

Einführung in die Molekularbiologie  
Prof. Dr. Martin Hagemann

Vorlesung 10

## **Proteinbiosynthese**

Struktur von tRNA und Ribosom  
Translation am Ribosom  
Regulation der Translation  
Proteinexport



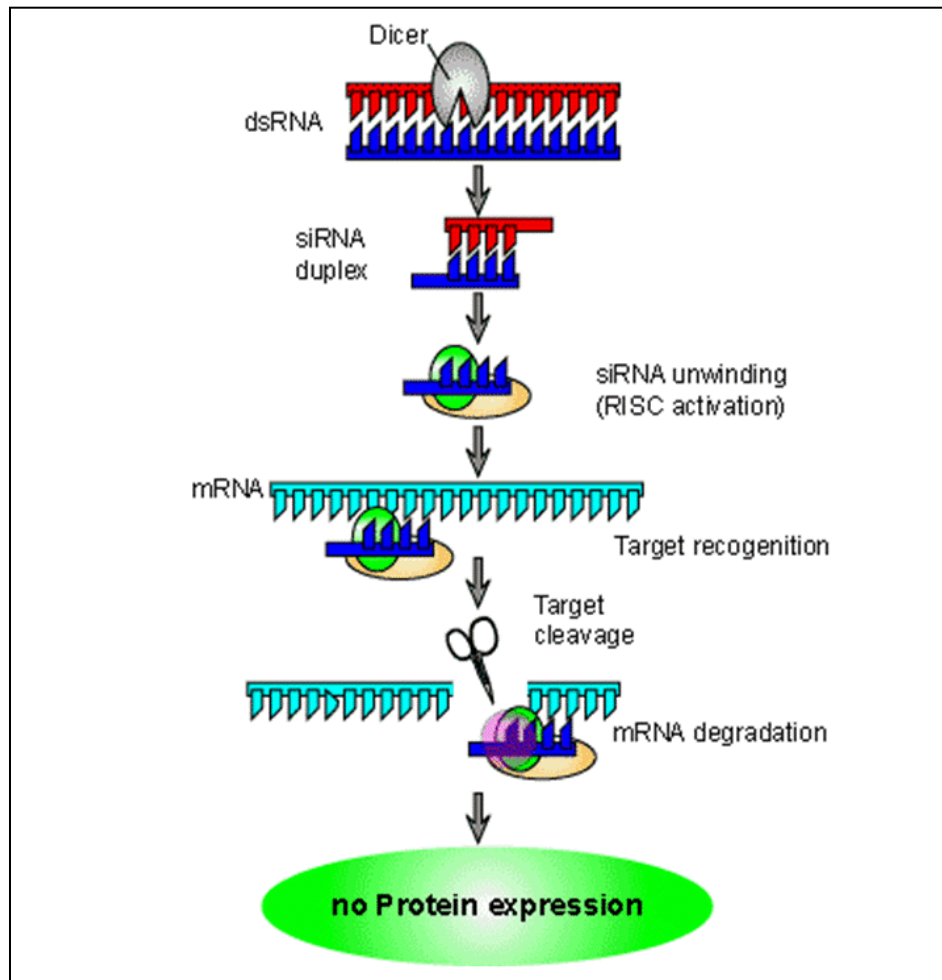
# Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

Kleine RNAs spielen eine regulatorische Rolle!

Ca. 40% des nichtcodierenden Bereiches im humanen Genom ist exprimiert!

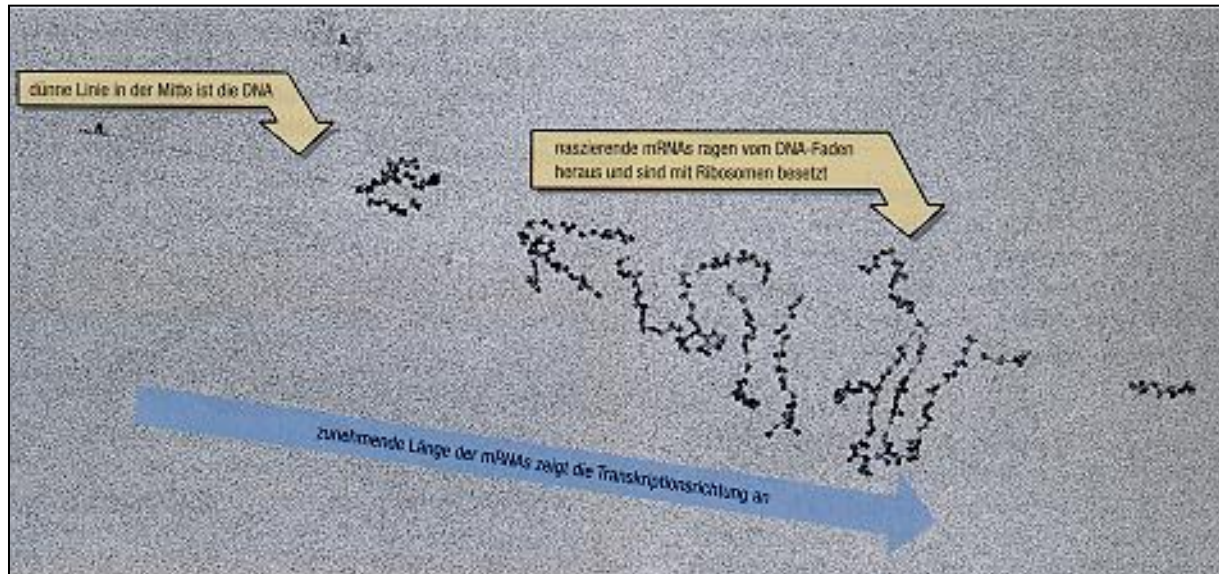
Es wurden ca. 8000 microRNAs vorausgesagt!

Darunter sind Primaten- und Gehirn-spezifische microRNAs!



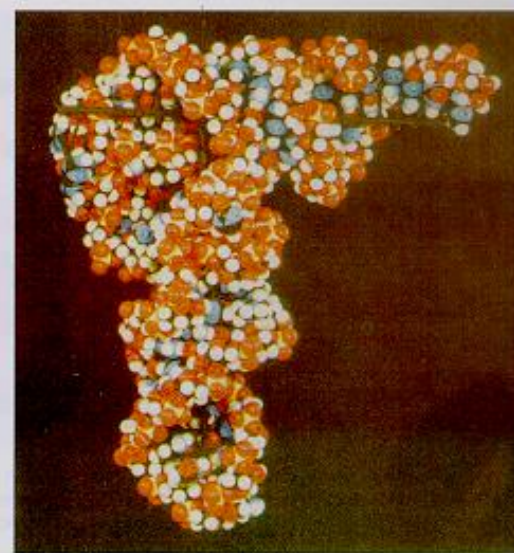
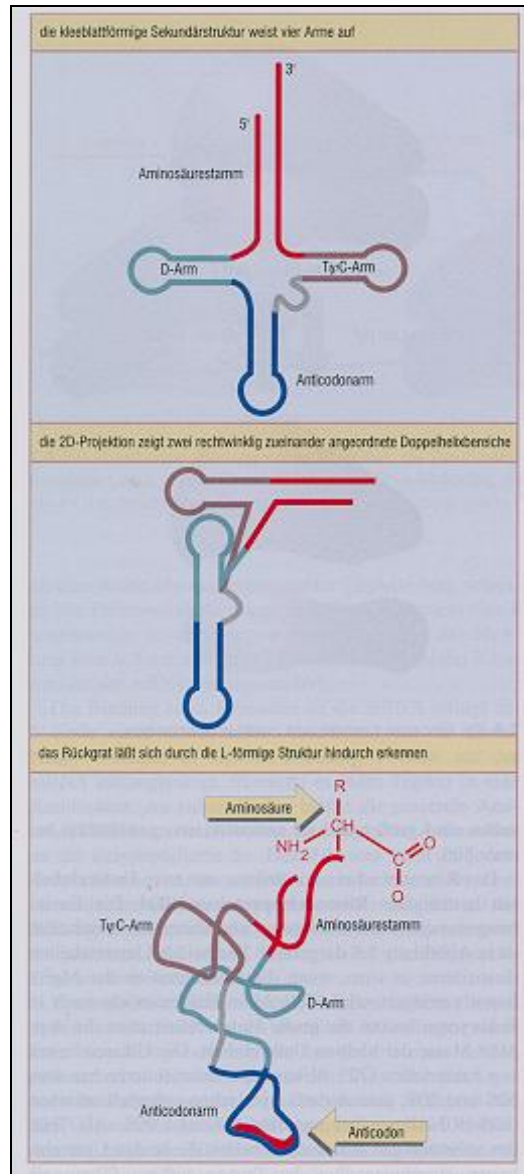
# Proteinbiosynthese

Proteinbiosynthese findet an Polysomen statt  
Kopplung von Transkription und Translation bei Prokaryoten



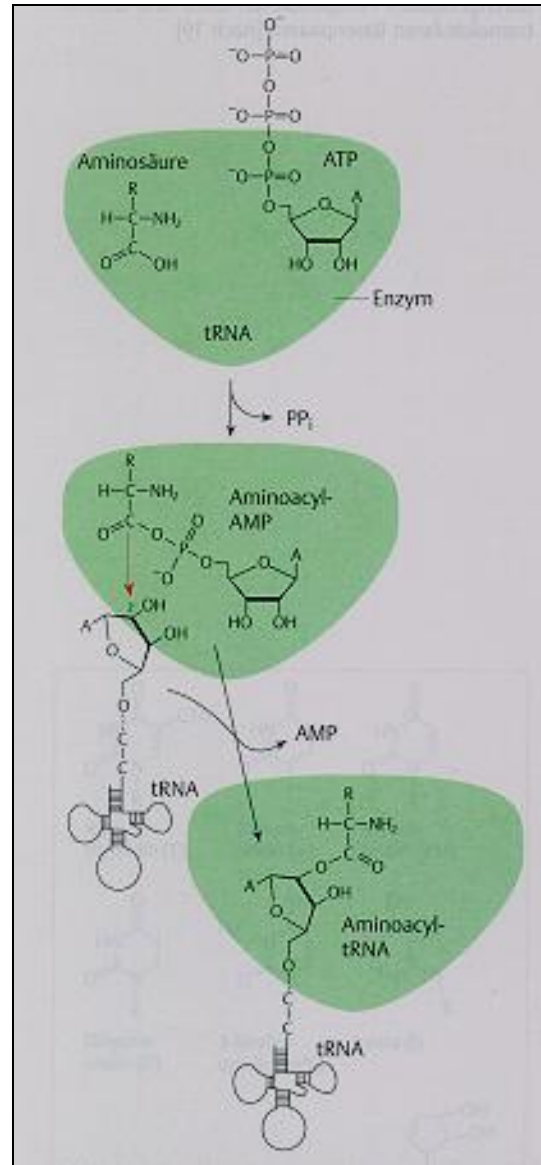
# Proteinbiosynthese

Struktur der tRNA, am 3'-Ende wird die AS gebunden



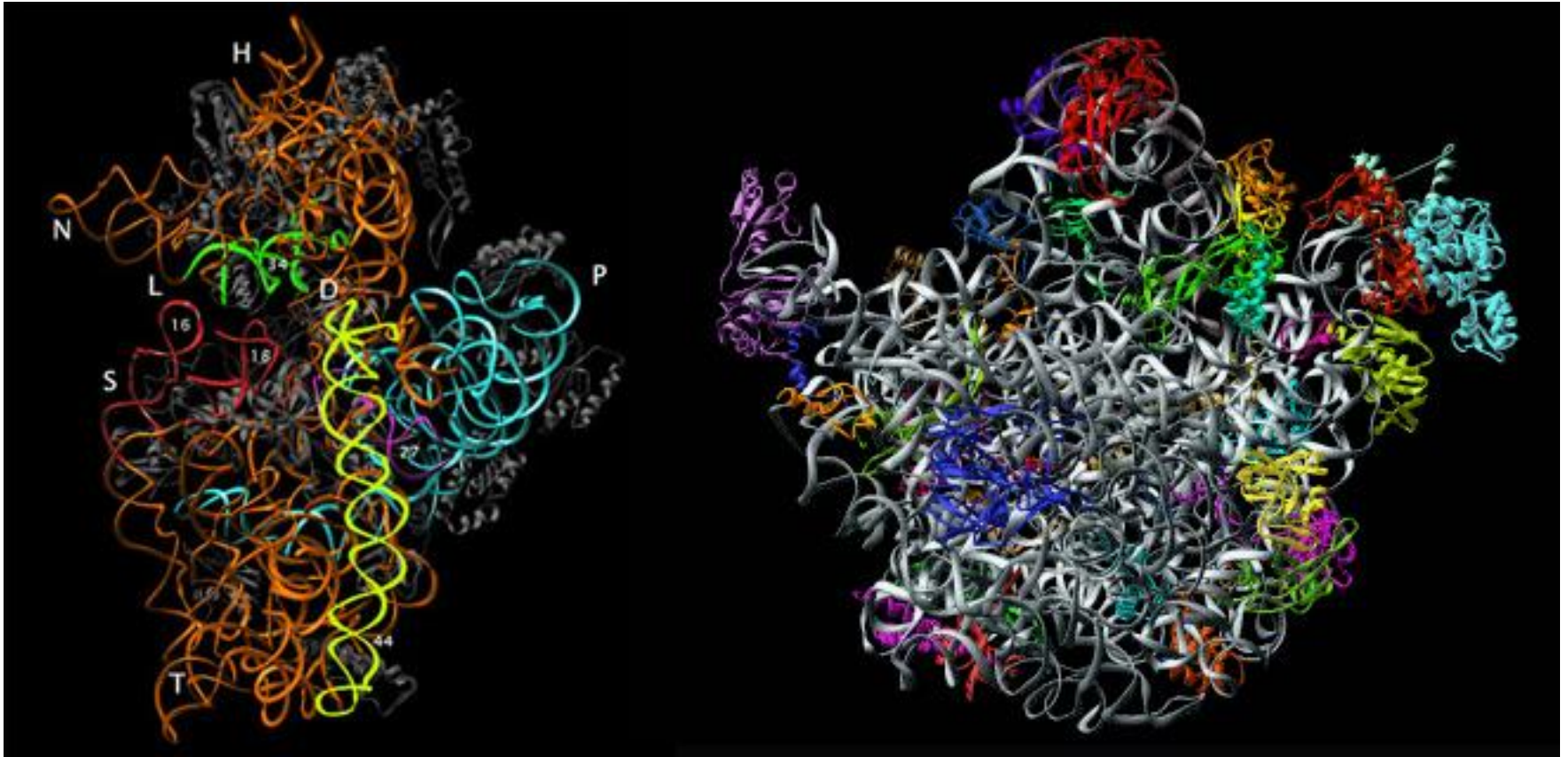
# Proteinbiosynthese

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen beladen die tRNA in einer 2Schrittreaktion



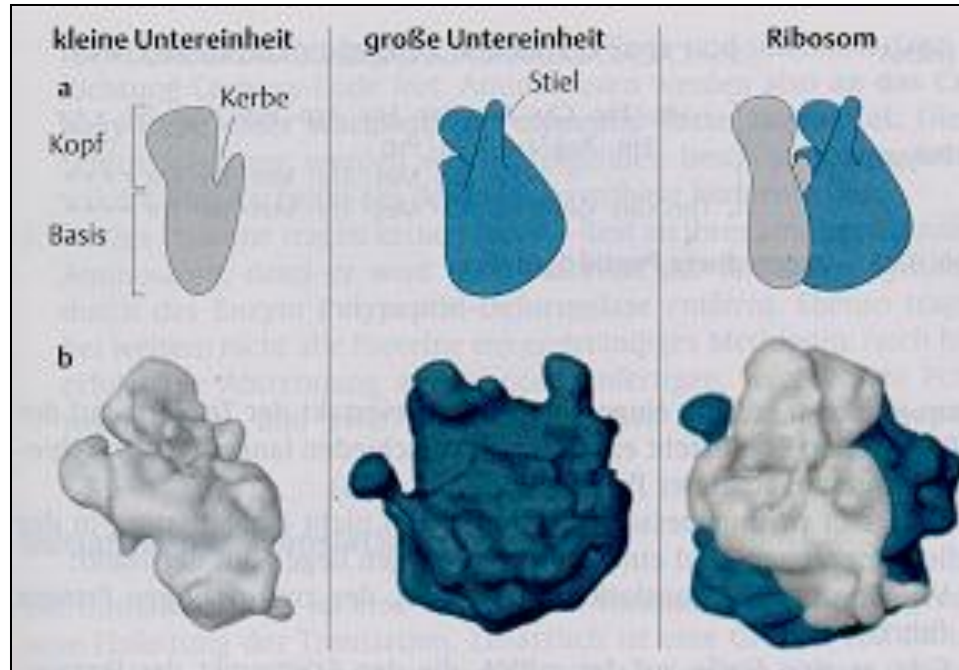
# Proteinbiosynthese

## Tertiärstruktur von Ribosomen aus *E. coli*



# Proteinbiosynthese

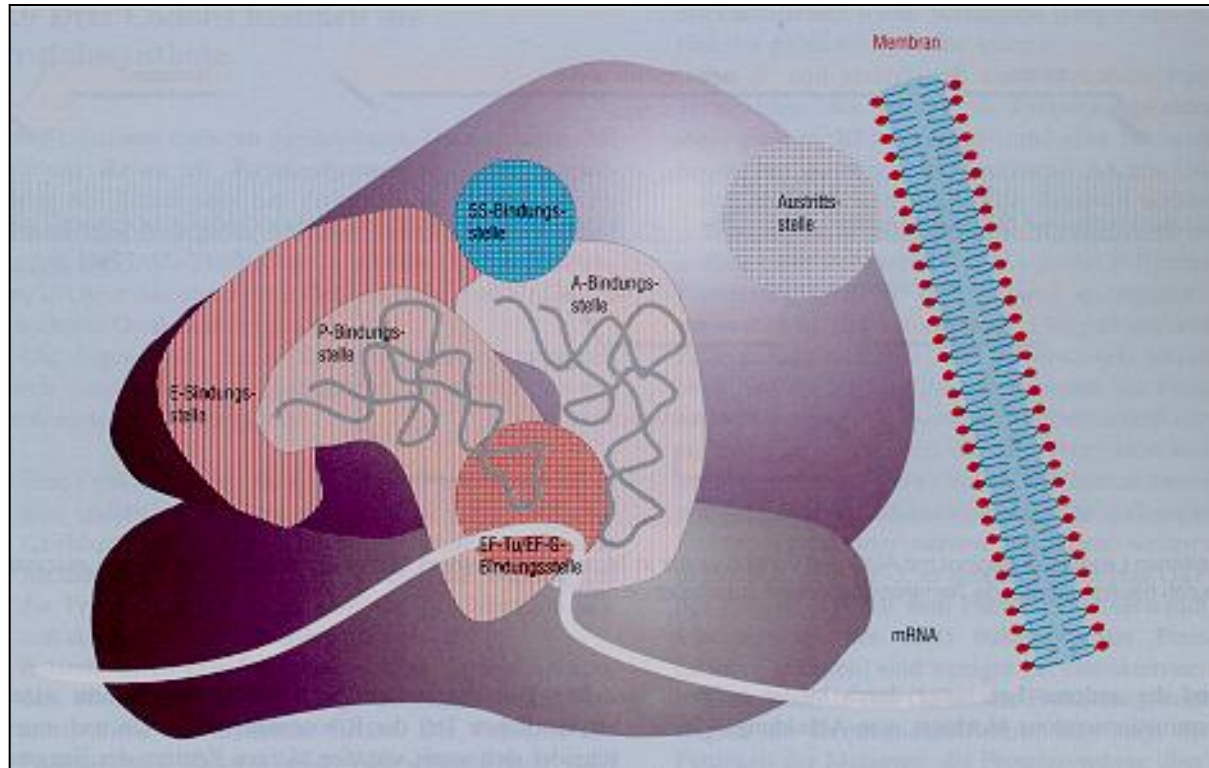
## Räumliche Darstellung von Ribosomen



# Proteinbiosynthese

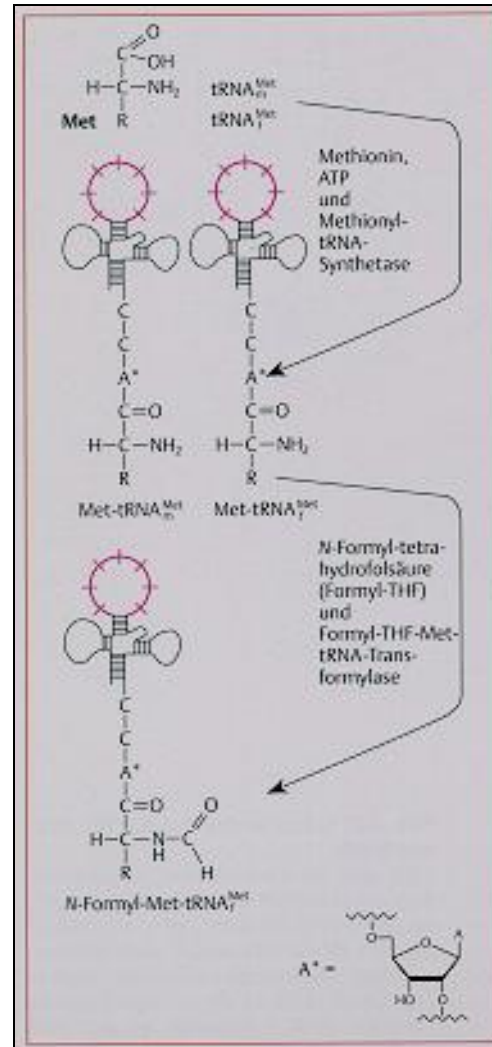
Ribosomen enthalten mehrere aktive Zentren, an deren Bildung rRNAs sowie verschiedene ribosomale Proteine beteiligt sind.

mRNA zwischen den UE, 3 Bindestellen für tRNAs, Peptidsynthesezentrum, 1 Peptidkanal,



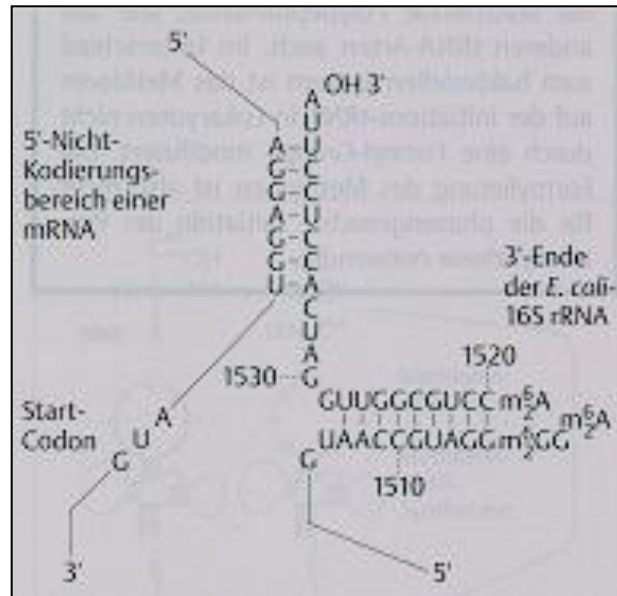
# Proteinbiosynthese

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

Eine spezifische Ribosomenbindestelle sorgt bei Prokaryoten für die genaue Bindung der mRNA an die kleine Untereinheit des Ribosoms  
(Shine Dalgarno Sequenz)



Bei Eukaryoten sorgt „Kozak“-Sequenz für effiziente Translation  
**CCRCCAUGG** (R – A oder G)



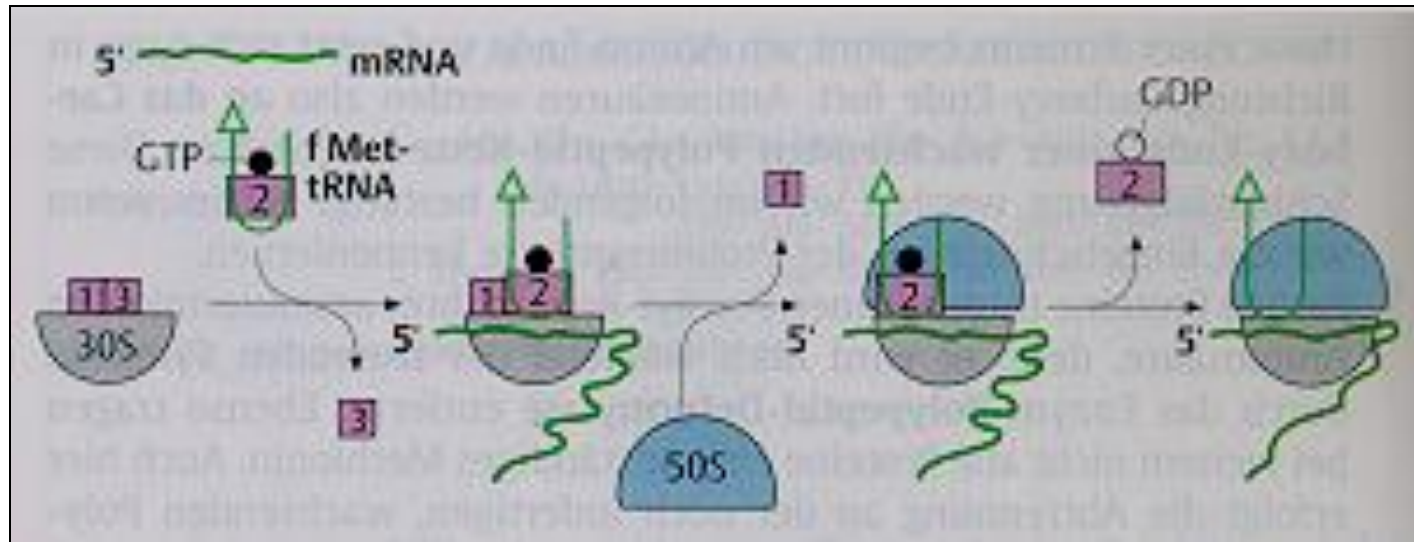
# Proteinbiosynthese

## Schema der Initiation bei Prokaryoten

IF1 – aktiviert IF2 und IF3 und trennt die Ribosomenuntereinheiten

IF2 – bindet im Komplex mit GTP die Initiator-tRNA

IF3 – verhindert Bindung falscher tRNAs

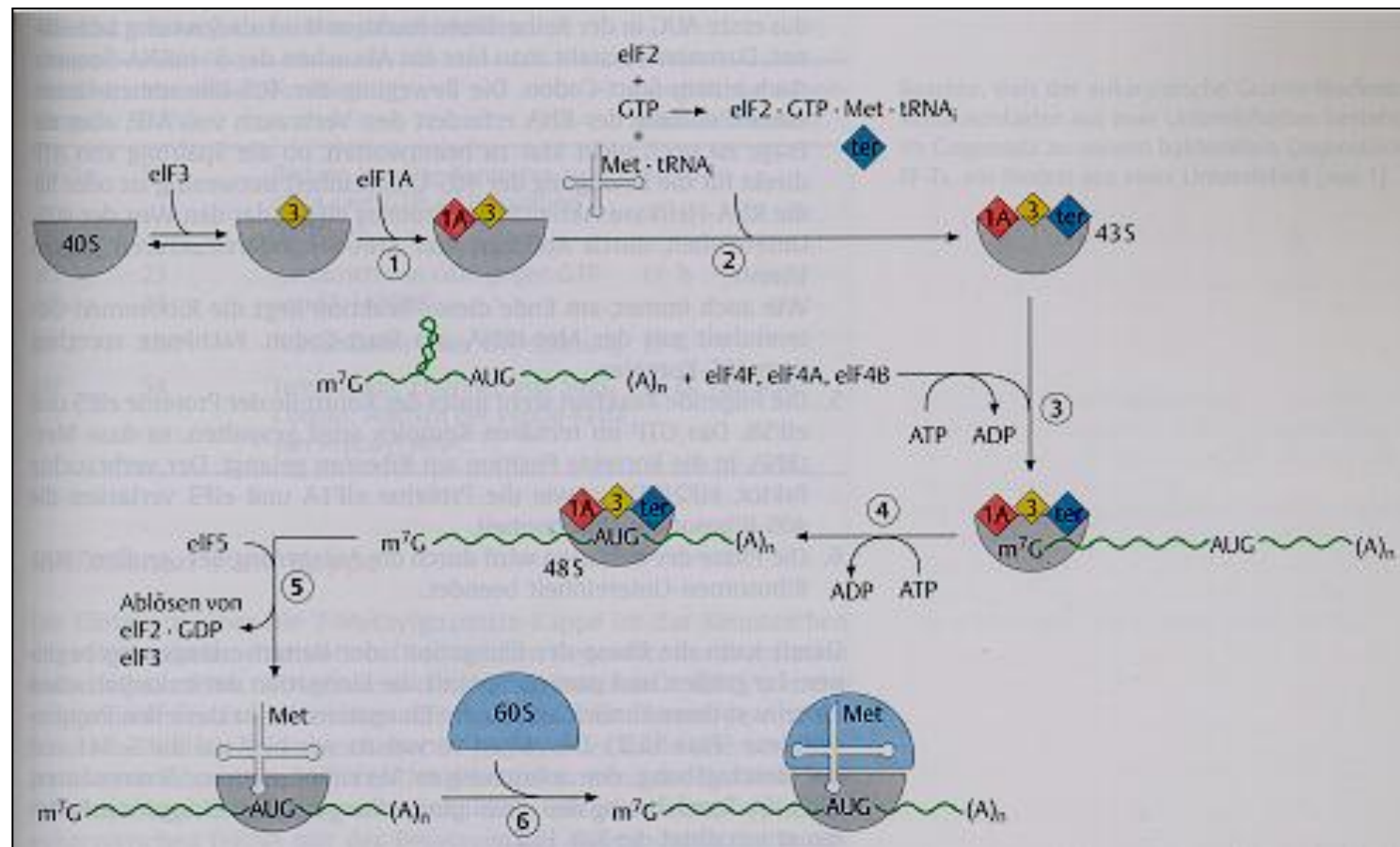


# Proteinbiosynthese

## Schema der Initiation bei Eukaryoten

eIF4F bindet cap-Struktur, enthält Helicase (a), cap-Bindeprotein (E) und Aktivierungsproteine (B, G)

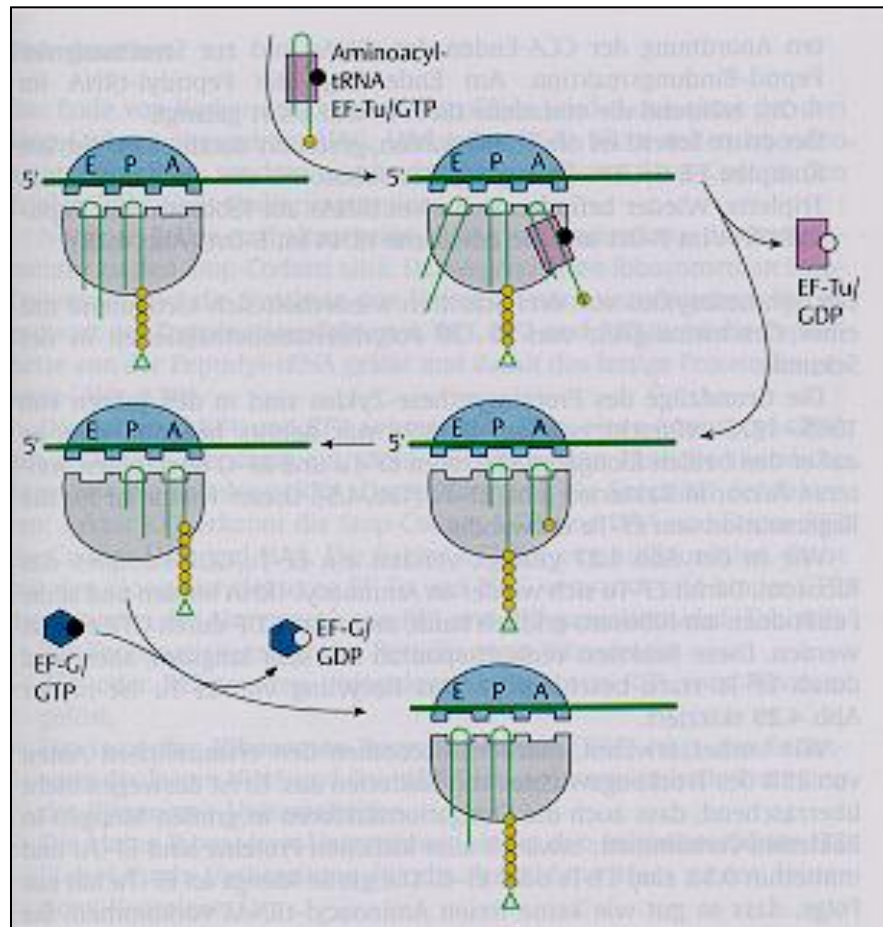
eIF5 – stimuliert GTP-Spaltung und Bindung der großen Untereinheit





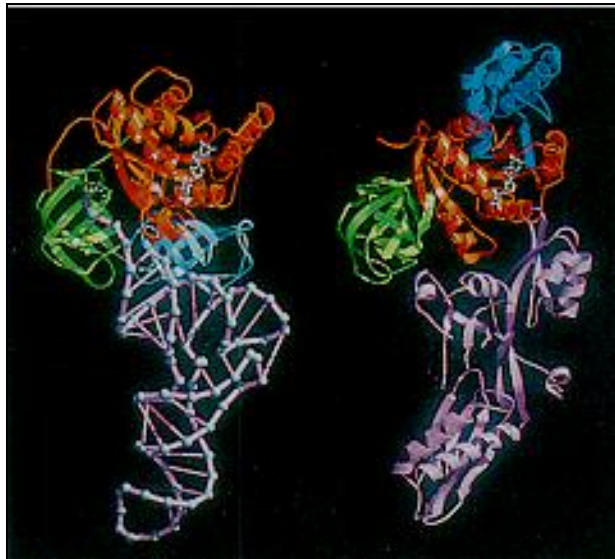
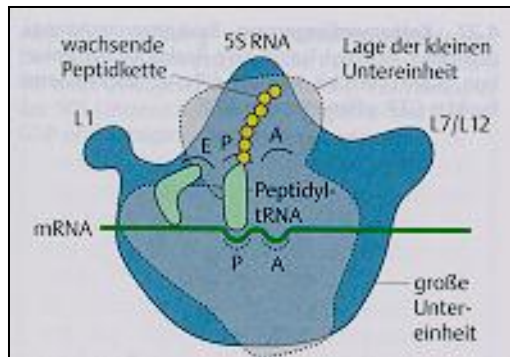
# Proteinbiosynthese

Schema der Elongation bei Prokaryoten  
EF-Tu - bindet im Komplex mit GTP die nächste tRNA  
EF-G – GTP-abhängige Translokation



# Proteinbiosynthese

Schema der Elongation bei Prokaryoten  
EF-Tu und EF-G sind strukturell ähnlich!

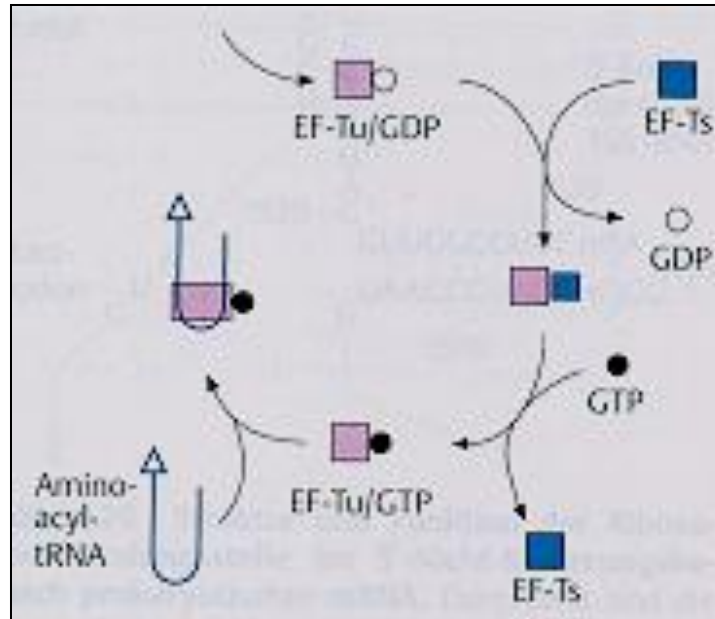


8.25 Die Struktur des ternären Komplexes Aminoacyl-tRNA • EF-Tu • GTP (links) ähnelt der Struktur von EF-G (rechte). Strukturell konservierte Domänen von EF-Tu und EF-G sind rot beziehungsweise grün hervorgehoben; die tRNA und ihr ähnlicher Bereich im Faktor EF-G sind violett dargestellt. (Aufnahme mit freundlicher Genehmigung von Poul Nissen.)



# Proteinbiosynthese

EF-Tu braucht zur erneuten Bindung von GTP einen Hilfsfaktor EF-Ts



# Proteinbiosynthese

Durch das allosterische Dreistellen-Modell wird die Genauigkeit der Proteinbiosynthese erklärt

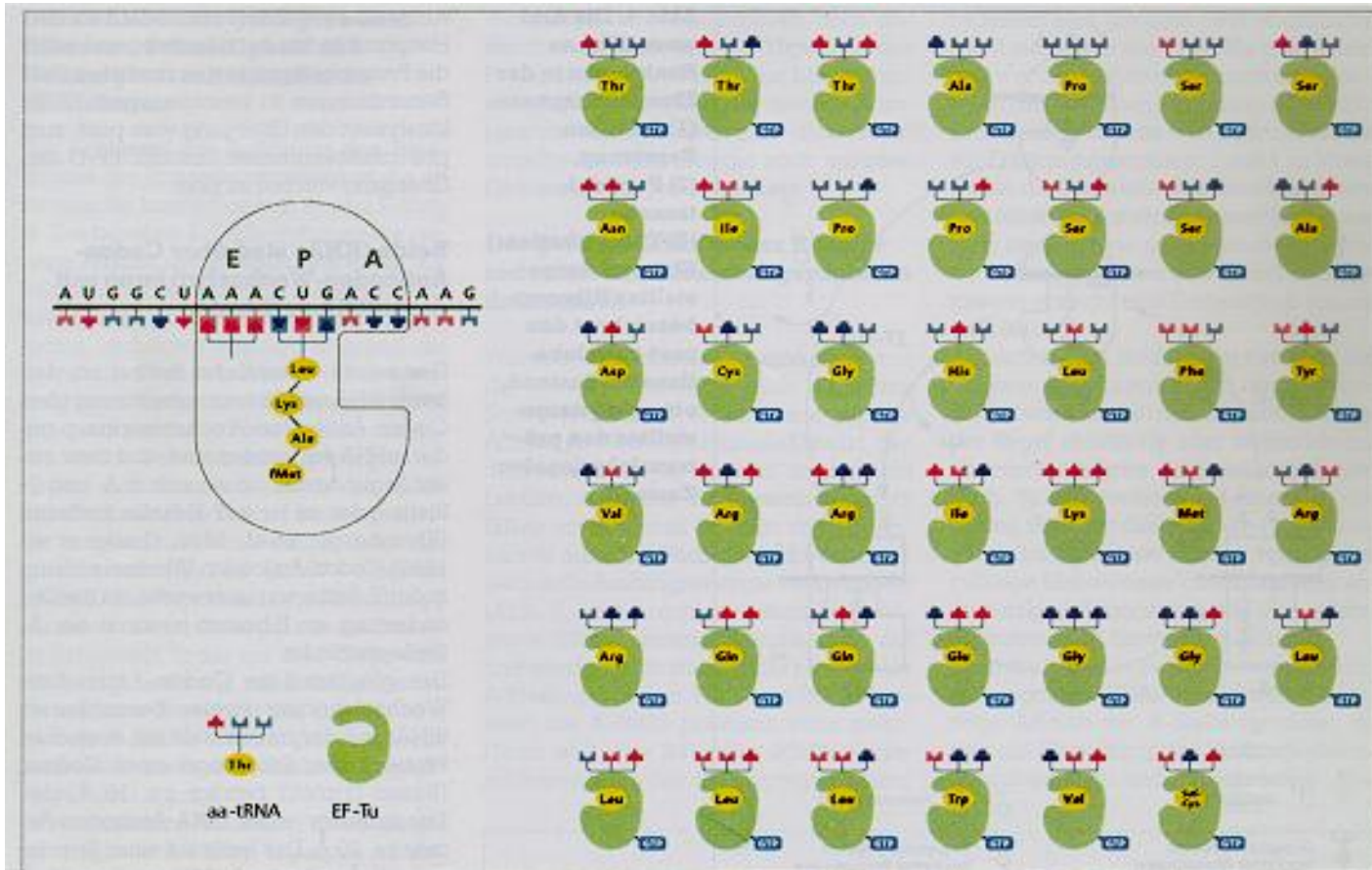
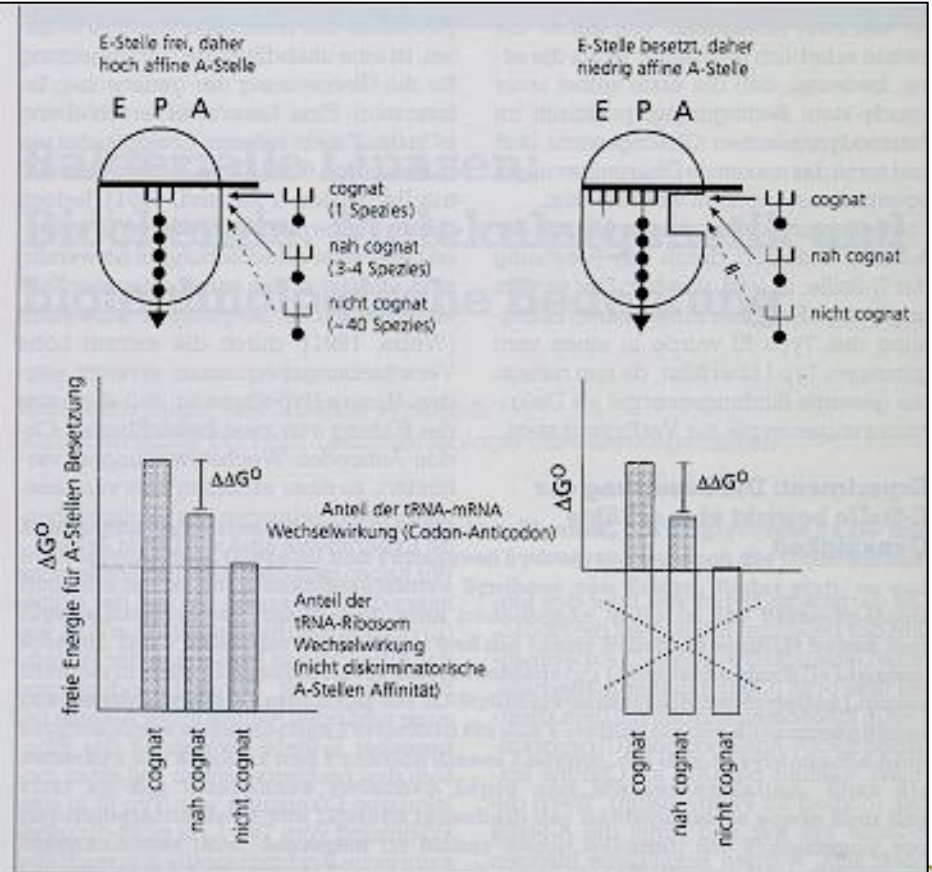
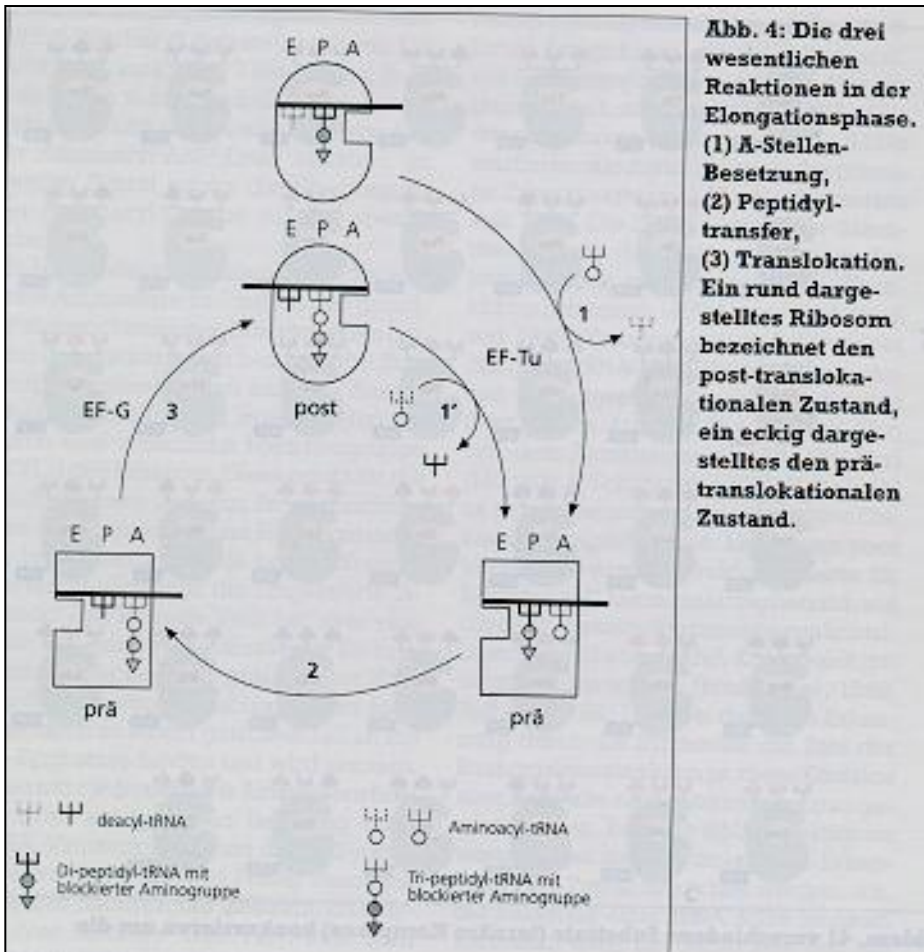


Abb. 3: Das ribosomale Erkennungsproblem. 41 verschiedene Substrate (ternäre Komplexe) konkurrieren um die ribosomale A-Stelle.

# Proteinbiosynthese

Das allosterische Dreistellen-Modell nimmt 2 allost. Zustände am Ribosom an. Dadurch wird die geringe Affinität bei der tRNA-Bindung (E- und P-Stelle besetzt) erklärt, die zur Selektion der richtigen tRNA beiträgt.

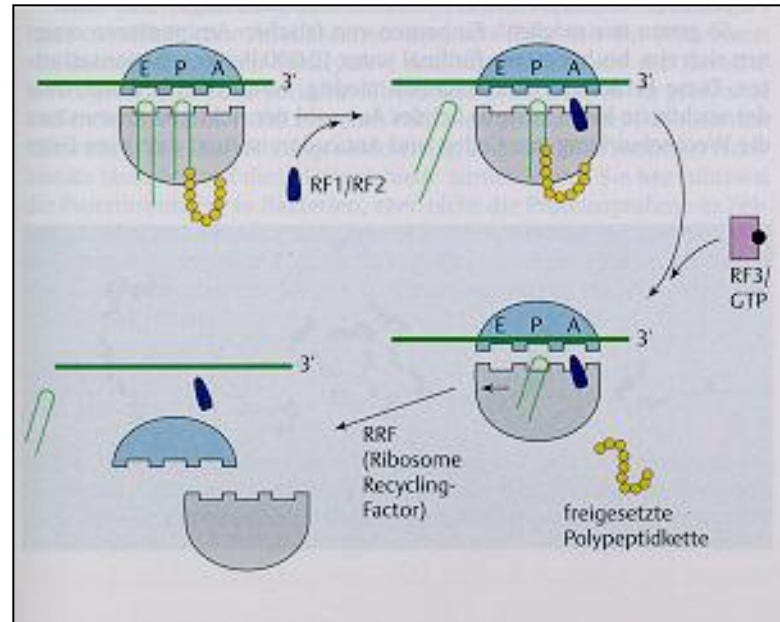


**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Effektes der Allosterie.** Die allosterische Reduktion der A-Stellen-Affinität bei besetzter E-Stelle um die nicht-diskriminierenden Anteile erklärt, wie das Ribosom Schnelligkeit und Genauigkeit vereinbart (Erläuterung siehe Text).

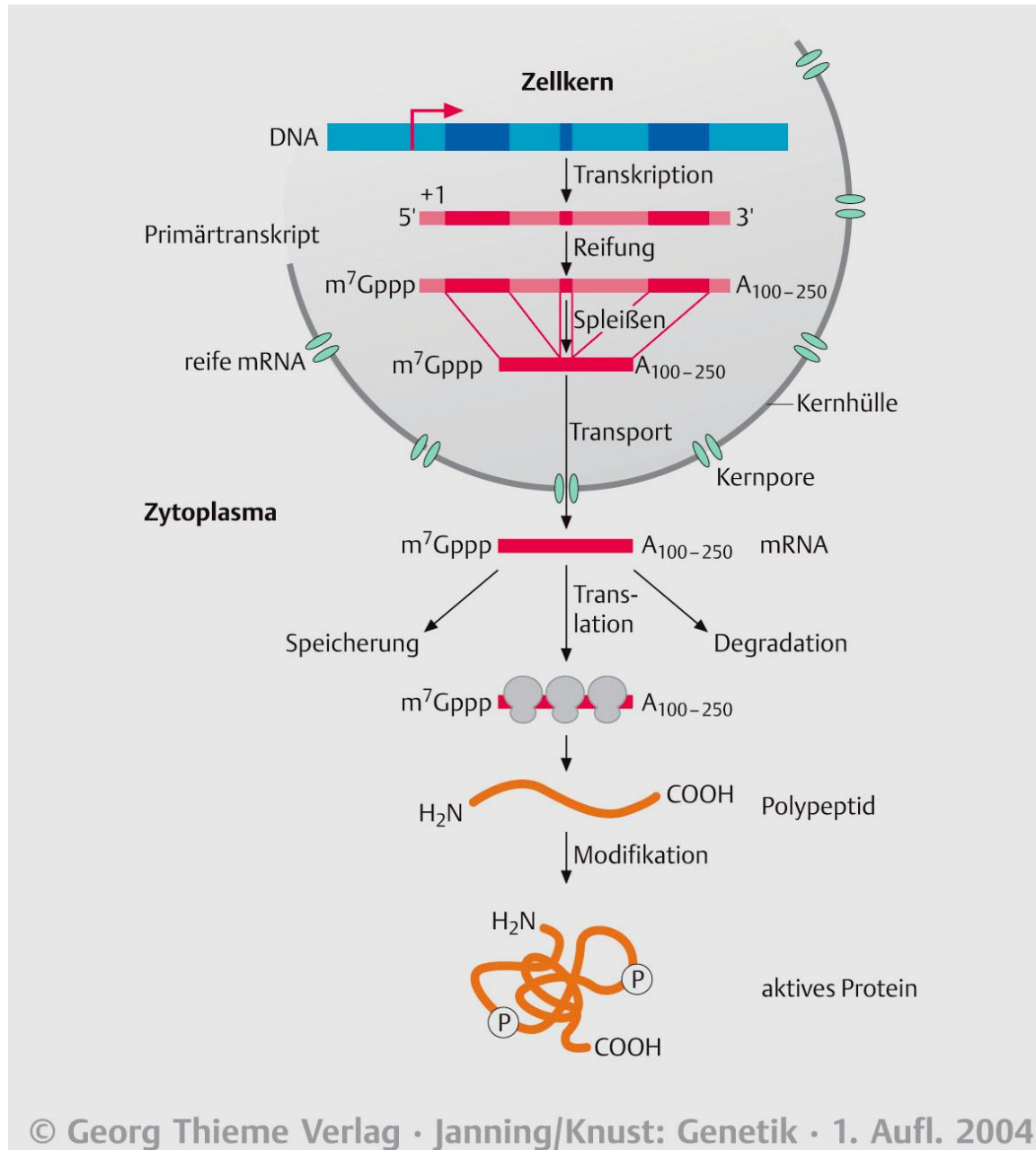
# Proteinbiosynthese

## Schema der Termination bei Prokaryoten

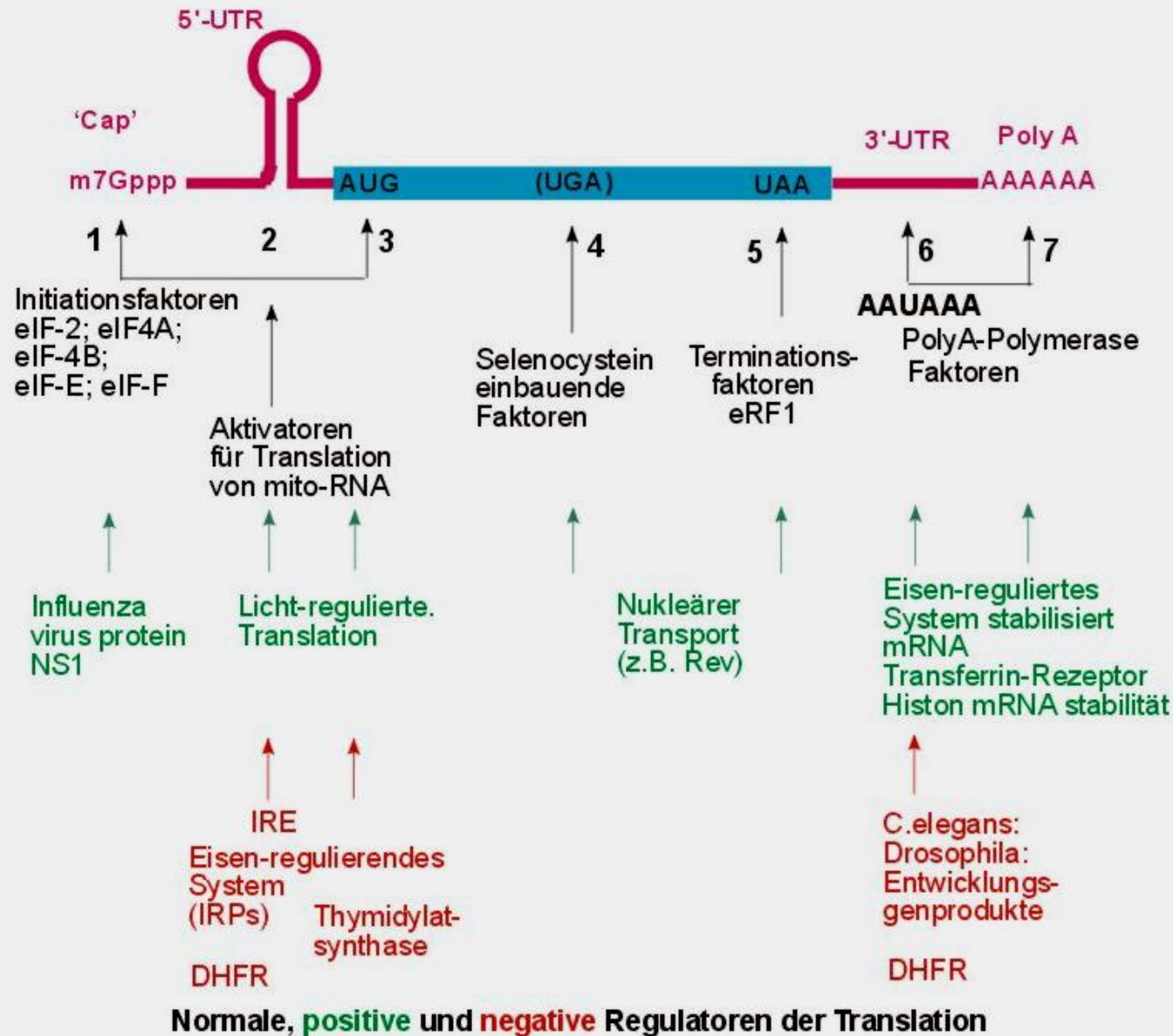
Verharren am Stoppcodon führt zur Bindung von „release factors“



# Ebenen der Genregulation bei Eukaryoten



# Posttranskriptions-Kontrolle der Expression in Eukaryoten



# Regulation der Proteinbiosynthese

„Codon usage“ bestimmt Translationsgeschwindigkeit

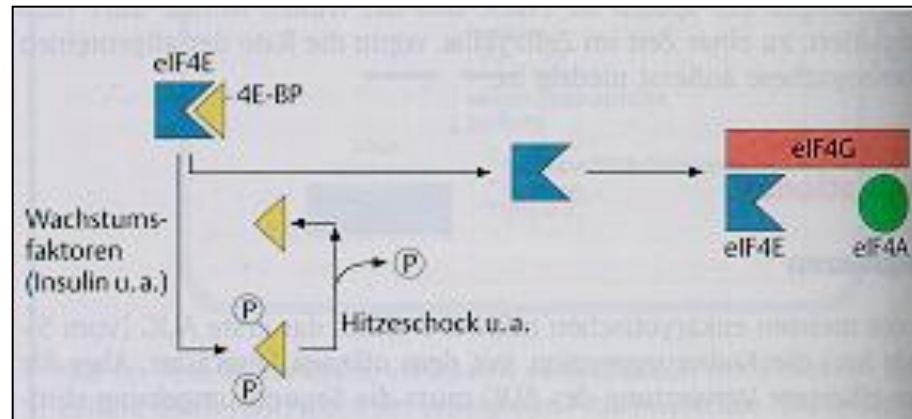
Aminosäure	Codons	sehr hoch	hoch	mittel	niedrig
Leu	UUA	0,11	0,17	0,39	0,74
	UUG	0,11	0,36	0,55	0,79
	CUU	0,22	0,33	0,49	0,54
	CUC	0,20	0,45	0,57	0,64
	CUA*	0,04	0,07	0,11	0,18
	CUG	5,33	4,62	3,89	3,12
Ile	AUU	0,47	0,96	1,14	1,64
	AUC	2,53	2,03	1,78	1,24
	AUA*	0,01	0,01	0,08	0,12
Ser	UCU	2,57	1,75	1,32	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



# Regulation der Proteinbiosynthese

## Regulation an der Kappe

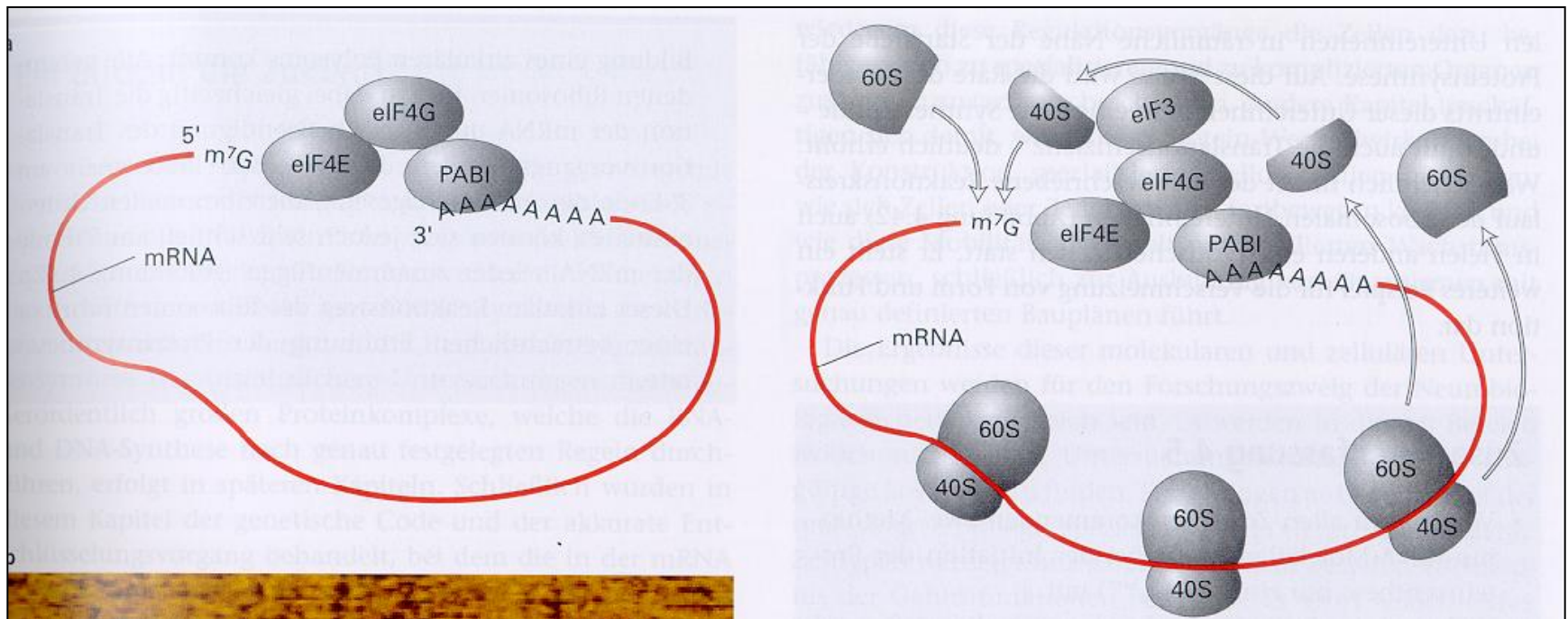
eIF4E-Bindeproteine regulieren cap-Bindeaktivität durch Phosphorylierung, die zur Freisetzung von eIF-4E und Translationsaktivierung führt  
eIF4G – durch Phosphorylierung oder Proteolyse reguliert



# Regulation der Proteinbiosynthese

## Regulation an der Kappe

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

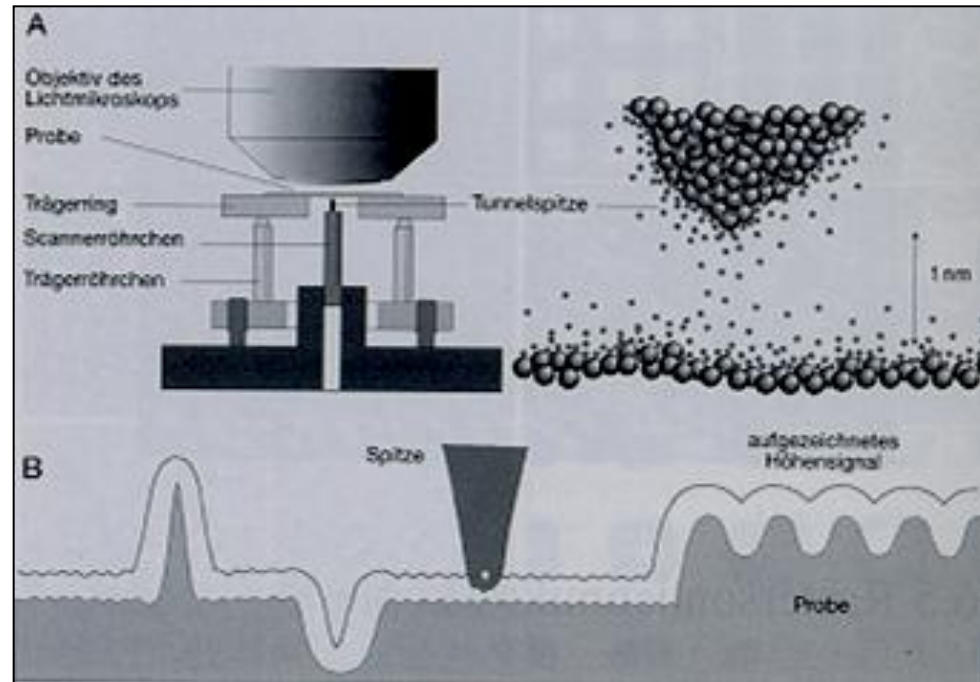
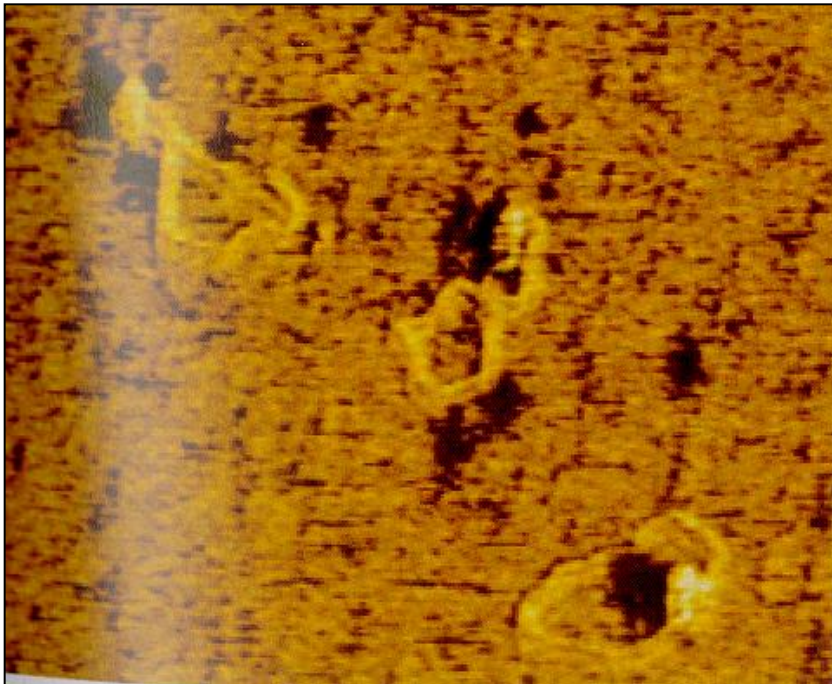


# Regulation der Proteinbiosynthese

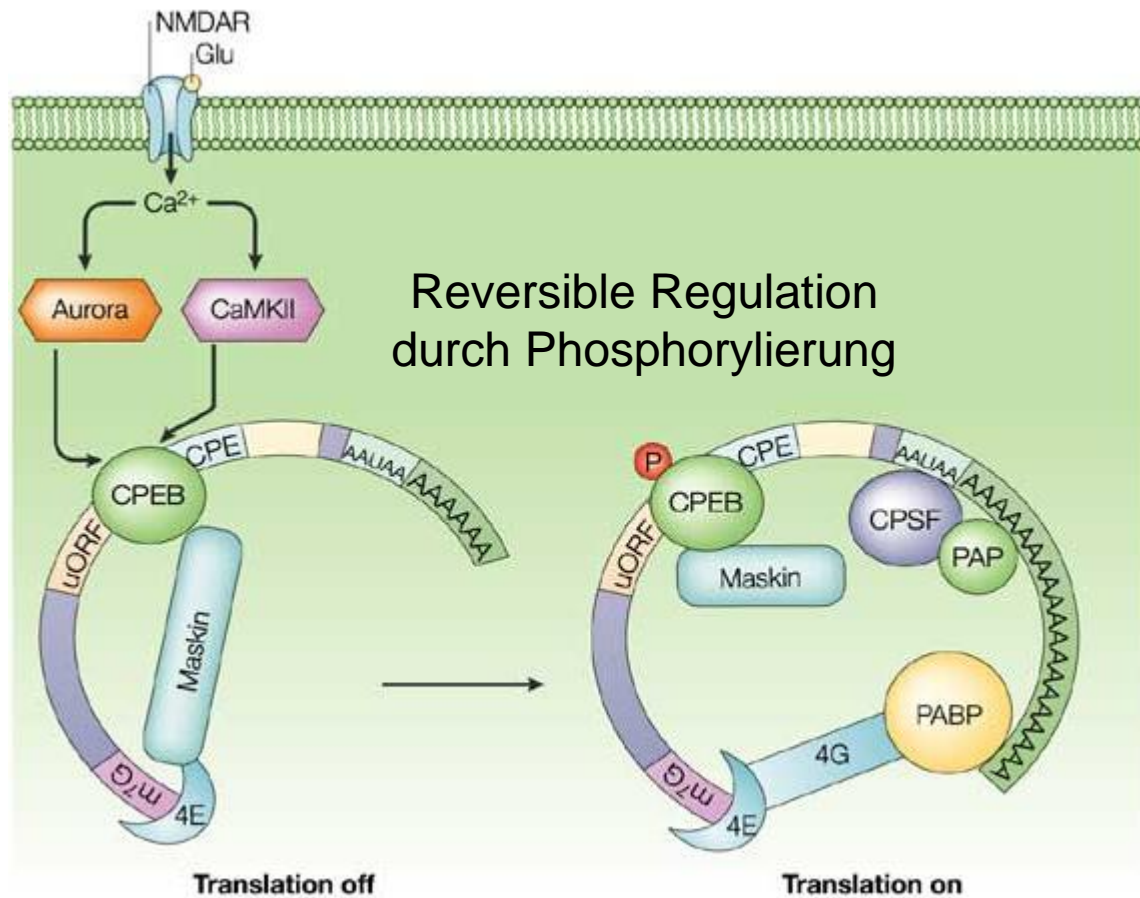
## Regulation an der Kappe

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

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



Hemmung  
der Translation



## Reversible Regulation durch Phosphorylierung

Freigegebene  
Translation nach  
weiterer Poly-  
Adenylierung

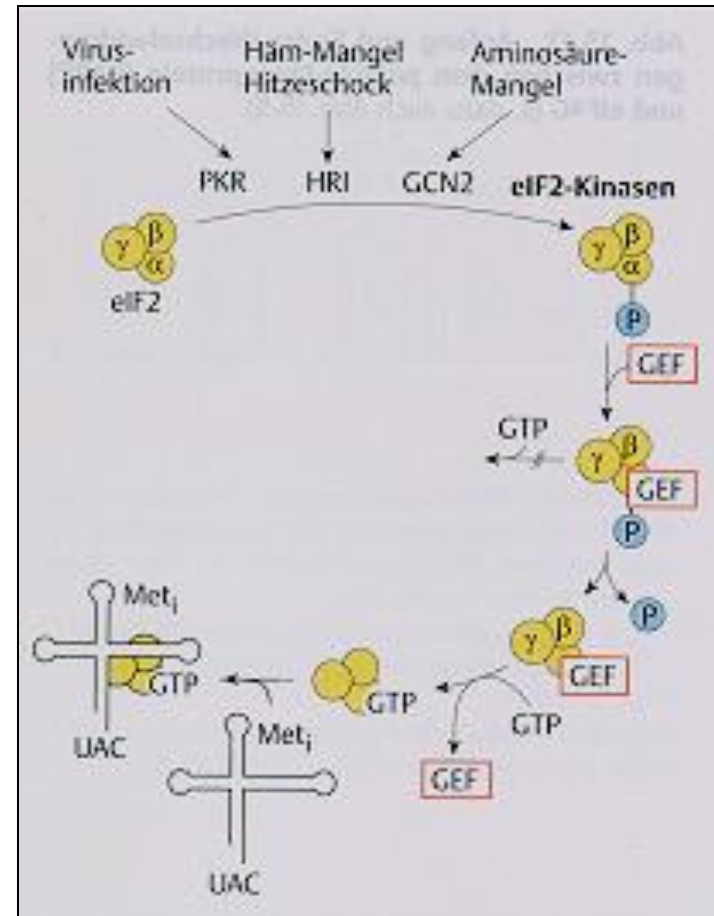
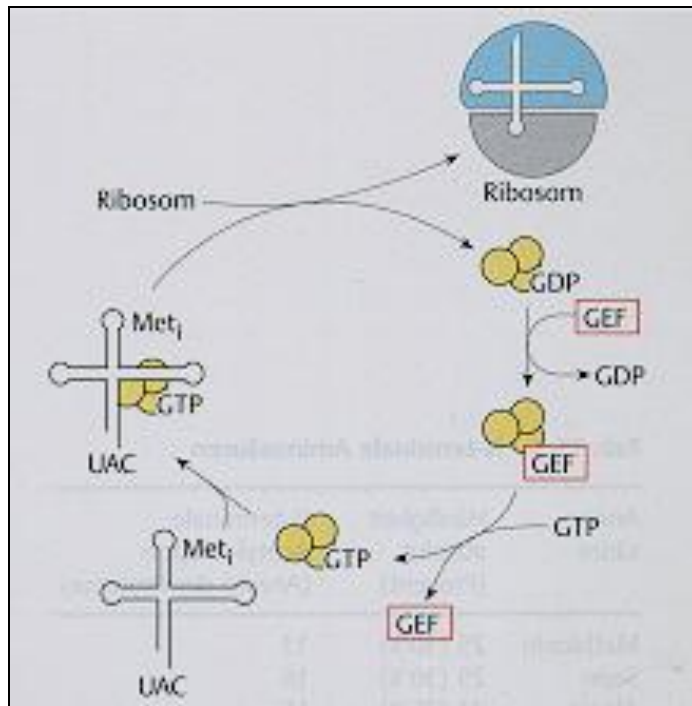
Nature Reviews | Neuroscience

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.

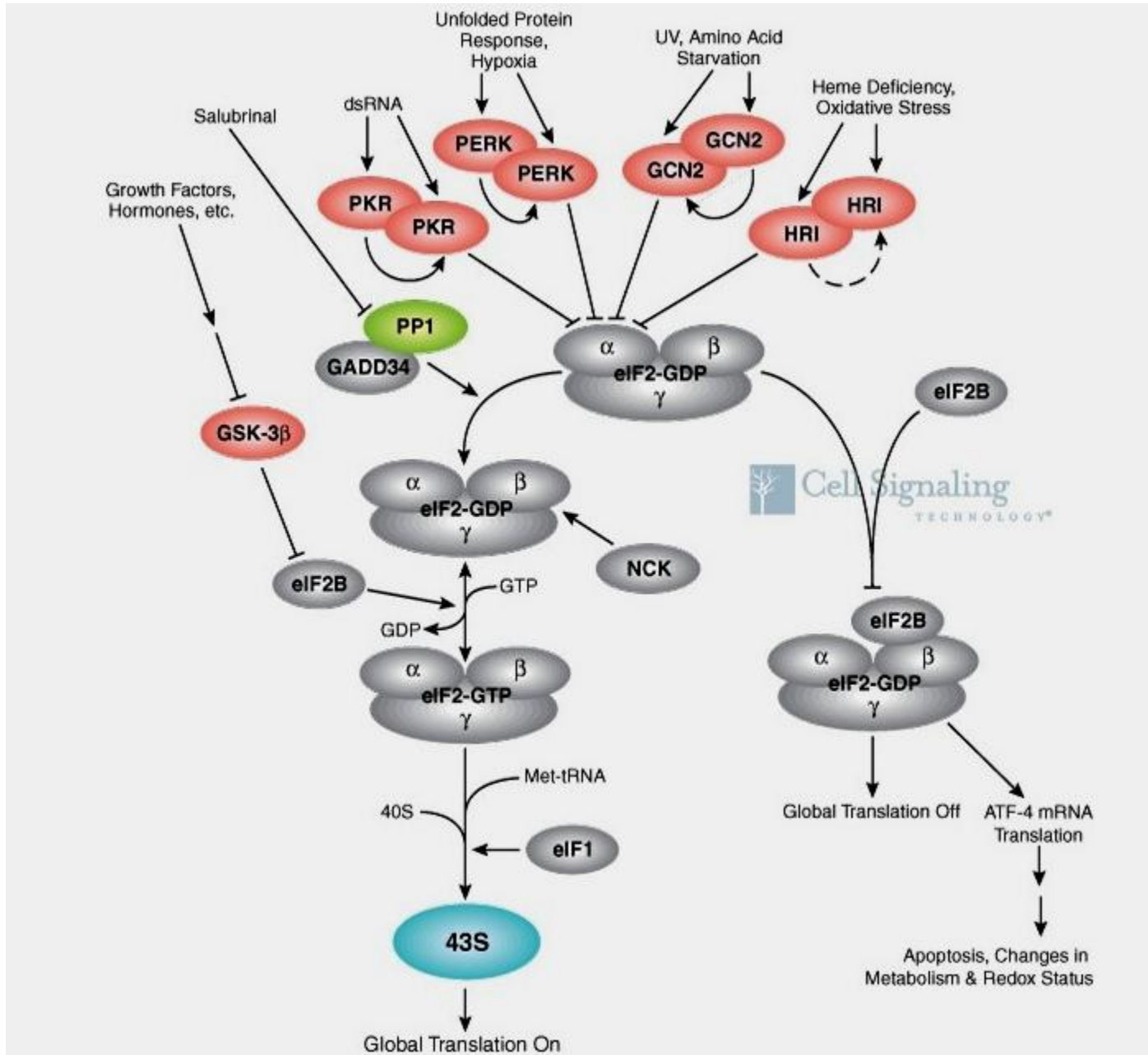
# Regulation der Proteinbiosynthese

## Regulation über das Protein eIF2

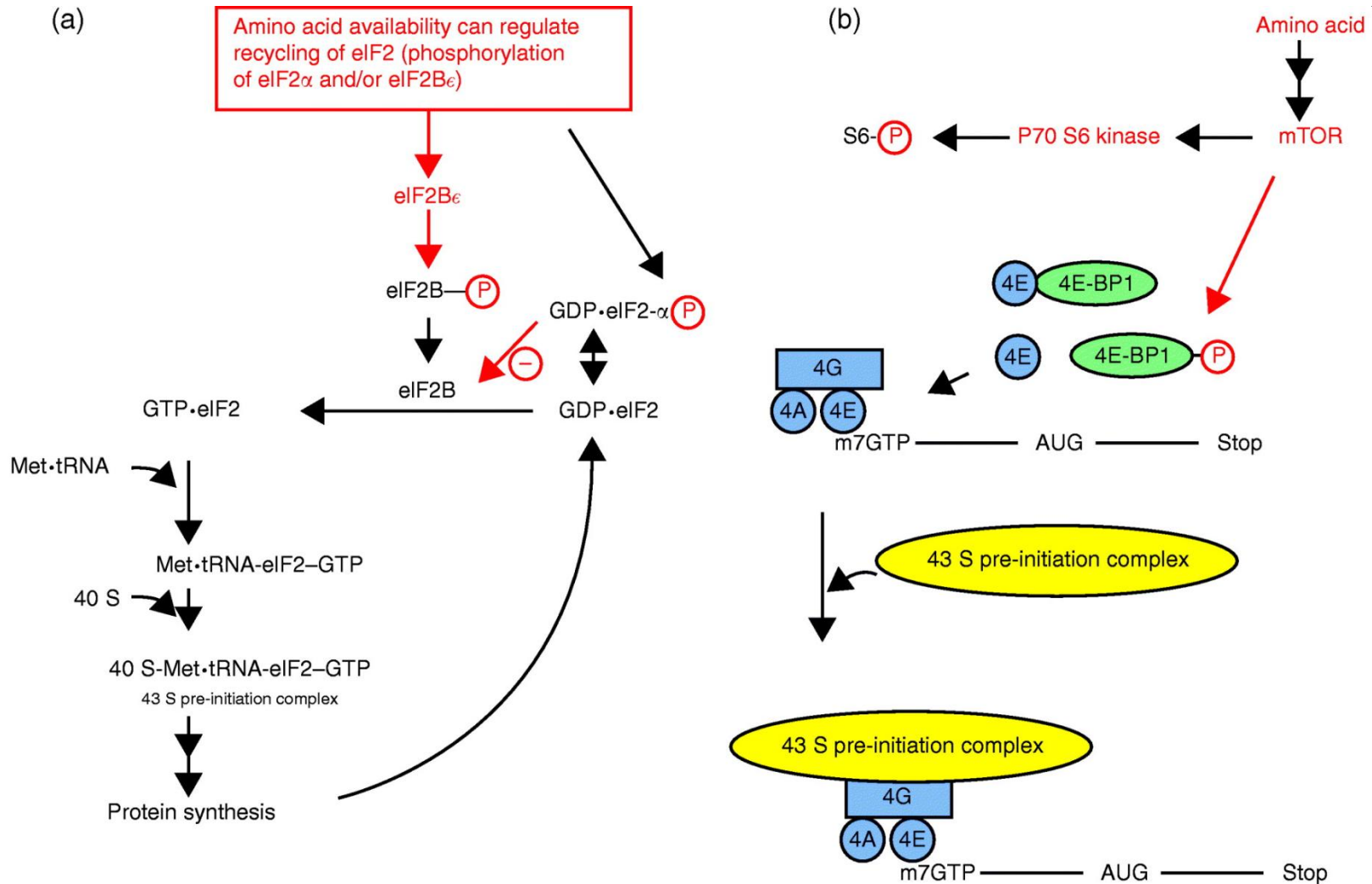
Proteinkinasen schalten Translation ab, da GEF (eIF2B) stabil an eIF2 gebunden bleibt und GDP/GTP-Austausch unterbleibt!



# Sehr viele Faktoren hemmen die Translation über eIF2!



# Positive und negative Regulation der Translation Spezifität?

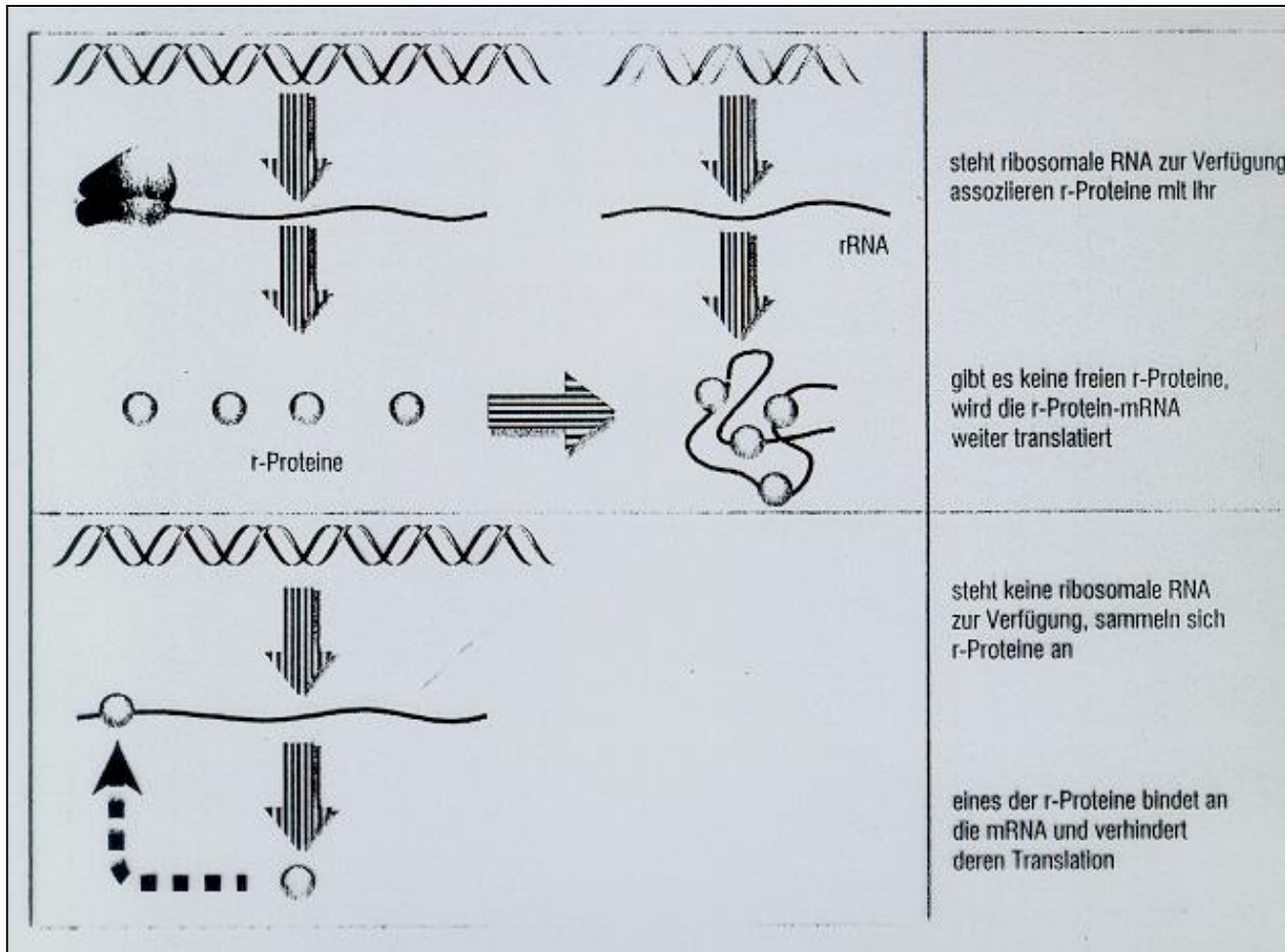


# Regulation der Proteinbiosynthese

## Regulation spezifischer mRNAs

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

Bindung des 3'UTR durch si/mi RNAs



# Zusammenfassung zur Regulation der Translation

## Genspezifische Mechanismen:

**Stabilität der mRNA (RNA-Sequenzelemente, kleine RNAs)**

**Zugänglichkeit der mRNA für das Ribosom (Bindung von Protein, kleine RNAs)**

**Codon usage**

## Globale Mechanismen:

**Phosphorylierung vom eIF4-Komplex**

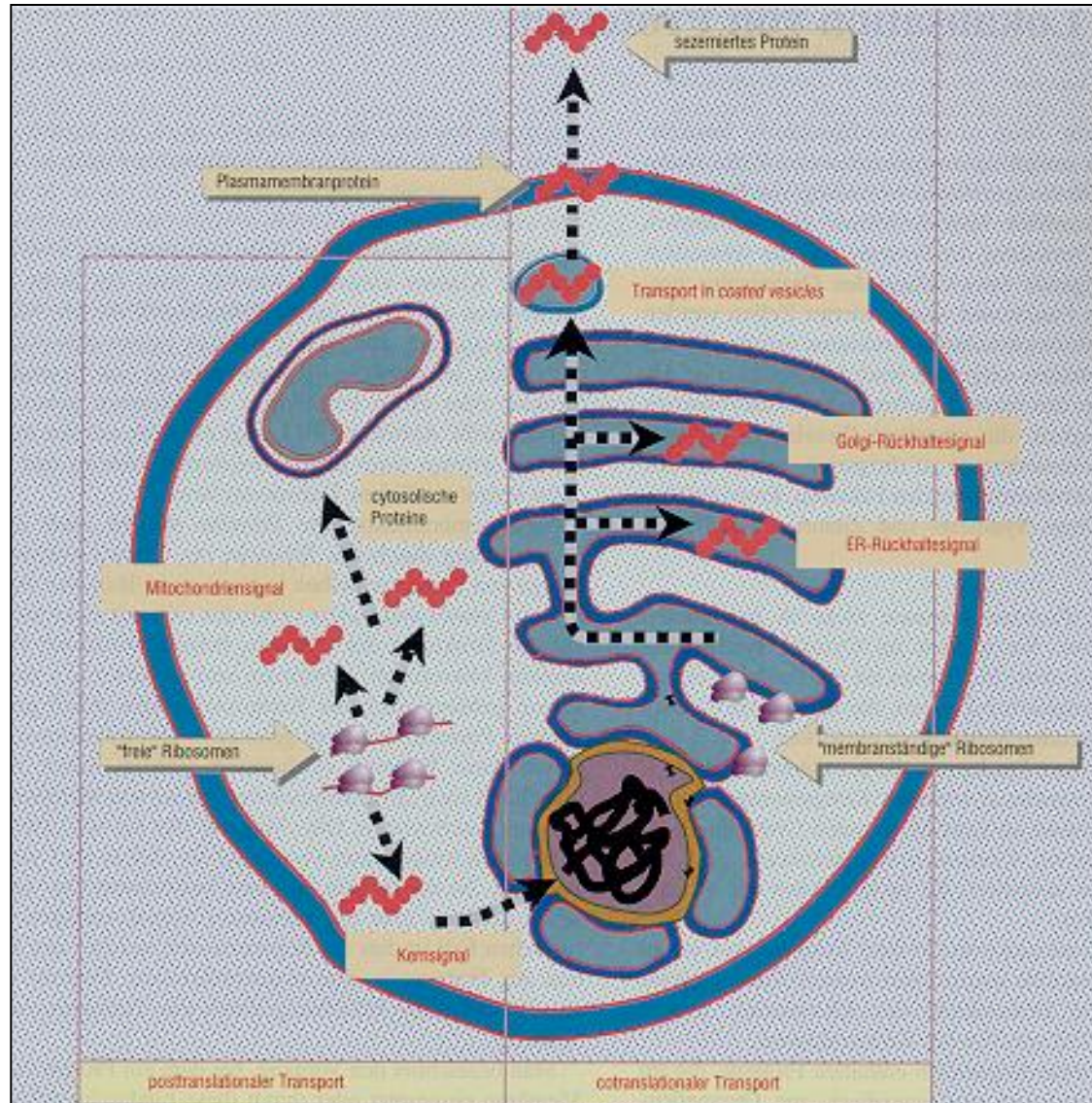
**Proteolyse des eIF4-Komplexes**

**Phosphorylierung vom eIF2-Komplex, stabile Bindung des GEF**



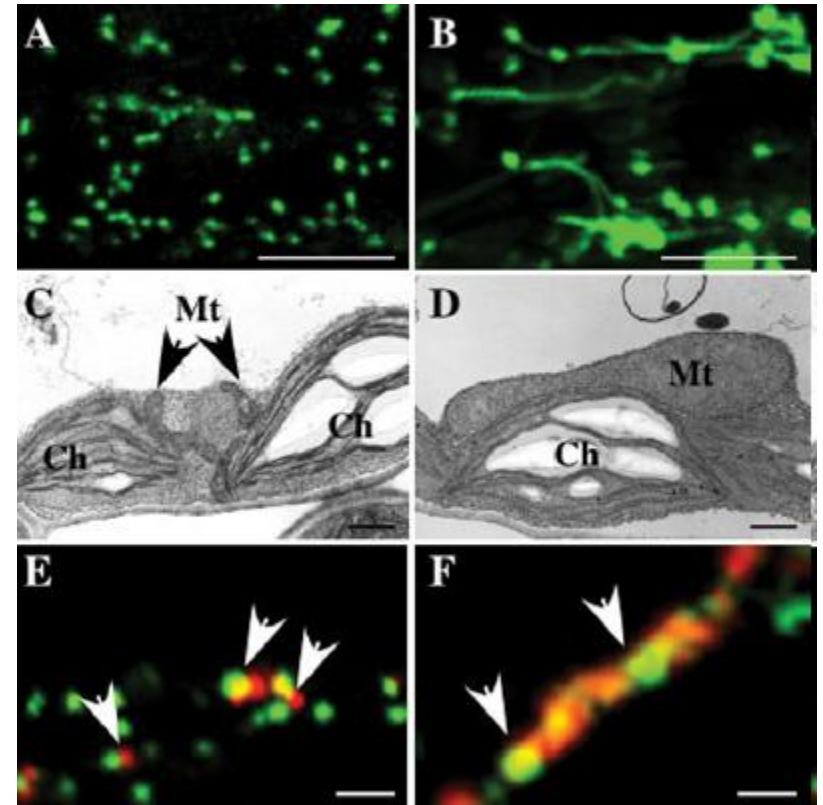
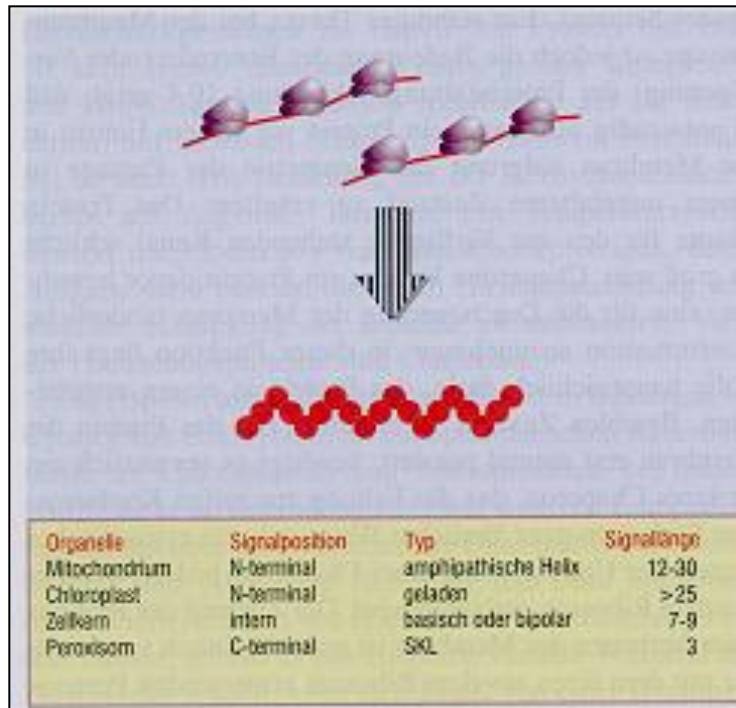
# Synthese von Proteinen für Zellkompartimente

## co- bzw. posttranslationaler Transport



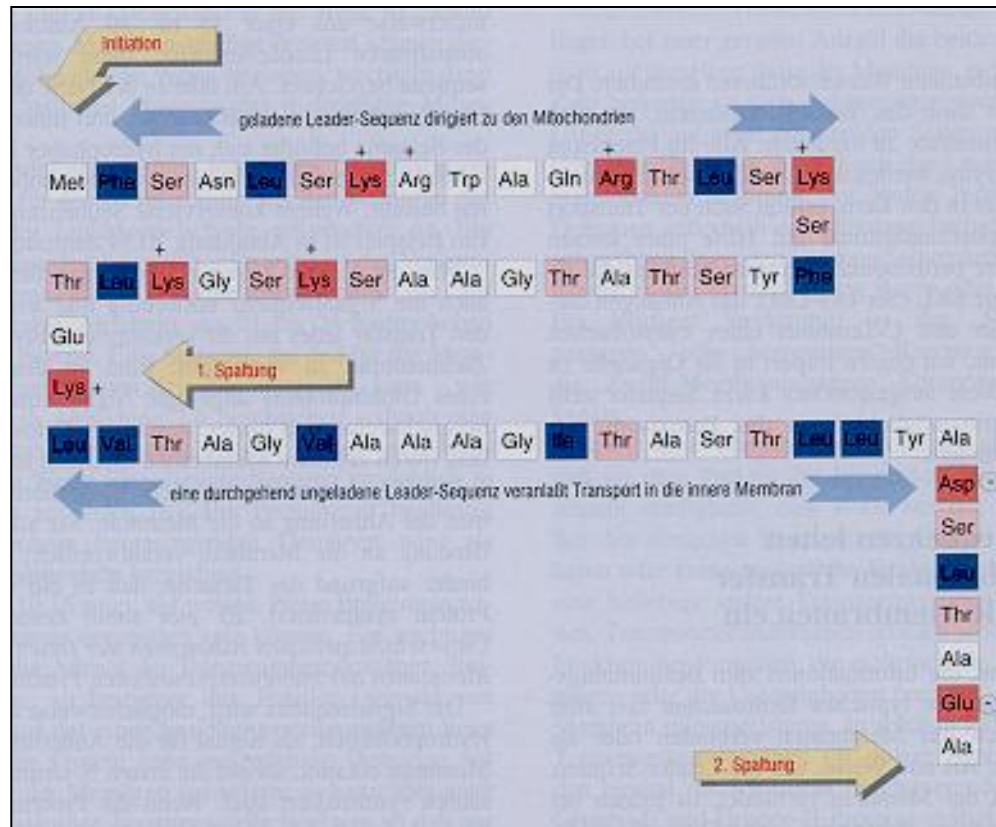
# Synthese von Proteinen für Zellkompartimente

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



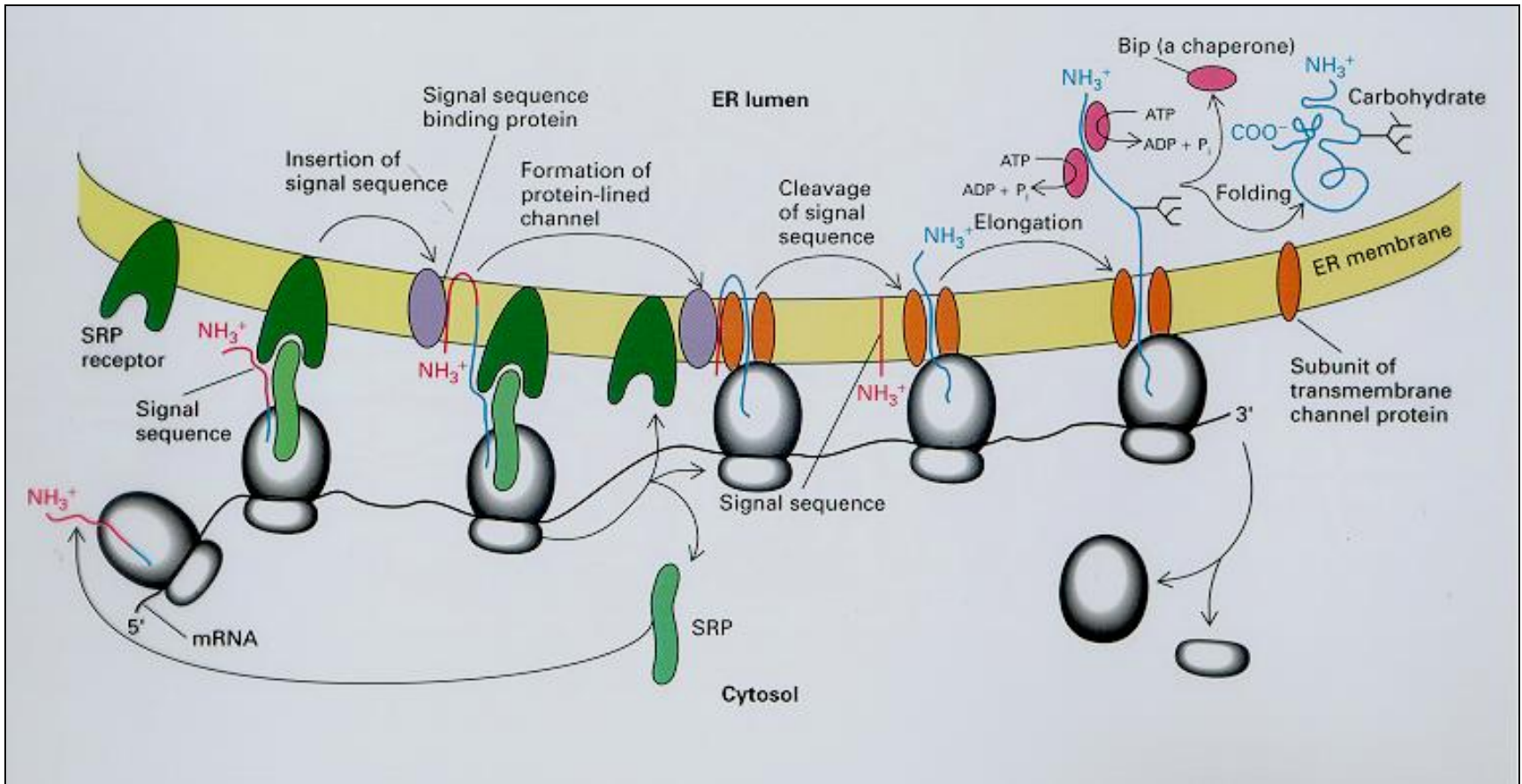
# Synthese von Proteinen für Zellkompartimente

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



# Synthese von Proteinen für Zellkompartimente

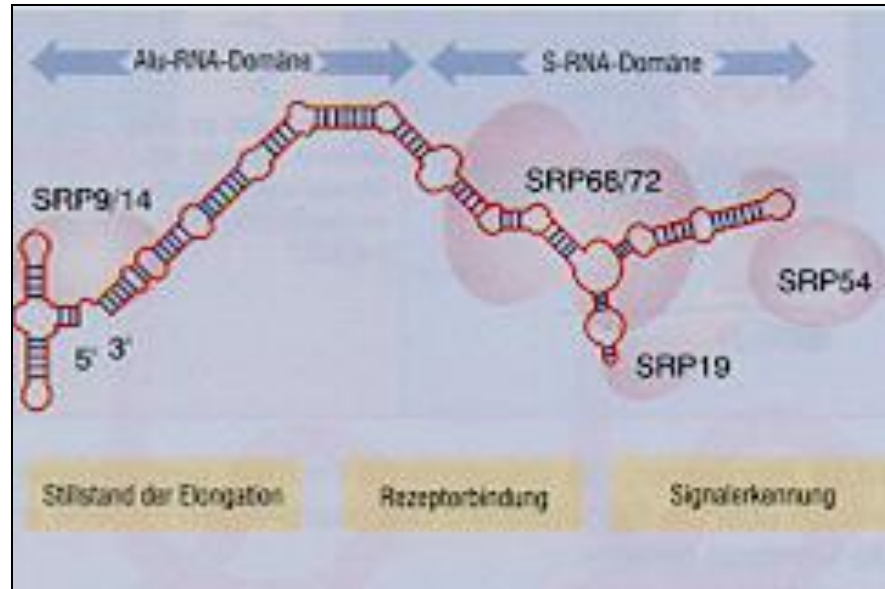
## Modell für den cotranslationalen Transport



# Synthese von Proteinen für Zellkompartimente

SRP – signal recognition particle

Ribonucleoproteinkomplex mit mehreren funktionellen Teilen



# Synthese von Proteinen für Zellkompartimente

## Modell des Translokationsapparates Sec (Tat)

