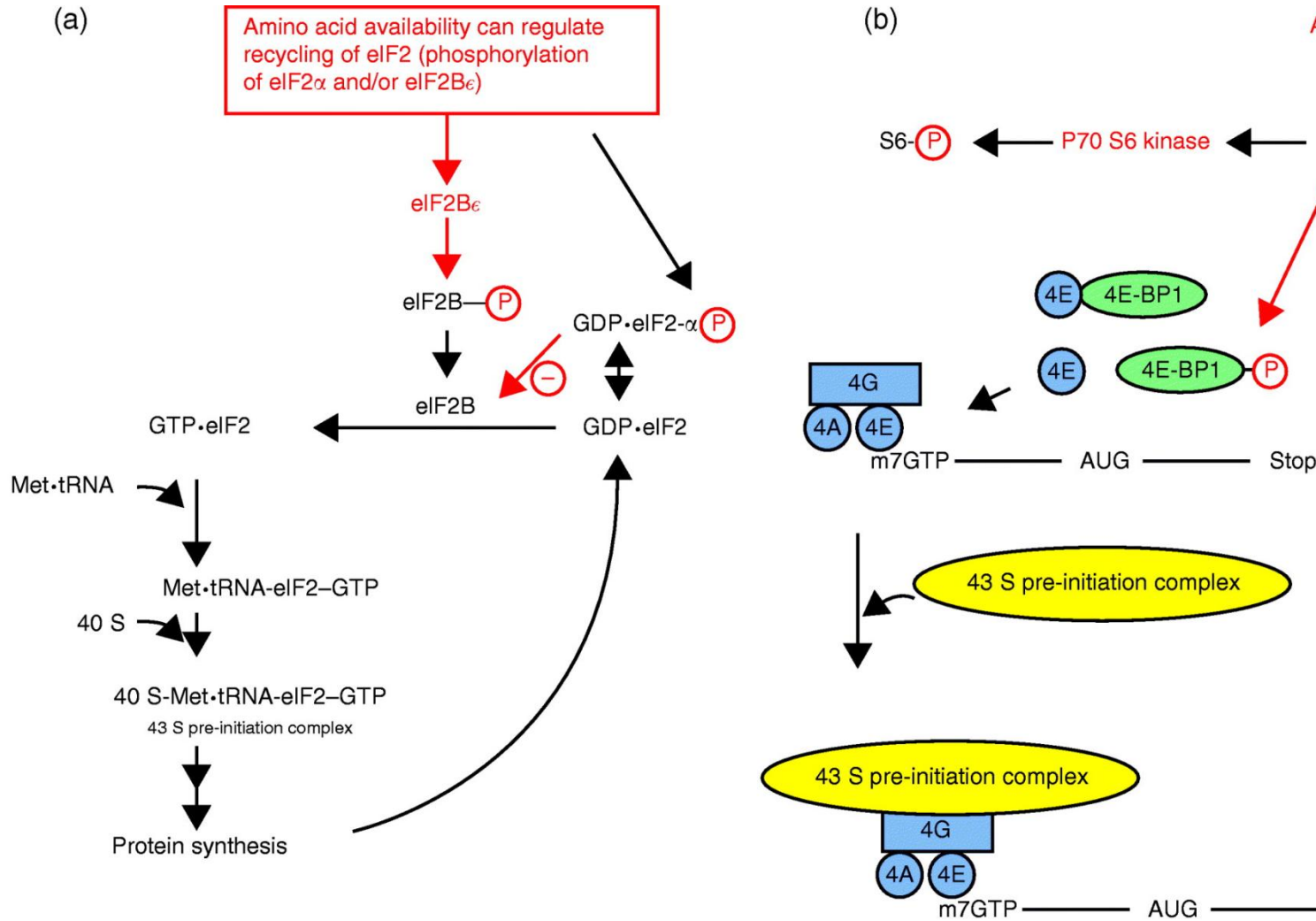


Sehr viele Faktoren hemmen die Translation über eIF2-Phosph.



Positive und negative Regulation der Translation Spezifität?

mTOR – mammalian Target of Rapamycin/
Sirolimus, immunsuppressive-agent

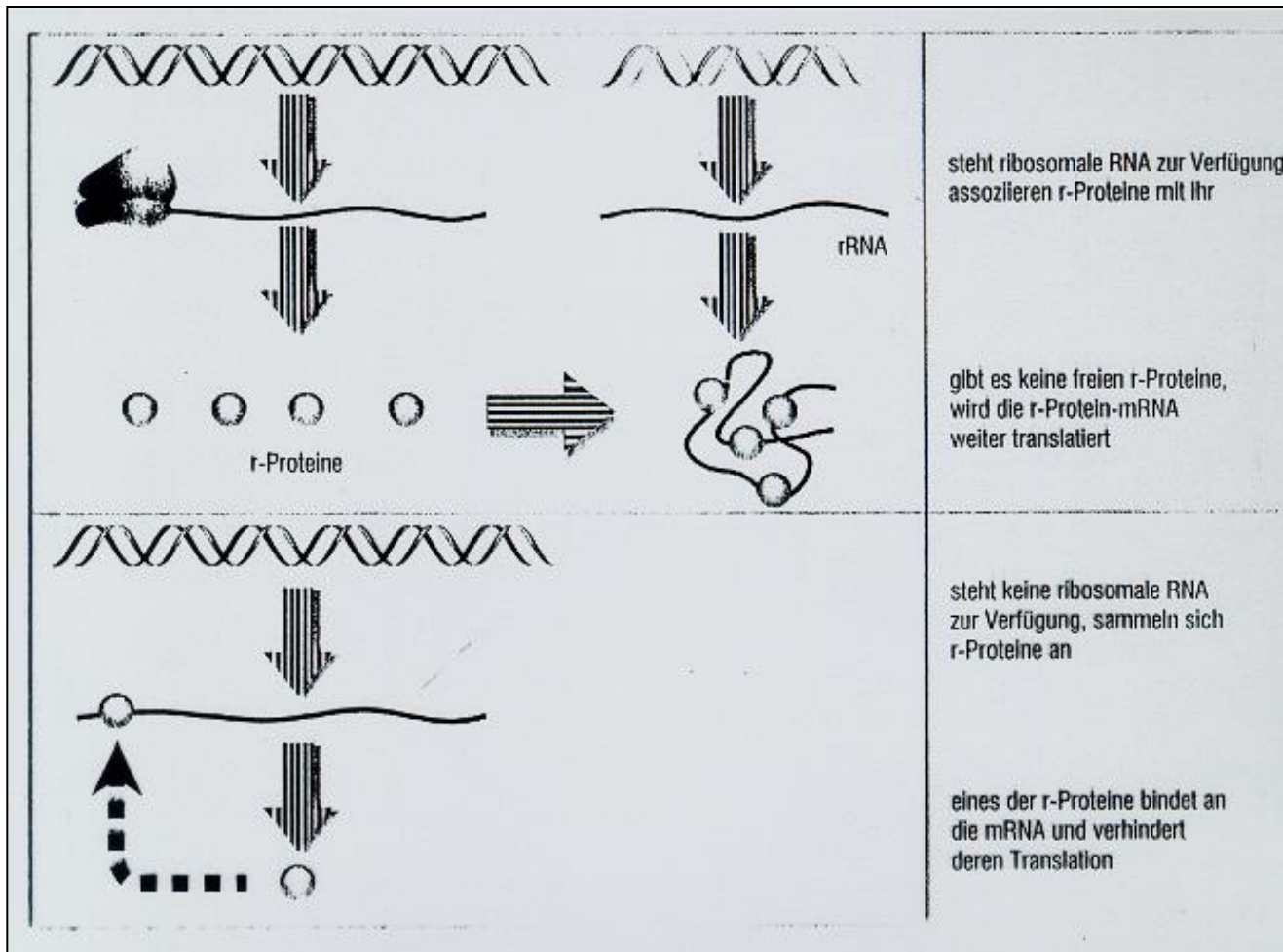


Regulation der Proteinbiosynthese

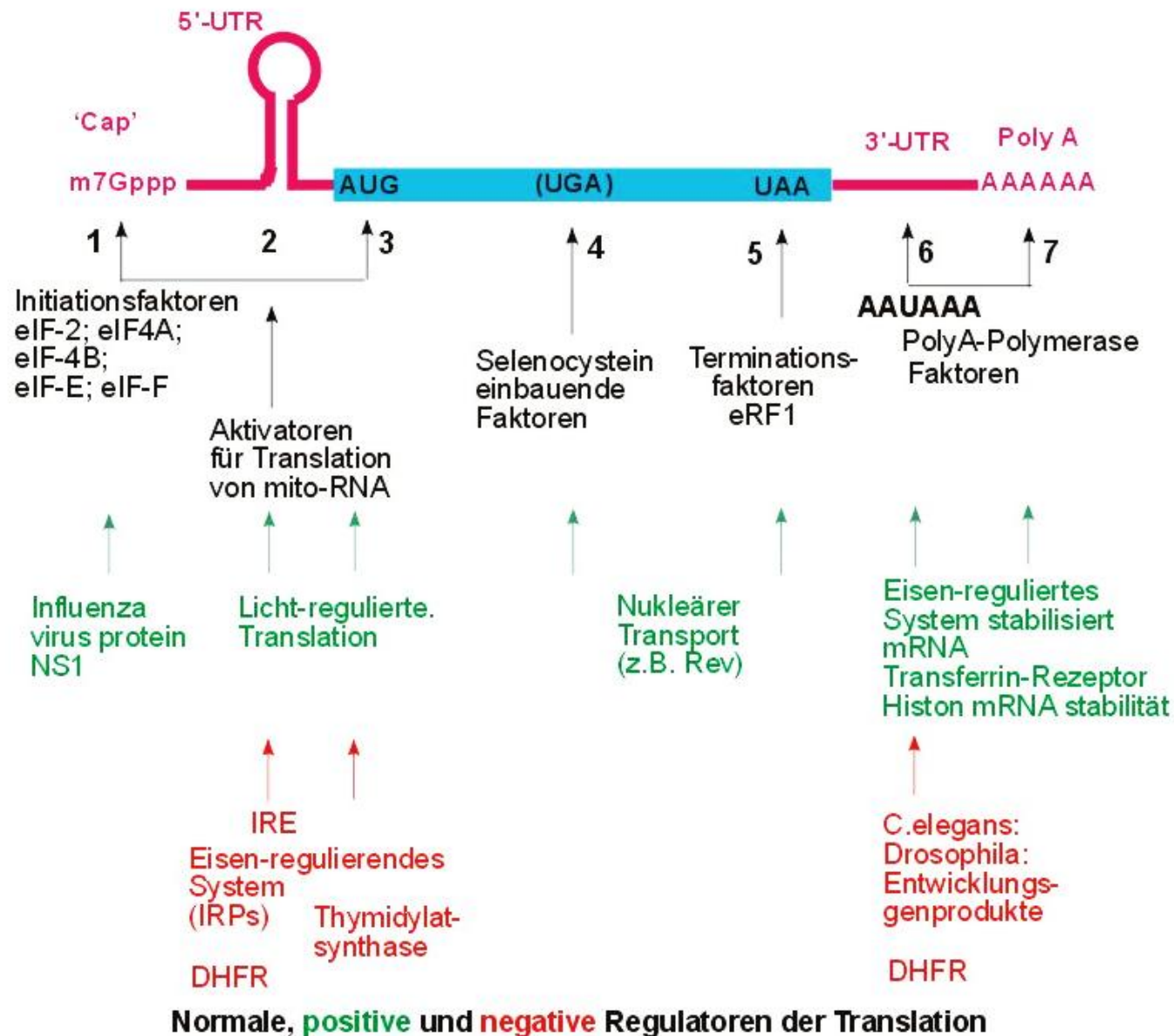
Regulation spezifischer mRNAs

z.B. Autoregulation von ribosomalen Proteinen, Histonen etc.

Bindung des 3'UTR durch si/mi RNAs



Posttranskriptions-Kontrolle der Expression in Eukaryoten



Zusammenfassung zur Regulation der Translation

Genspezifische Mechanismen:

Stabilität und Translatierbarkeit der mRNA (RNA-Sequenzelemente insbesondere im 3'UTR, kleine RNAs)

Zugänglichkeit der mRNA für das Ribosom (Bindung von Protein, kleine RNAs, RNA-Sekundärstrukturen, Riboswitch)

Codon usage

Globale Mechanismen:

Phosphorylierung vom eIF4-Komplex

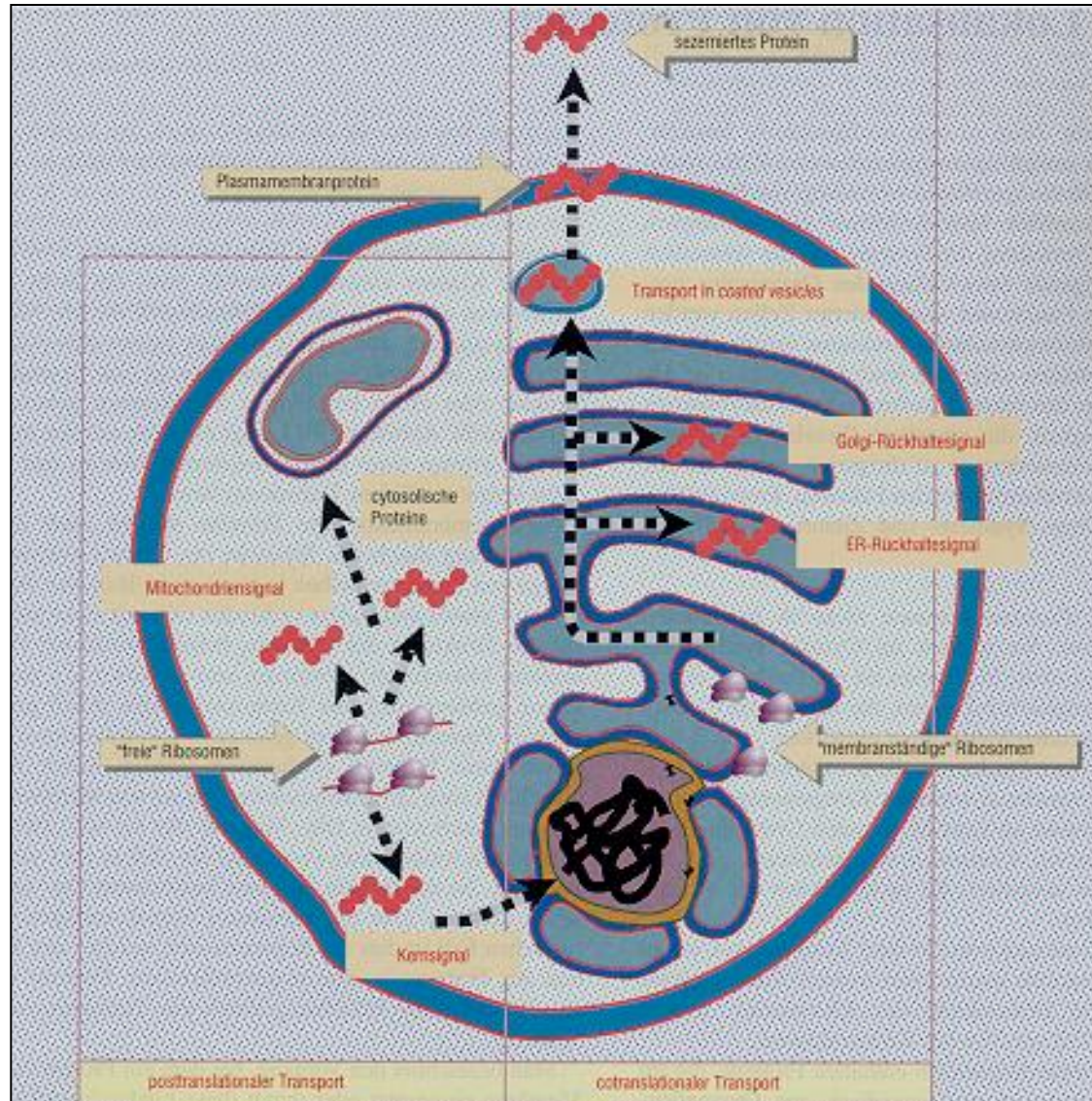
Proteolyse des eIF4-Komplexes

Phosphorylierung vom eIF2-Komplex, stabile Bindung des GEF



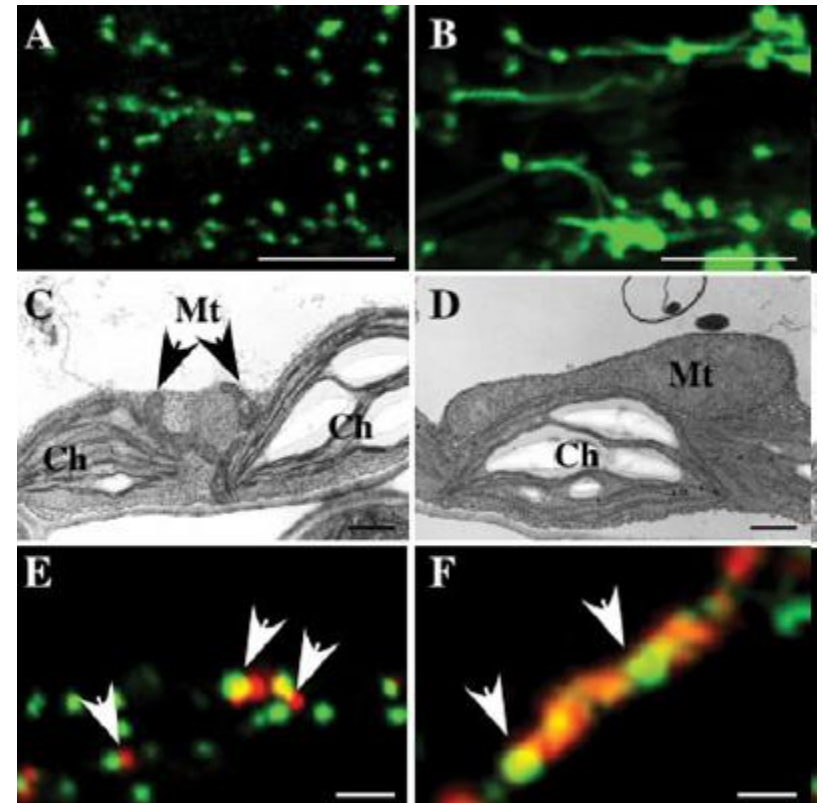
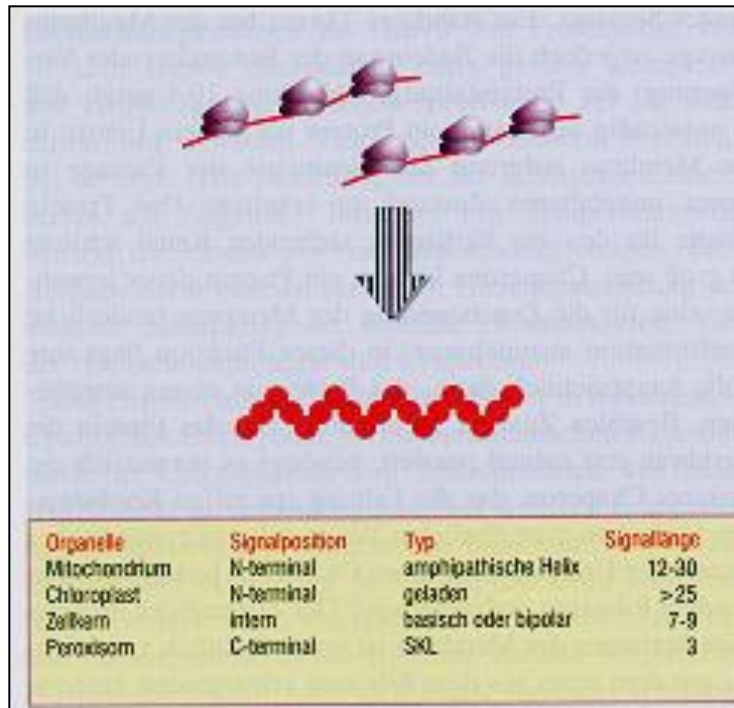
Synthese von Proteinen für Zellkompartimente

co- bzw. posttranslationaler Transport



Synthese von Proteinen für Zellkompartimente

Posttranslationaler Transport hängt von spezifischen Targetsequenzen ab
Wichtiger Hinweis auf zelluläre Lokalisation von Proteinen!
Sollte durch Experimente bestätigt werden – z.B. GFP-Fusion!



Synthese von Proteinen für Zellkompartimente

Einige Proteine haben kombinierte Targetsequenzen
z.B. Cytochrom c1 in Hefe

