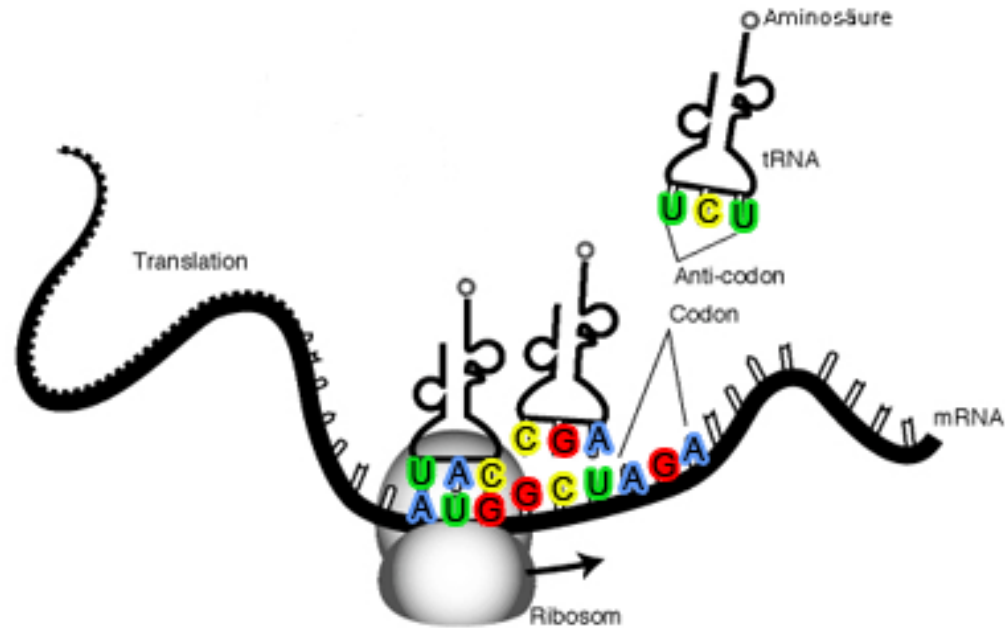


# Translation



Prof. Iris Augustin



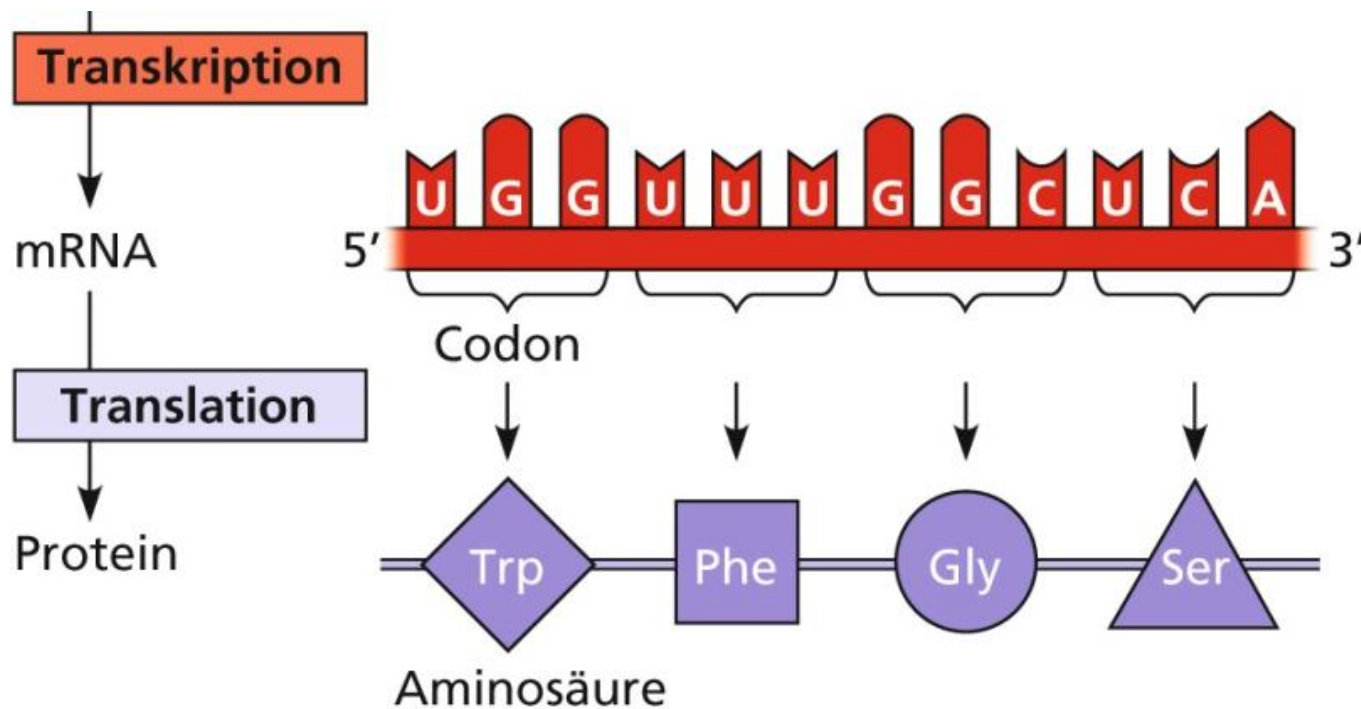
- Genetischer Code
- Ablauf der Translation



- Eigenschaften des genetischen Codes benennen können.
- Mechanismus und Komponenten der Translation beschreiben können.
- Eigenschaften und Funktion der tRNA kennen.
- Konsequenzen von Genmutationen ableiten können.
- Funktionen von Chaperonen und Abbau durch Proteasomen erklären können.

# Translation

**Translation:** Übersetzung der in der DNA gespeicherten Nukleotidabfolge in eine Peptidabfolge

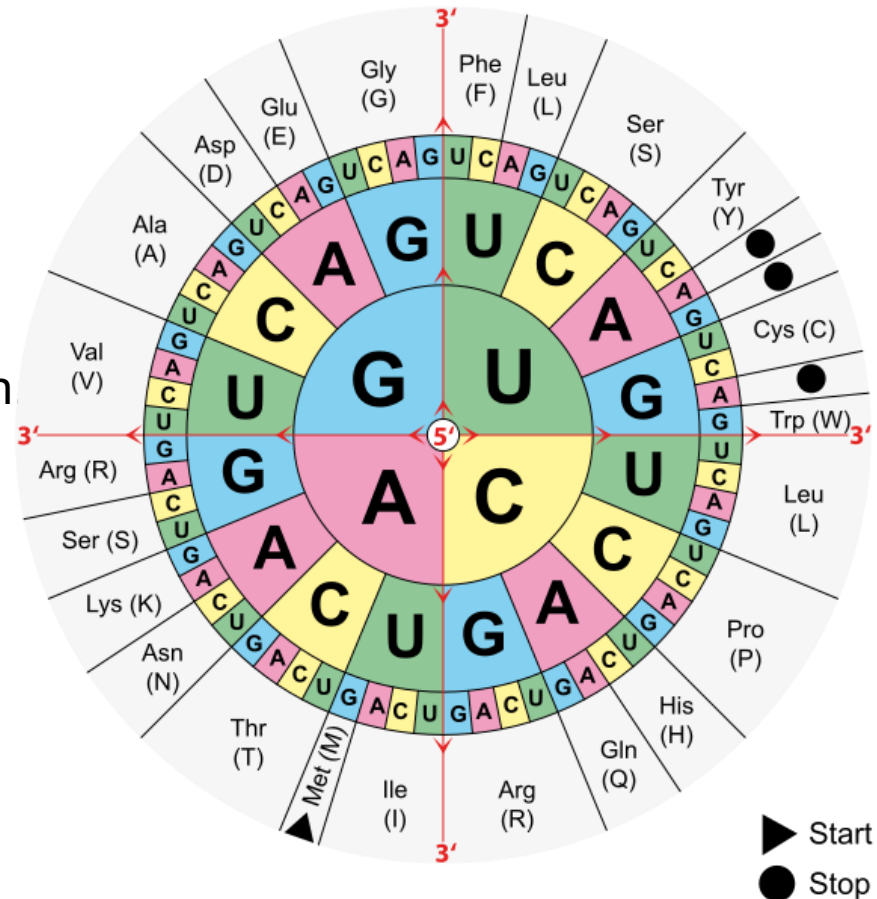


# Kennzeichen des genetischen Codes

Wie codieren 4 Nukleotidbasen 20 verschiedene Aminosäuren?

## Triplet-Code:

- **nicht überlappend**
- **spezifisch** (jedes Codon codiert nur eine Aminosäure)
- Leserichtung **5' - 3'** (**reading frame**)
- $4^3 = 64$  Triplet (61 codieren Aminosäuren  
3 Triplets codieren Stopp-Signale)
- **Start Codon (AUG)**
- **3 Stopp Codons (= Nonsense codons)**
- Nahezu **universell**
- **degeneriert** (mehr als ein Codon codiert für die gleiche Aminosäure, „wobble base“)

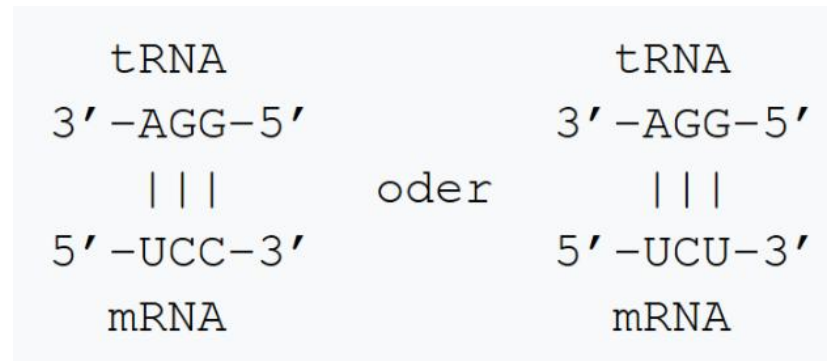


# Wobble-Hypothese

---

„**Wobbling**“: Flexibilität bei der Basenpaarung

- Beobachtung: 61 versch. Tripletts möglich, aber nur 30-41 versch. tRNAs vorhanden  
=> einige tRNAs binden an unterschiedliche Tripletts
- Tripletts für eine Aminosäure unterscheiden sich oft nur in der **3. Base** (*wobble base*)



→ Grundlage für Degeneration des genetischen Codes

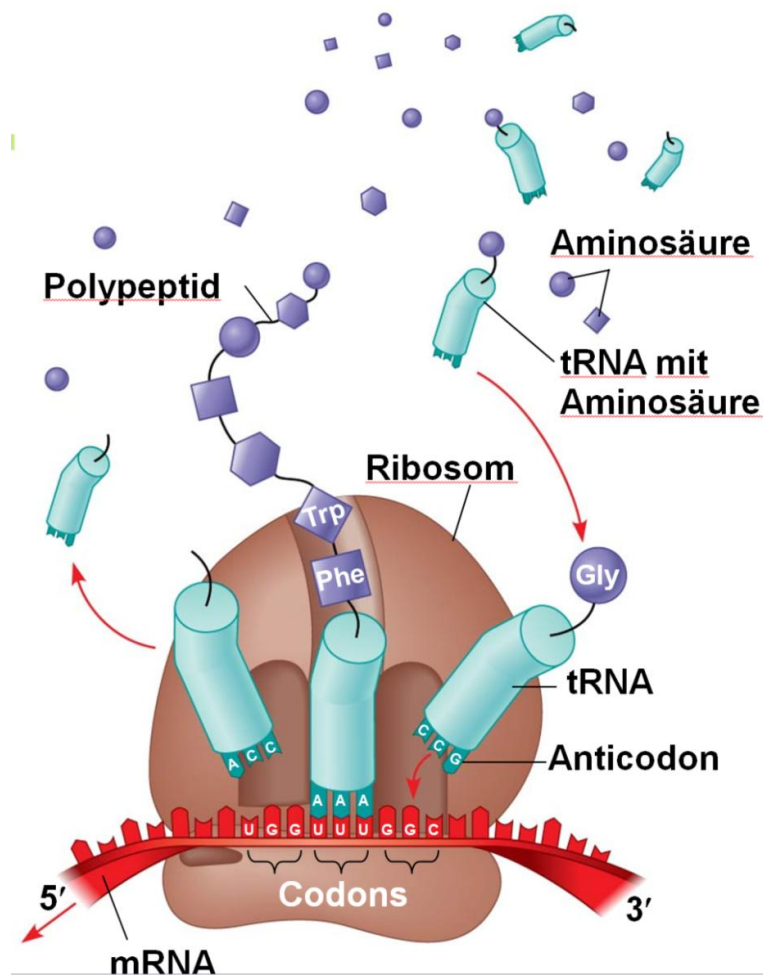
→ Kompromiss zwischen Schnelligkeit und Sicherheit bei der Translation

# Exkurs: Abweichungen des genetischen Codes

Vorkommen	Codon	Standard	Abweichung
Mitochondrien (bei allen bis jetzt untersuchten Organismen)	UGA	Stop	Tryptophan
Mitochondrien von Säugern, <i>Drosophila</i> und <i>S. cerevisiae</i> und Protozoen	AUA	Ile	Methionin = Start
Mitochondrien von Säugern	AGC, AGU	Serin	Stop
Mitochondrien von Säugern	AG(A, G)	Arginin	Stop
Mitochondrien von <i>Drosophila</i>	AGA	Arginin	Stop
Mitochondrien z. B. bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CU(U, C, A, G)	Leucin	Threonin
Mitochondrien Höherer Pflanzen	CGG	Arginin	Tryptophan
Einige Arten der Pilzgattung <i>Candida</i>	CUG	Leucin	Serin
<i>Eukarya</i> (selten)	CUG	Leucin	Start
<i>Eukarya</i> (selten)	ACG	Threonin	Start
<i>Eukarya</i> (selten)	GUG	Valin	Start
<i>Bacteria</i>	GUG	Valin	Start
<i>Bacteria</i> (selten)	UUG	Leucin	Start
<i>Bacteria</i> (SR1 <i>Bacteria</i> )	UGA	Stop	Glycin <sup>[11]</sup>

# Komponenten der Translation

1. Transfer RNAs (**tRNA**) bringen die
2. **Aminosäuren** zur wachsenden
- Polypeptidkette** am
3. **Ribosom** mit der
4. **mRNA**.

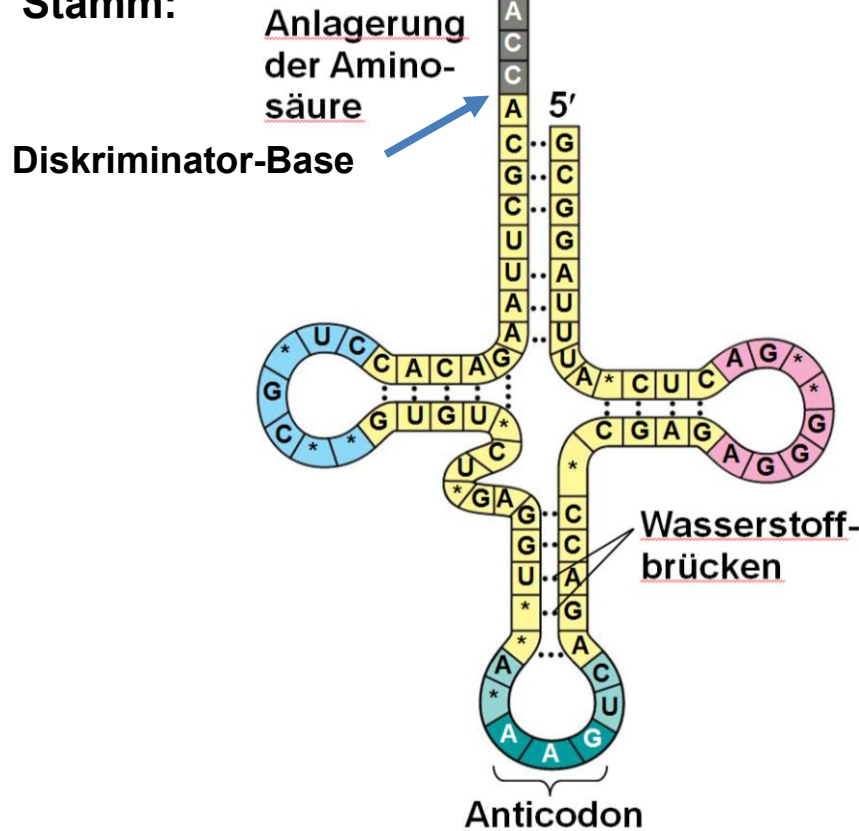


*Energie (ATP)*

# tRNA

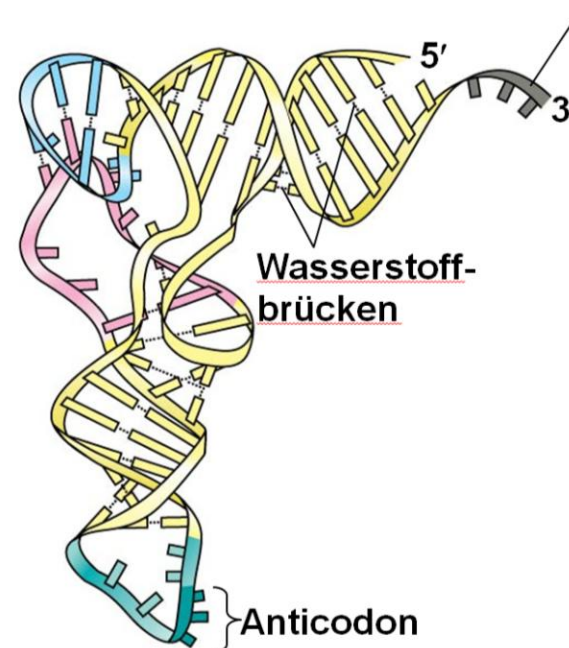
- 74 – 95 Ribonukleotide lang
- Sekundärstruktur in L-Form durch intramolekulare Basenpaarungen

**Aminoacyl-Acceptor-Stamm:**



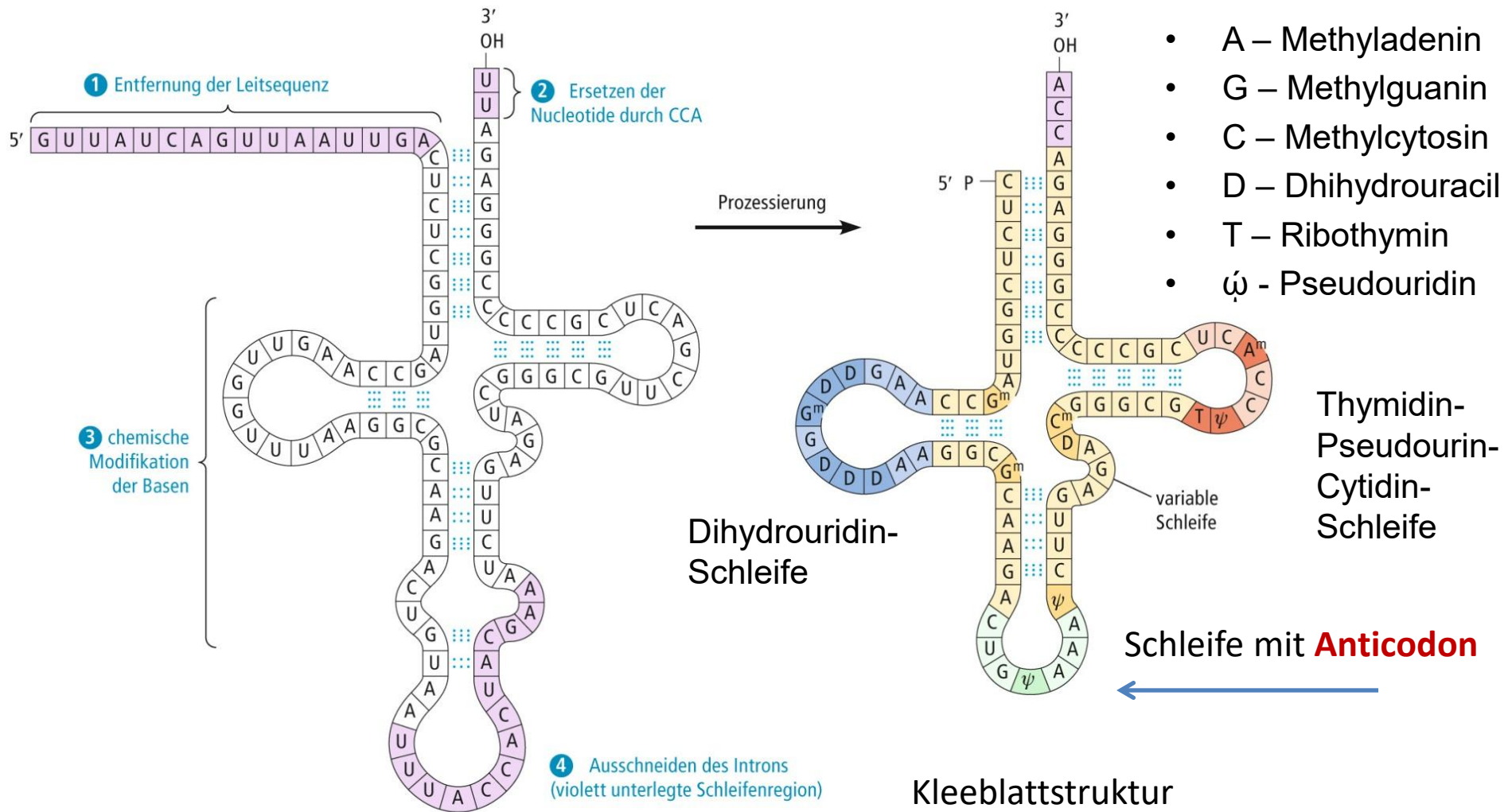
(a) Zweidimensionale Struktur

**L-Form**



(b) Dreidimensionale Struktur

# Exkurs: Prozessierung der tRNA



(a) Primäres Transkript (Vorläufer) der Tyrosin tRNA der Hefe

(b) Reife tRNA, Sekundärstruktur

# tRNA

---

## Eigenschaften der tRNA:

- Jede tRNA transferiert eine spezielle Aminosäure (codon-abhängig)
- Länge: ca. 80 Nukleotide (nach Prozessierung)
- bildet intramolekulare Basenpaarungen, daraus entstehen Schleifen: Anticodon-Schleife, Dihydrouridin-Schleife (DHU-Schleife) und die Thymidin-Pseudourin-Cytidin-Schleife und ggf. eine variable Schleife (für Interaktion mit spezifischen Proteinen)
- flexible Basenpaarung der 3. Base des **Anticodons** mit der mRNA (*wobble base*)  
=> Bindung an verschiedene Codone möglich

# Exakte Translation erfordert:

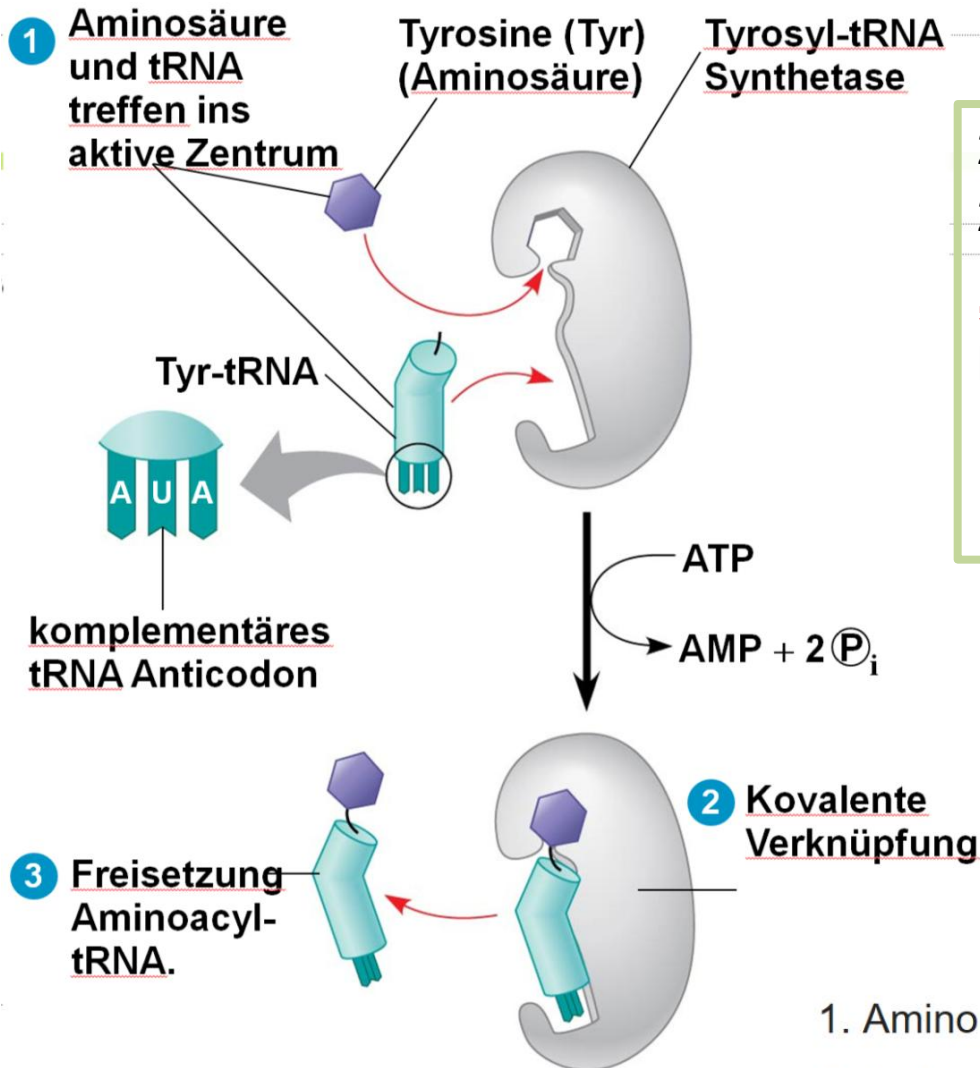
---

1. Korrekte komplementäre Paarung des **Anticodons** der tRNA mit dem **Codon** auf der mRNA
2. Korrekte Kopplung der **tRNA** an die **Aminosäure**

Vermittler:

**Aminoacyl-tRNA-Synthetase**

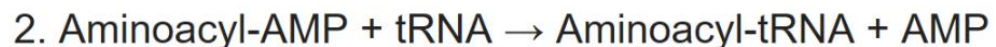
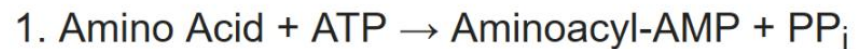
# Kopplung der Aminosäure an die tRNA durch Aminoacyl-tRNA-Synthetase (tRNA-Ligase)



20 versch. Enzyme für  
20 versch. Aminosäuren

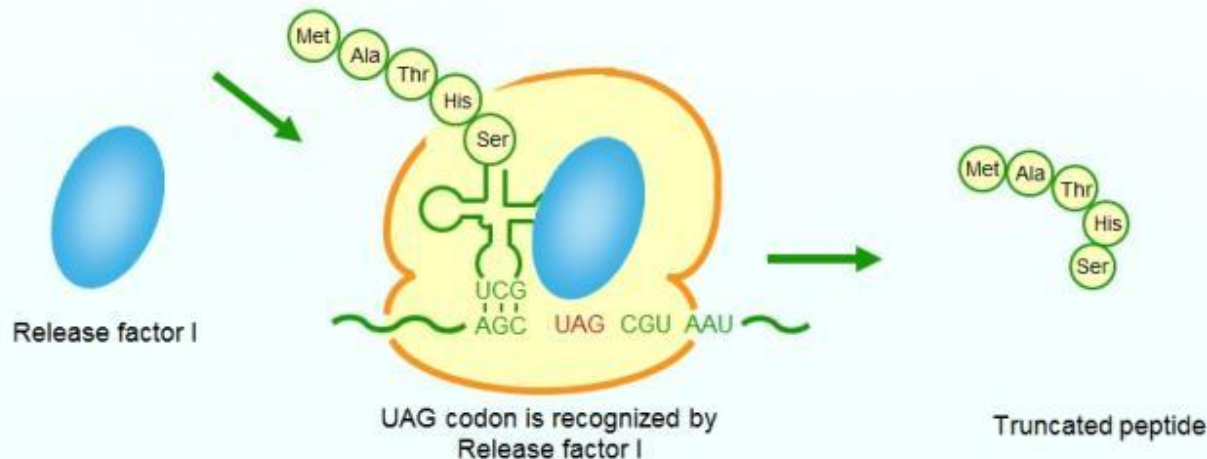
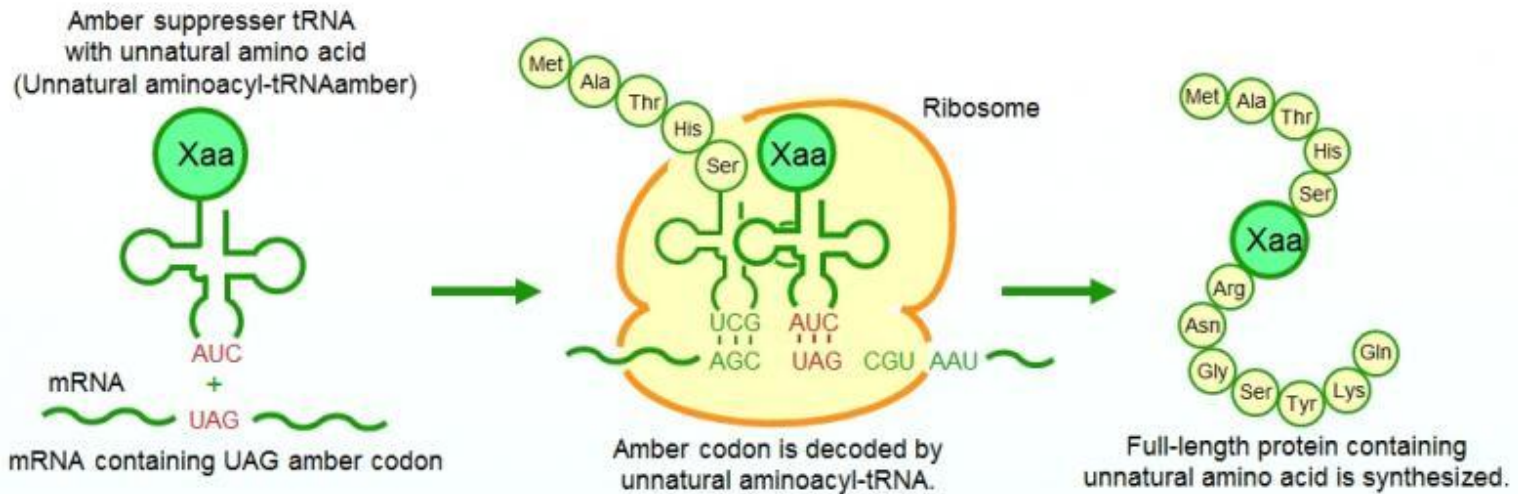
„**Wobbling**“ - Flexibilität bei der  
Basenpaarung

→ Grundlage für Degeneration des  
genetischen Codes



# Exkurs: Anwendung in der Biotechnologie

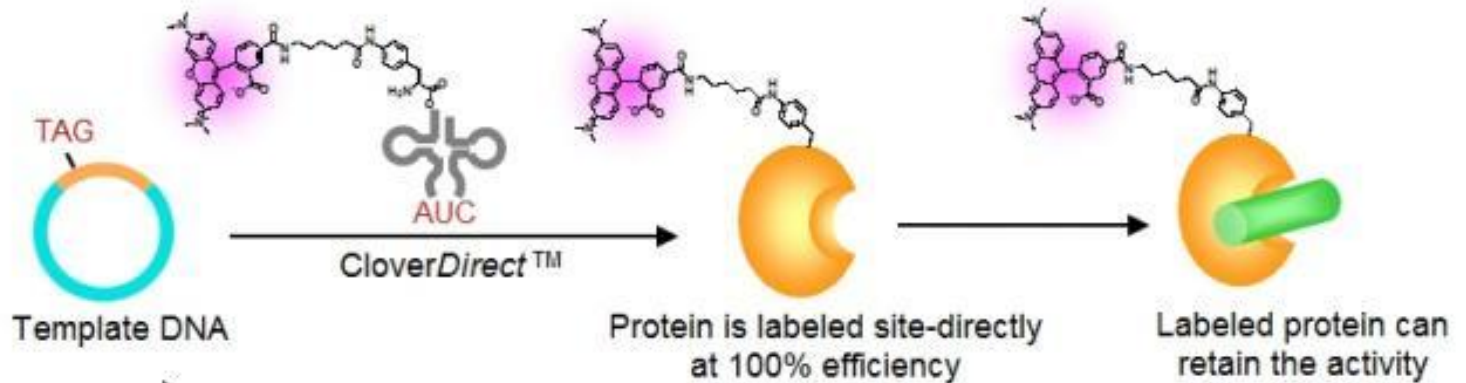
## Einbau von „unnatürlichen“ Aminosäuren über modifizierte tRNAs



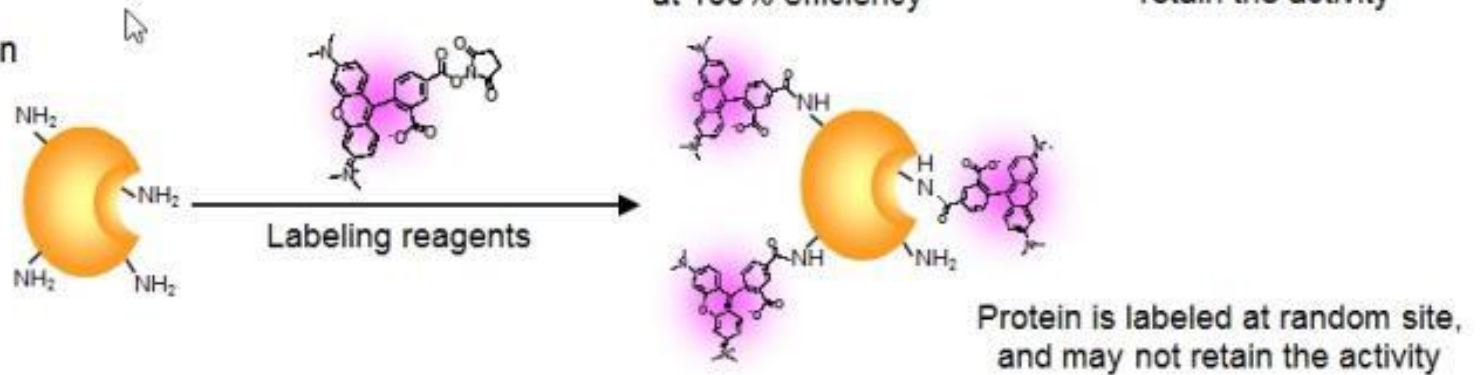
# Exkurs: Anwendung in der Biotechnologie

## Site-Directed Fluorescence Labeling

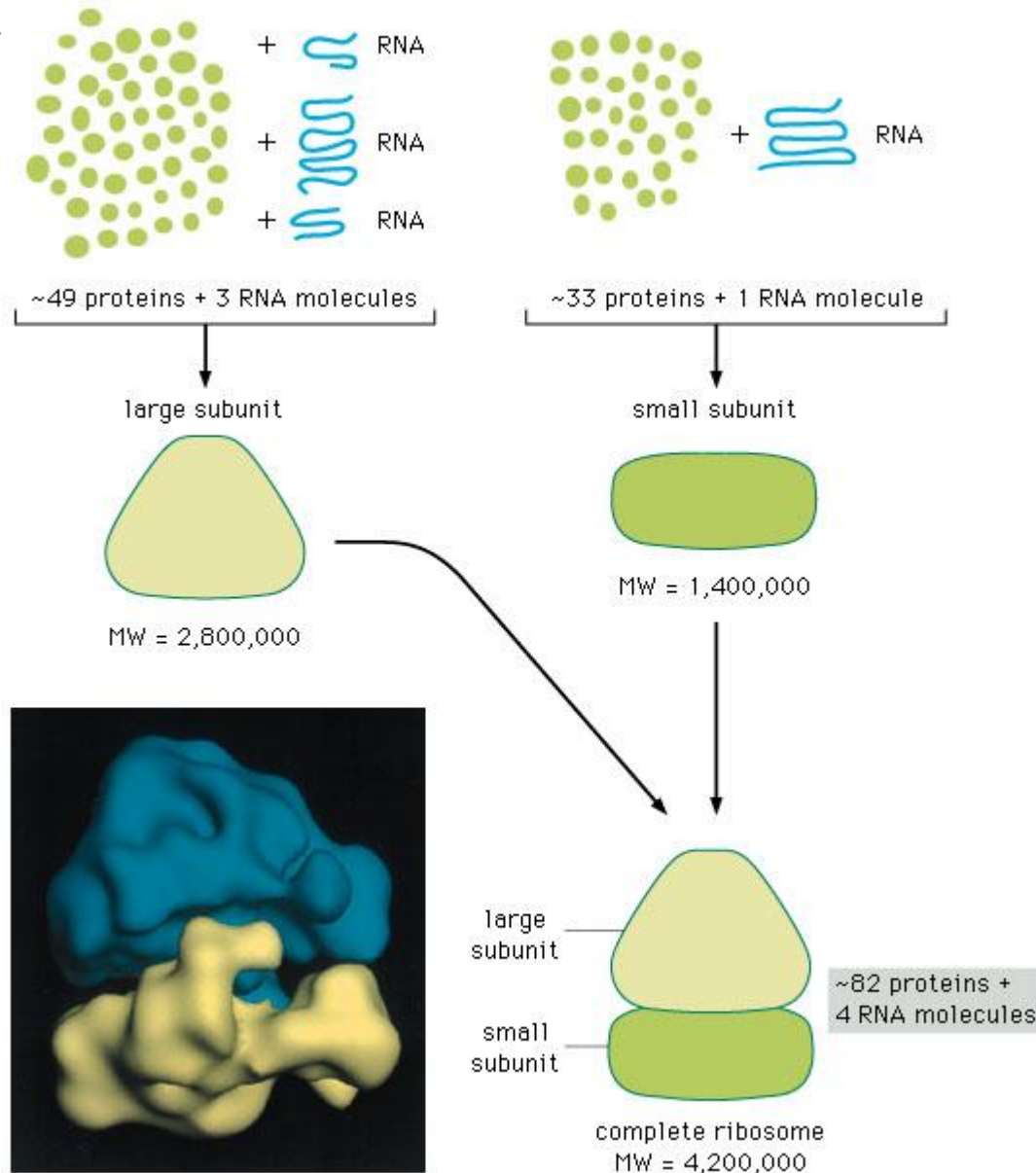
CloverDirect™



Chemical modification

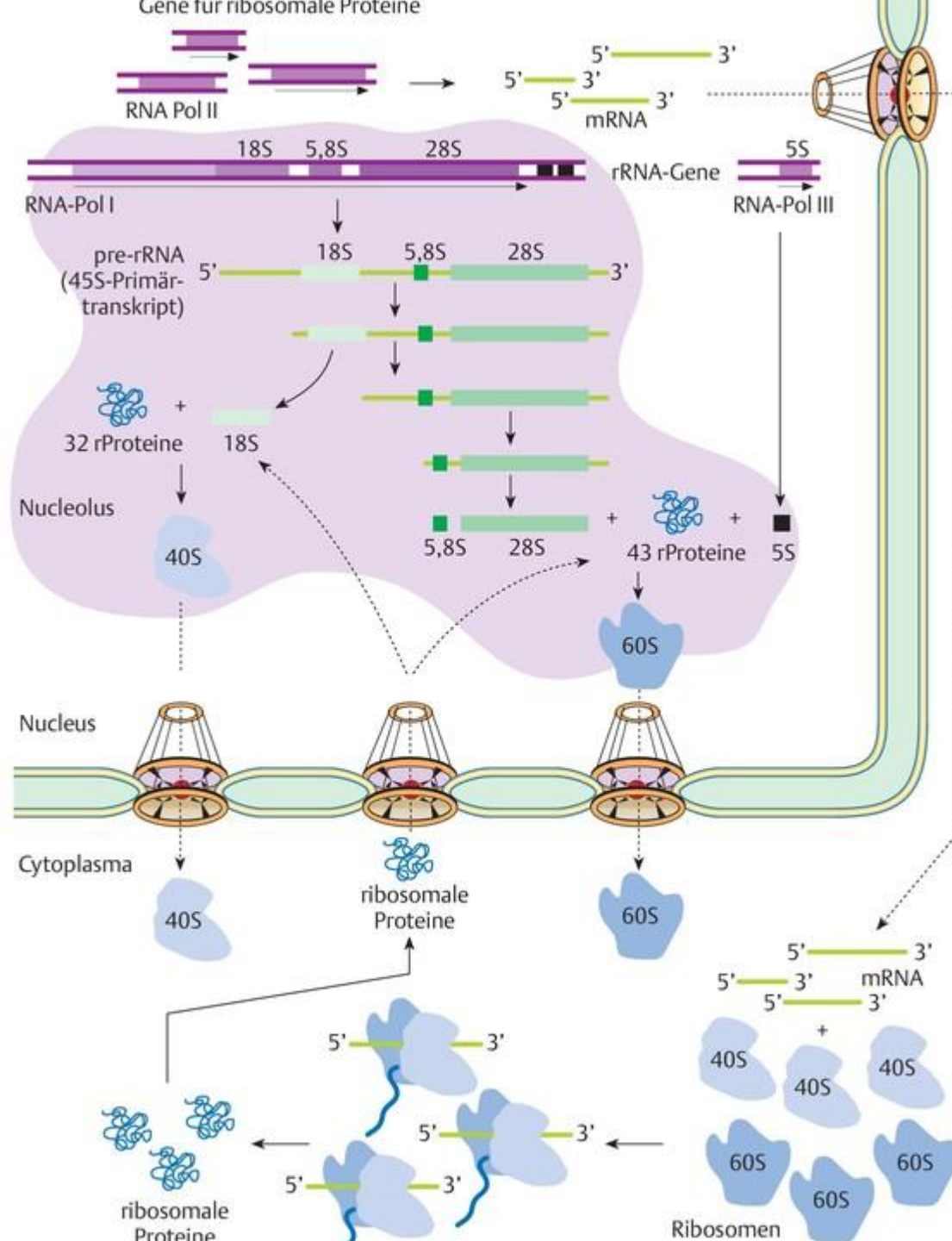


# Wiederholung: Zusammensetzung von eukaryotischen Ribosomen



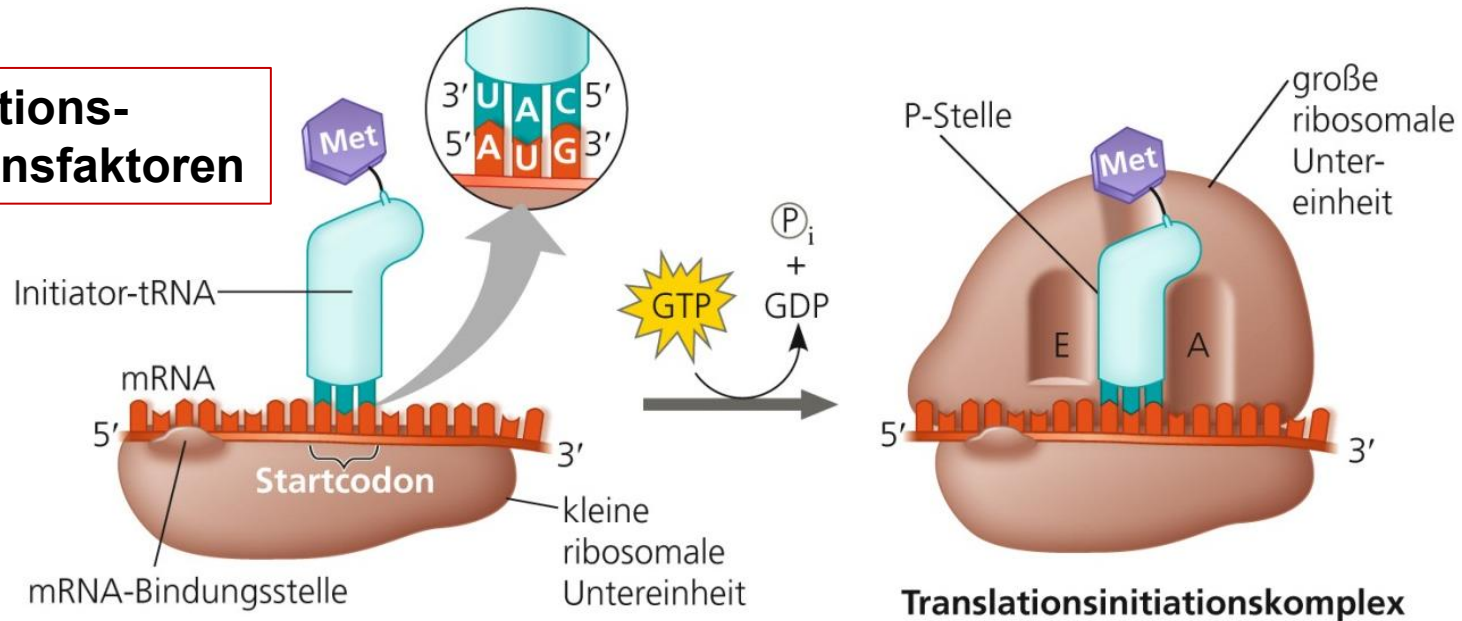
**80S** Ribosomen  
Eukaryoten  
(60S + 40S Untereinheit)

**70S** Ribosomen  
Prokaryoten  
(50S + 30S Untereinheit)



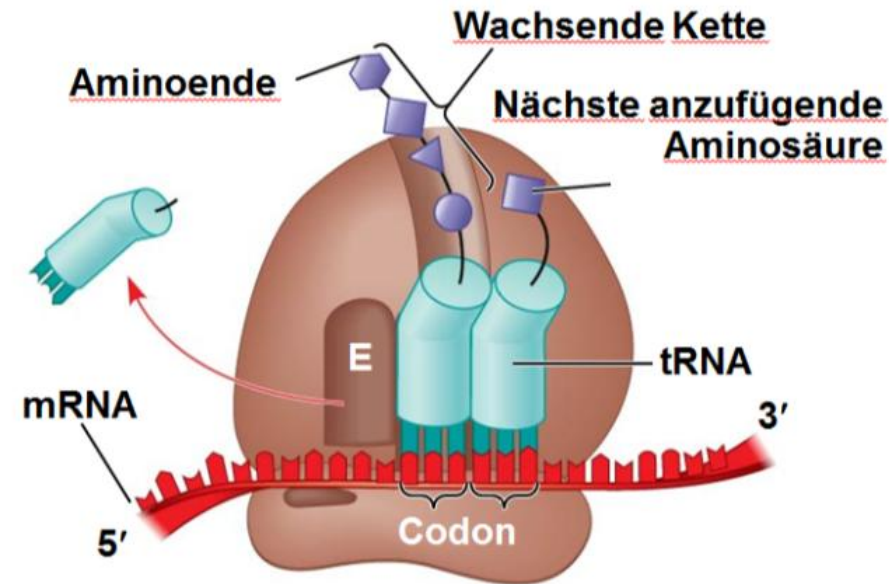
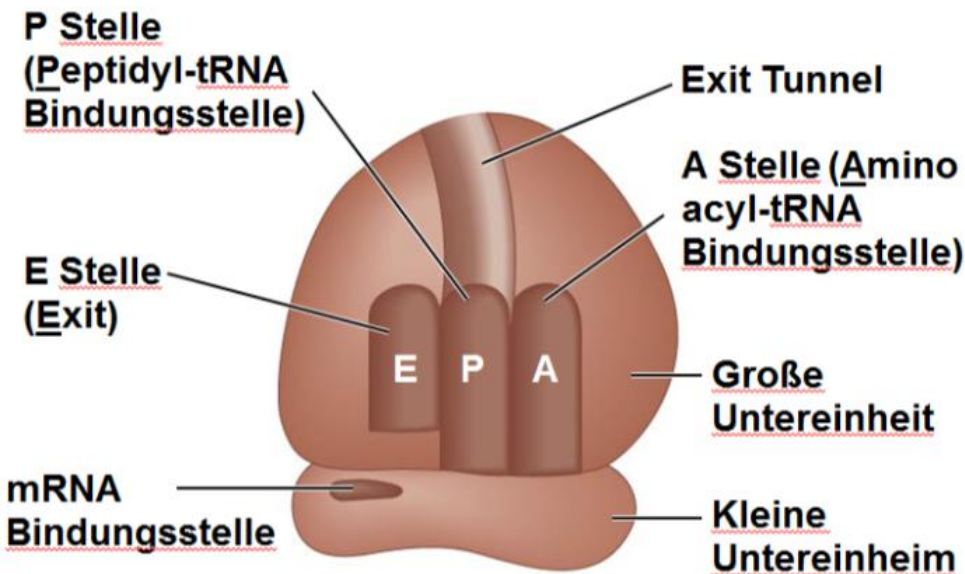
# 1. Initiation der Translation

## Translationsinitiationsfaktoren



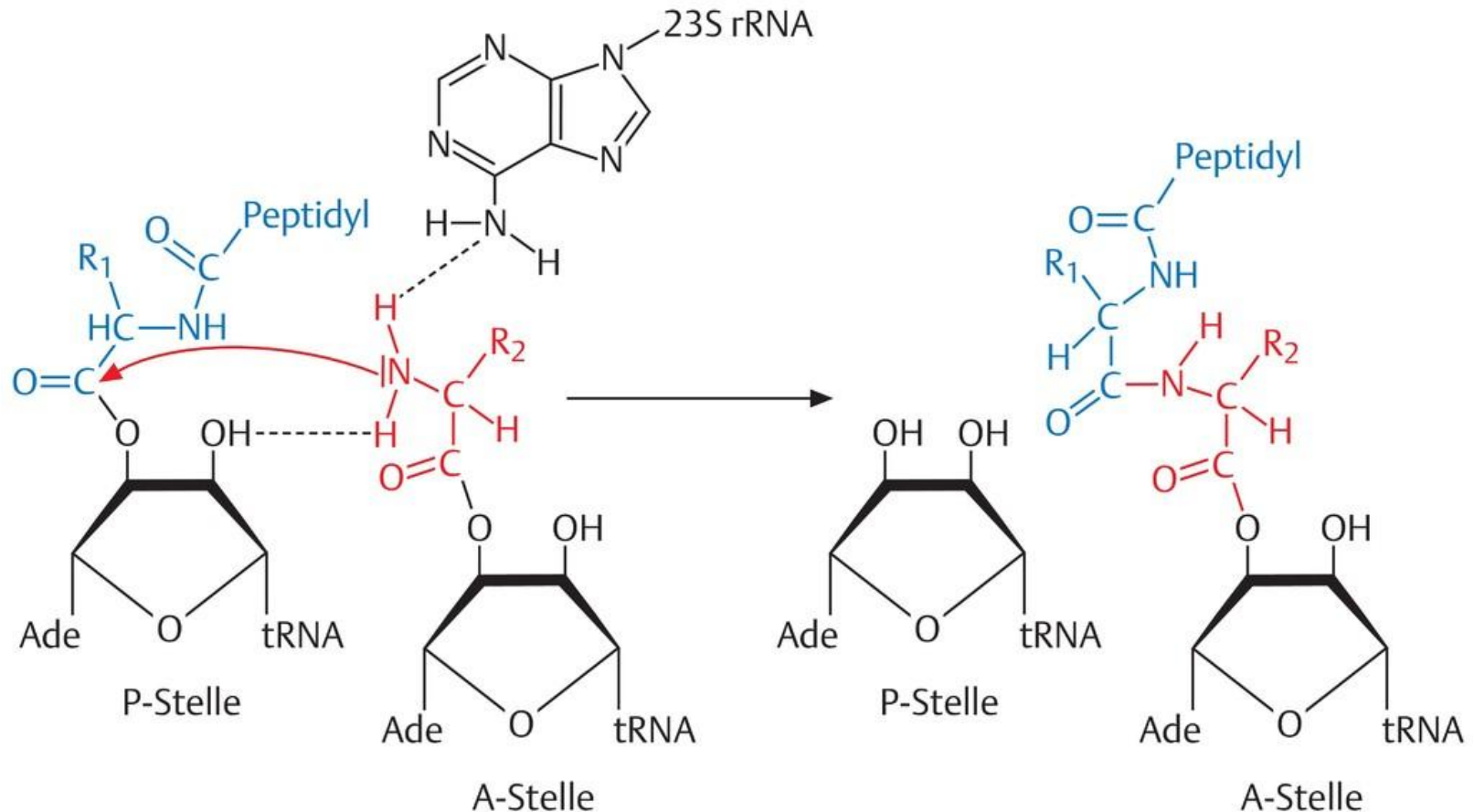
1. Kleine ribosomale Untereinheit (UE) wird über die 5'Kappe zur mRNA rekrutiert
2. Kleine ribosomale UE bewegt sich entlang der mRNA stromabwärts, bis Erkennungssequenz für Translationsstart (**Kozak-Sequenz**) erreicht ist, Kozak-Sequenz (ACCAUGG) enthält das erste **AUG-Startcodon**
3. Bindung der **methioninspezifischen Initiator-tRNA<sup>Met</sup>**.
4. Anlagerung der großen Untereinheit des Ribosoms, => **Translations-Initiations-Komplex** vollständig

# Belegungsstellen der Ribosomen: A-, P- und E-Stelle



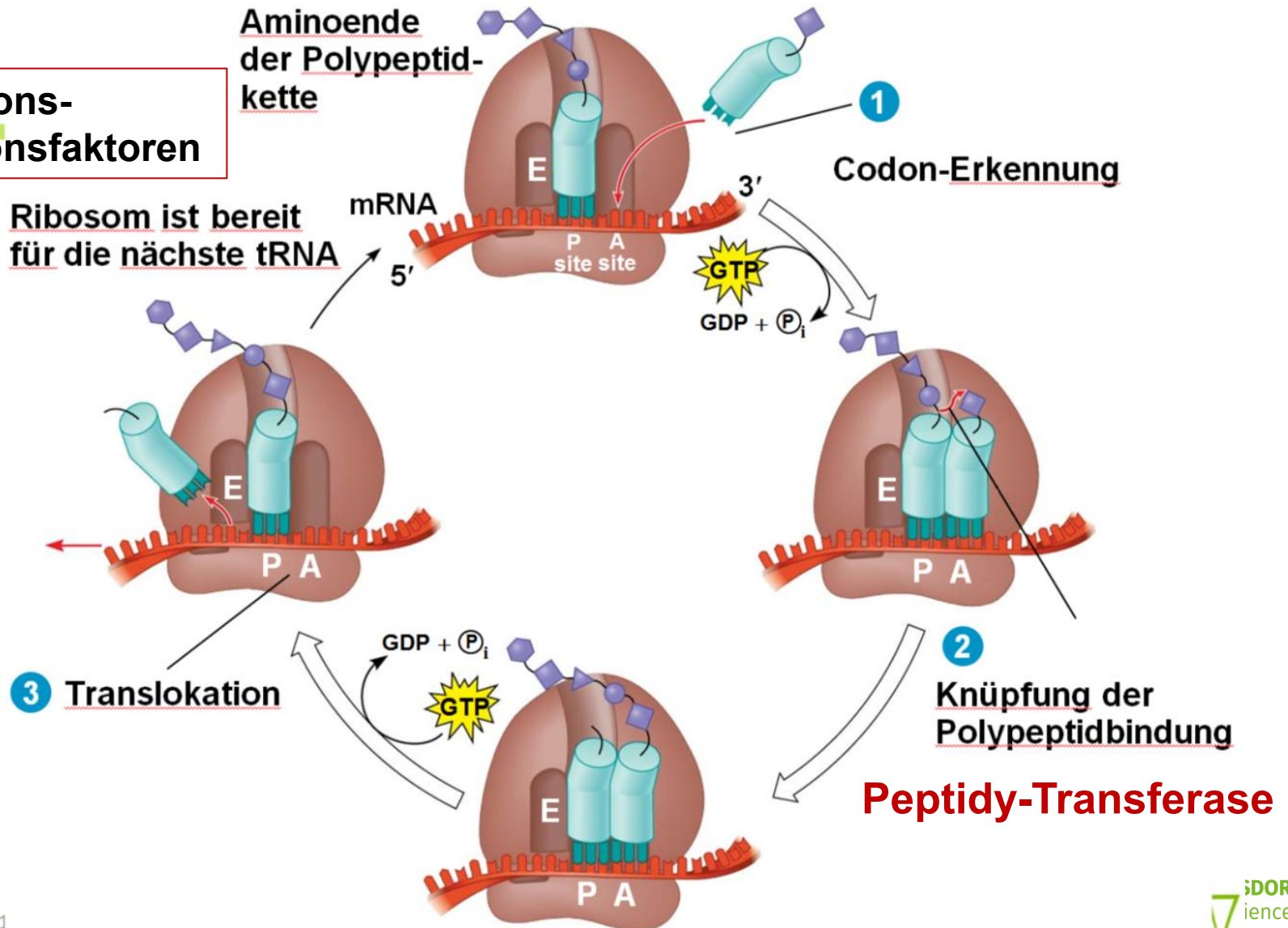
- **Peptidyltransferase**-Zentrum ist Teil der großen UE.
- Exit-Tunnel kann Peptidkette von ca. 40 AS umfassen.

# Exkurs: Peptidyl-Transfer

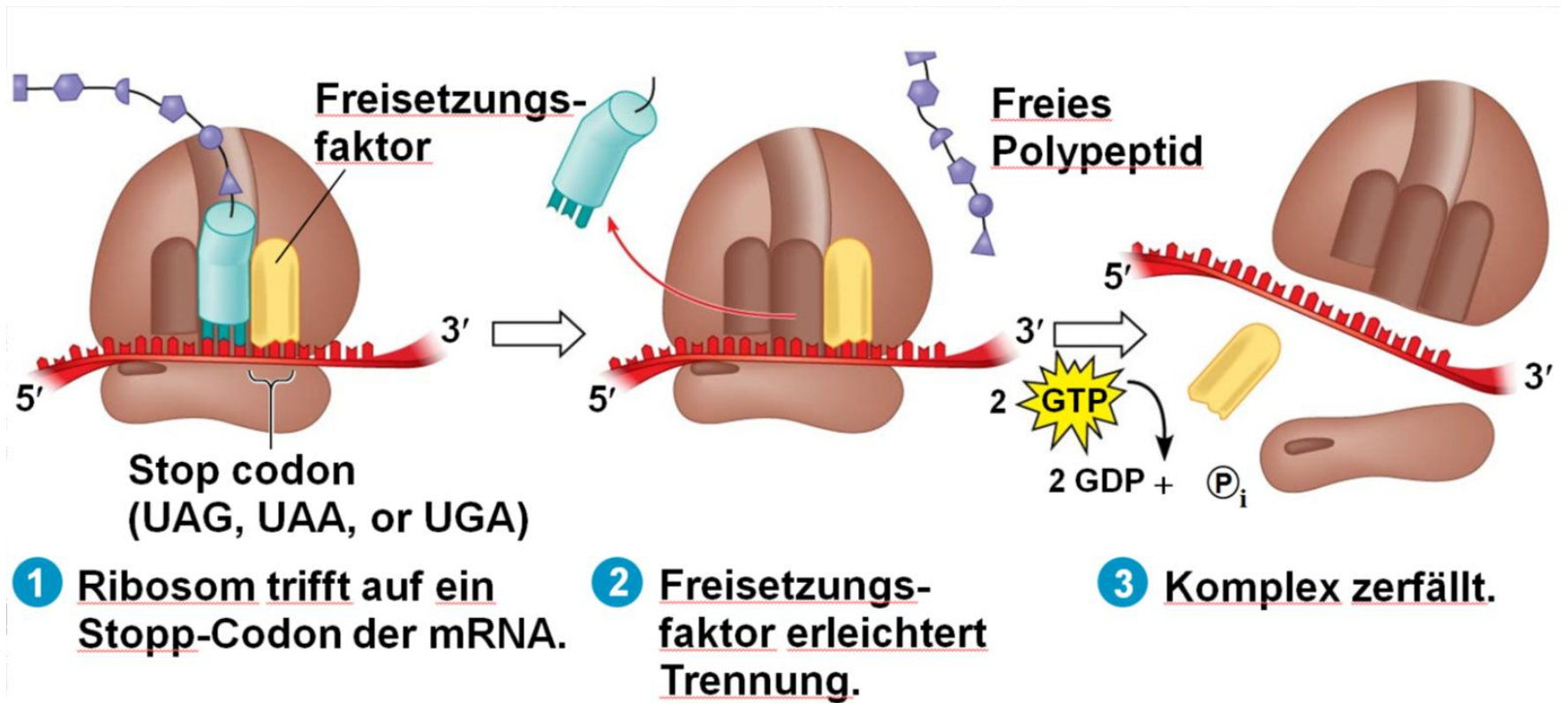


## 2. Elongation der Polypeptidkette

### Translations- elongationsfaktoren



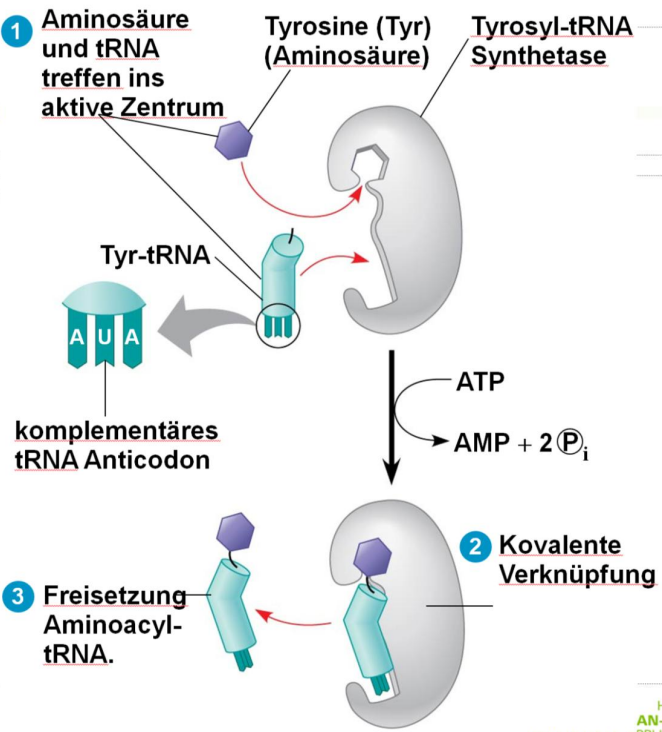
# 3. Termination der Translation



# Übersicht: Katalyse durch RNA-Protein-Hybridenzyme

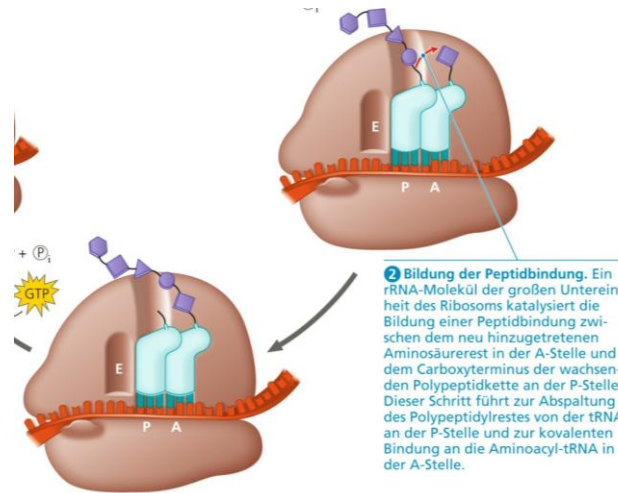
## Aminoacyl-tRNA-Synthetase

Aminosäure + tRNA + ATP → Aminoacyl-tRNA + AMP + P



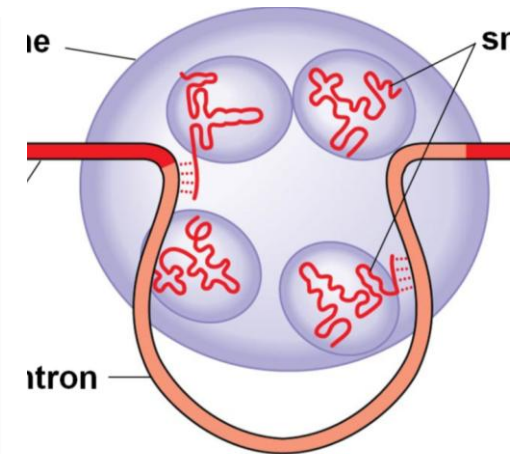
## Peptidyltransferase

RNA-Komponente am Ribosom katalysiert Peptidbindung

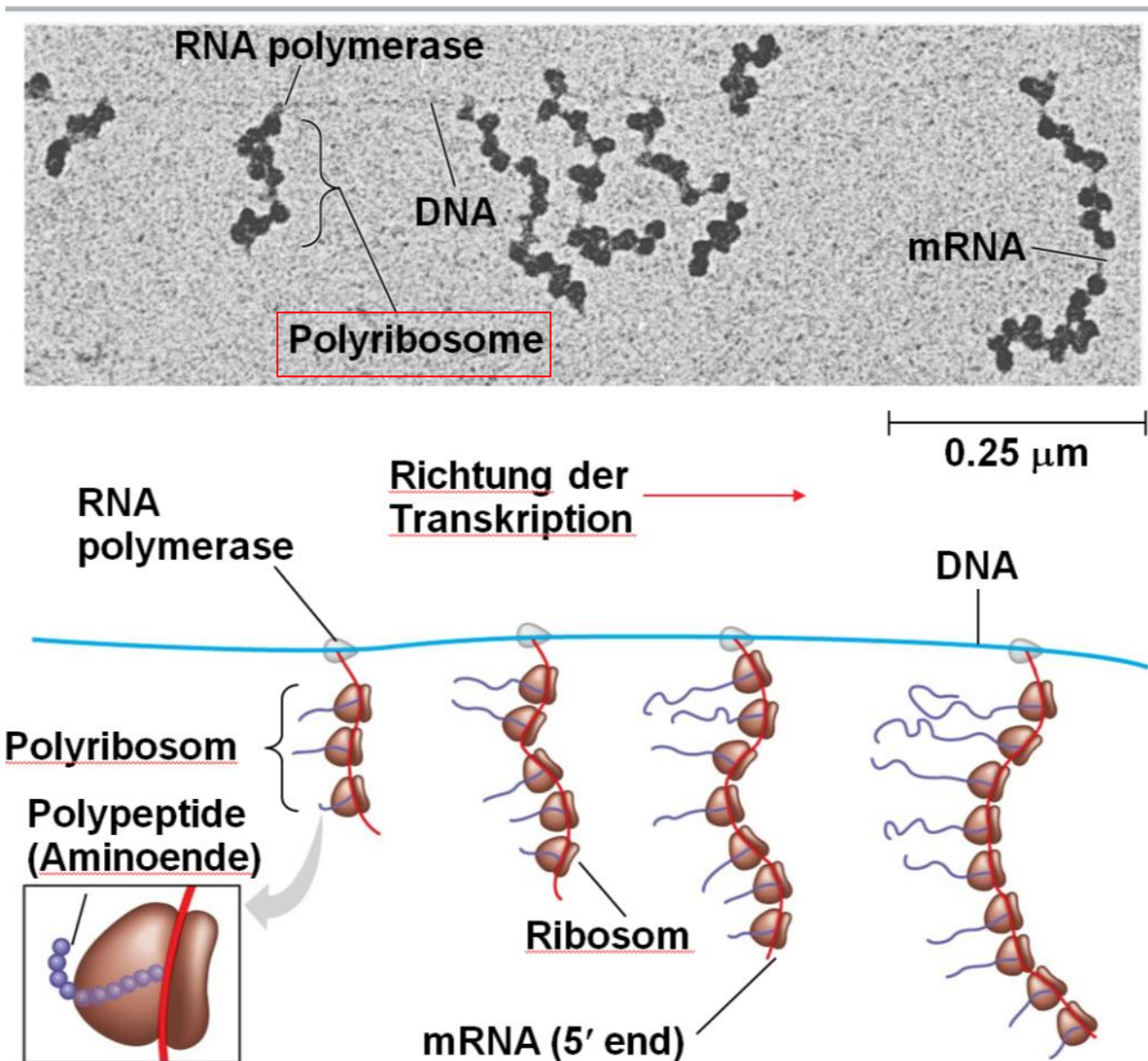


## Spleißosom

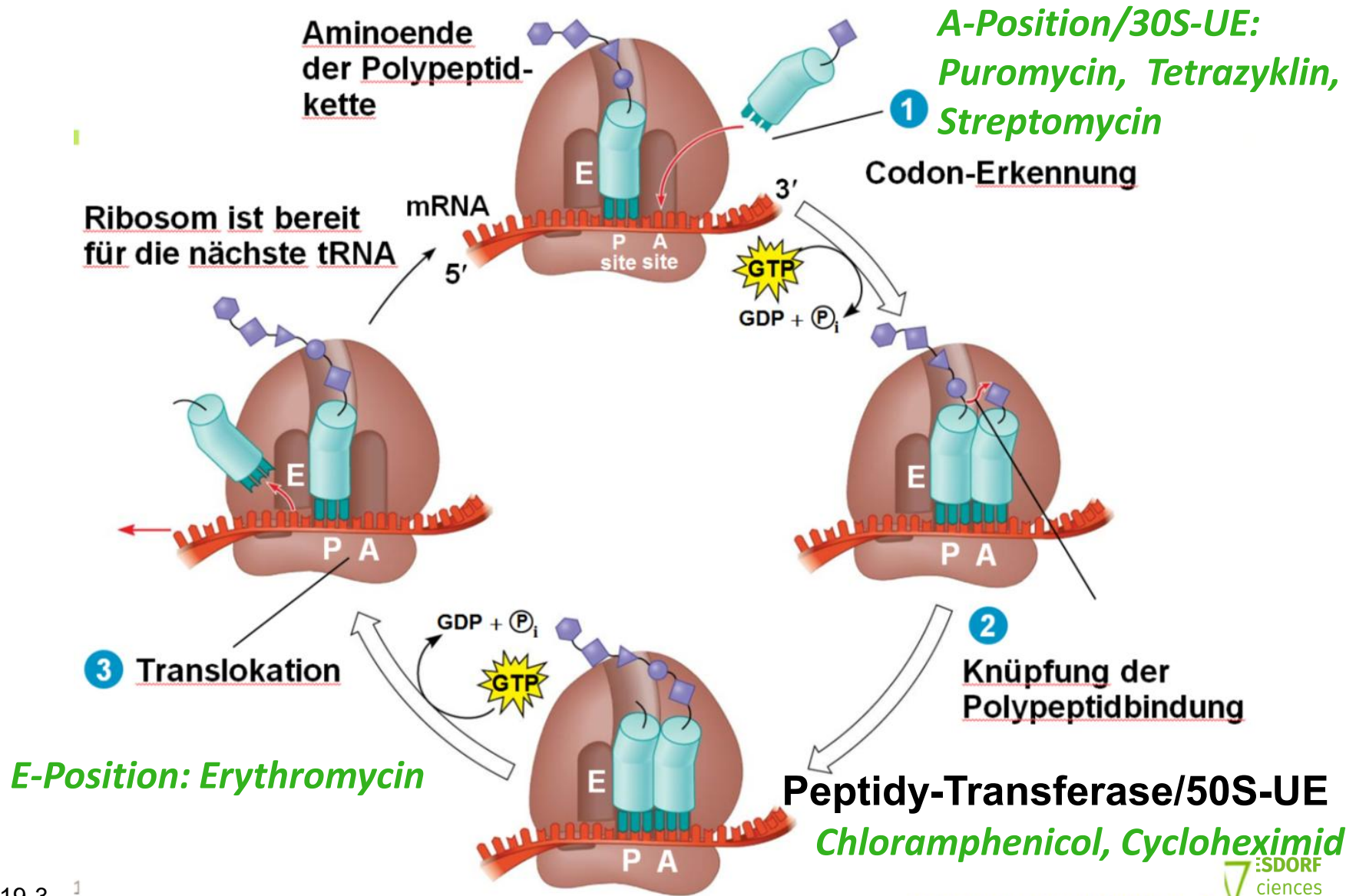
snRNA katalysiert mit Proteinen das Spleißen



# Kopplung von Transkription und Translation in Bakterien



# Exkurs: Ribosom als Angriffspunkt für Antibiotika

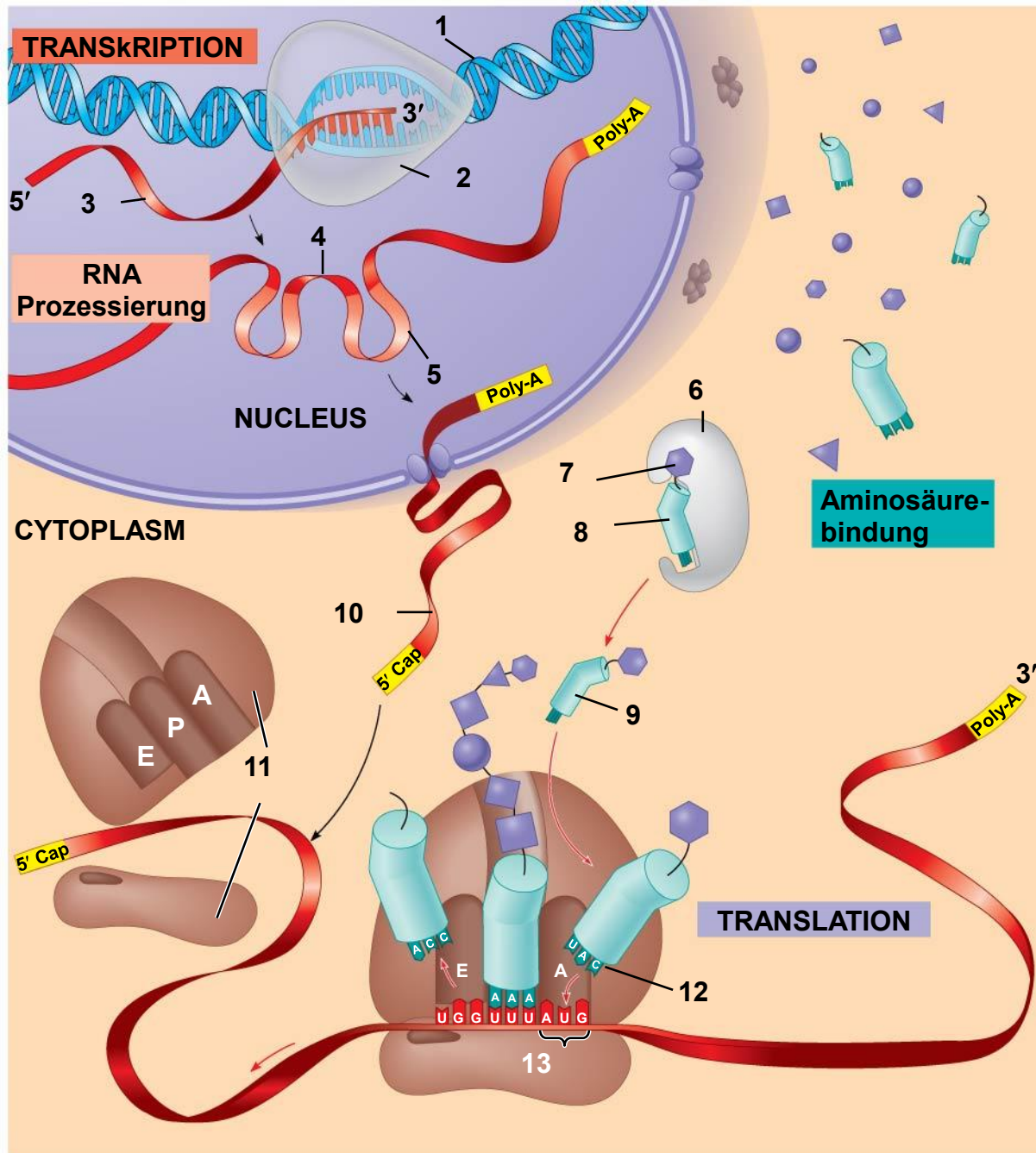


# Exkurs: Ribosom als Angriffspunkt für Antibiotika

---

- **Puromycin:** Ähnelt strukturell einer beladenen tRNA. Bindet an die A-Stelle und wird im aktiven Zentrum mit der Peptidyl-Kette verbunden. Hierdurch kommt es zum vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese; das Peptidyl-Puromycin- Konjugat wird freigesetzt. (*Eu- und Prokaryoten*)
- **Tetracyclin:** Bindet an die A-Stelle und verhindert die Anlagerung weiterer AminoacyltRNAs an 30S-UE.
- **Streptomycin:** Bindet an das Protein S12 der 30S Untereinheit, inhibiert Bildung des Initiationskomplexes. Intrazelluläre Bakterien werden, ebenso wie Mitochondrien, nicht erfasst, da Streptomycin kaum von eukaryotischen Zellen aufgenommen wird.
- **Erythromycin:** hemmt bakteriellen Elongationsfaktor. t-RNA an E-Position wird nicht freigesetzt. Translokation/Elongation nicht mehr möglich.
- **Chloramphenicol:** Bindet an die 50S Untereinheit und interferiert mit der Peptidyl-Transferase-Aktivität, wodurch die Elongation gestört wird. Inhibiert auch Ribosomen der Chloroplasten und Mitochondrien. Inaktivierung durch Acetylierung; welches die Bindung an das Ribosom verhindert.
- **Cycloheximid:** Bindet spezifisch an 50S Ribosomen und inhibiert die Peptidyl-Transferase-Aktivität.

Figure 14.24



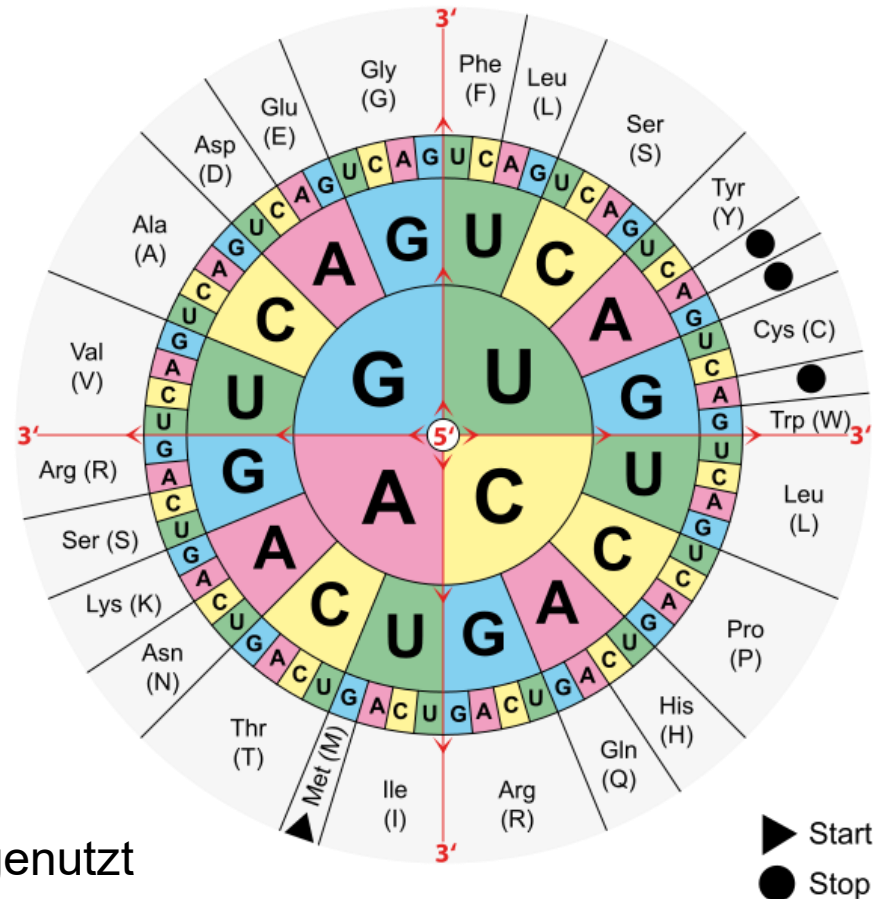
# Aufgaben: Übersetzen Sie die mRNA-Sequenz in Peptidsequenz

- Beispiel: 5' - **CUAAUGGCUGAUCGAAGCGG** ' -3'

• 5-'3' Frame1: L**M**ADRS...

5-'3' Frame2: \*WLIEA...

5-'3' Frame3: NG\*SKR...



## „Codon Usage“

- Codons werden unterschiedlich häufig genutzt

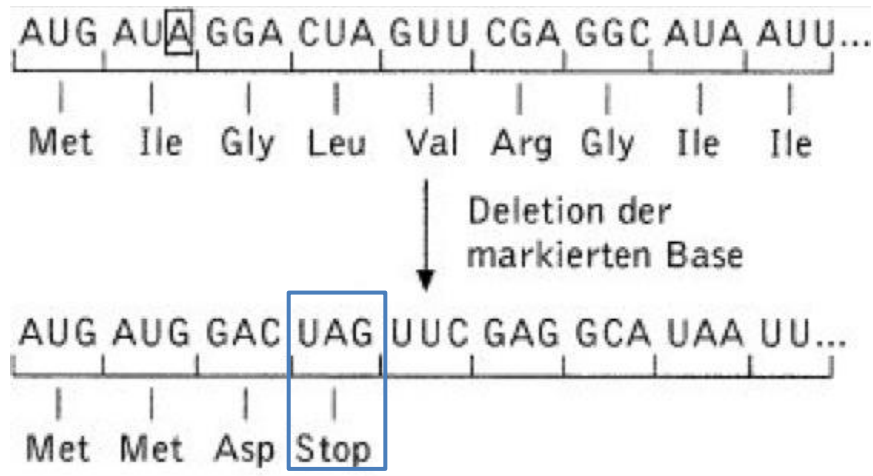
# Genmutationen: Deletionen & Insertion

## Deletion & Insertion:

Verlust/Addition einer oder mehrerer Basen.

**Folge:** Verschiebung des Leserasters (*frame shift*)

- 1. out of frame-Deletion:** Das Leseraster wird verschoben. Es entsteht ein verändertes Protein ab der Deletionsstelle oder ein trunkiertes Protein (Stoppcodon)



Ich mag **g** nur ein Eis.  
Ich man ure ine is.

- 2. in frame-Deletion:** Das Leseraster bleibt erhalten. Es entsteht ein verändertes Protein mit deletierten Aminosäuren.

Ich mag **nur** ein Eis.  
Ich mag ein Eis.

# Genmutationen: Substitutionen

---

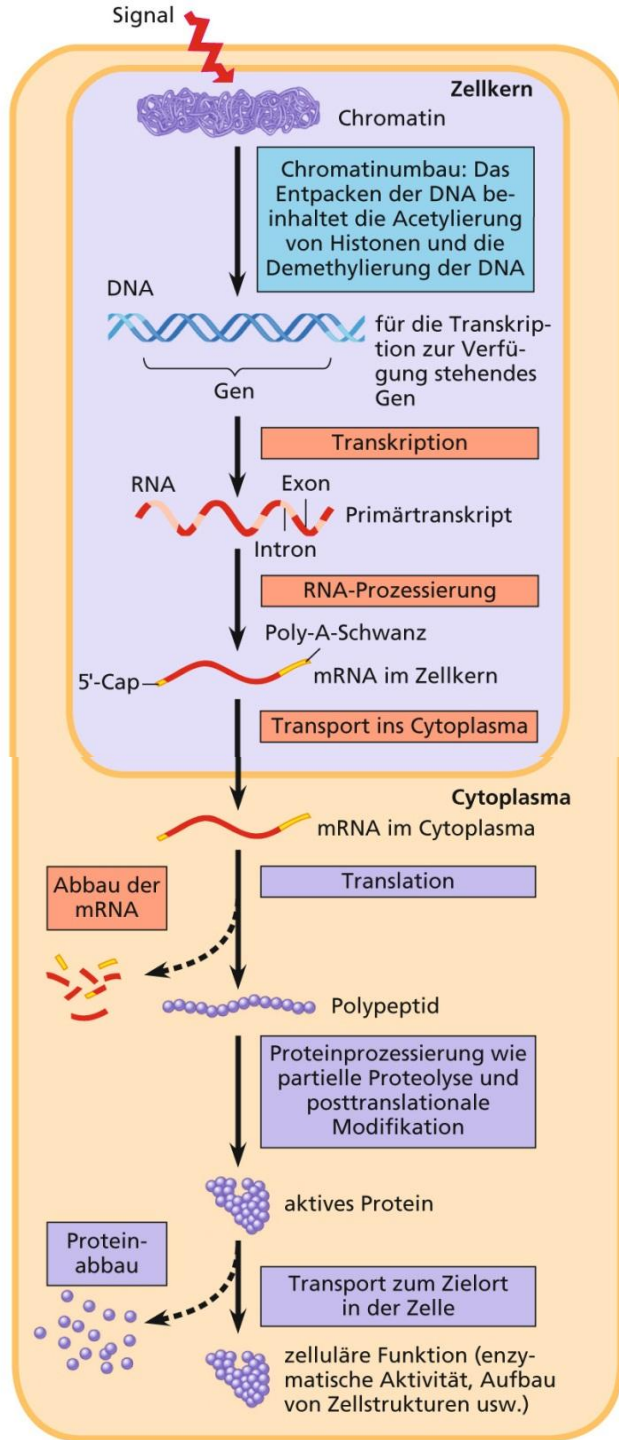
## Substitution

Austausch einer einzelnen Base (**Punktmutation**)

1. Transition: Substitution einer Purin- gegen eine andere Purinbase (A, G) bzw. einer Pyrimidin- gegen eine andere Pyrimidinbase (C, T).
2. Transversion: Substitution einer Purin- gegen eine Pyrimidinbase oder umgekehrt.

## Folgen der Punktmutation:

1. **stille (stumme) Mutation**, gleiche Aminosäure (→ genetischer Code)
2. **missense-Mutation** (sinnverändernde Mutation), Codon codiert für andere Aminosäure (Effekt von kein (neutral) bis stark)
3. **Neutrale/konservative Mutation**: chemisch ähnliche Aminosäure
4. **nonsense-Mutation**, sinnentstellende Mutation durch Stoppcodon



# Stufen der Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

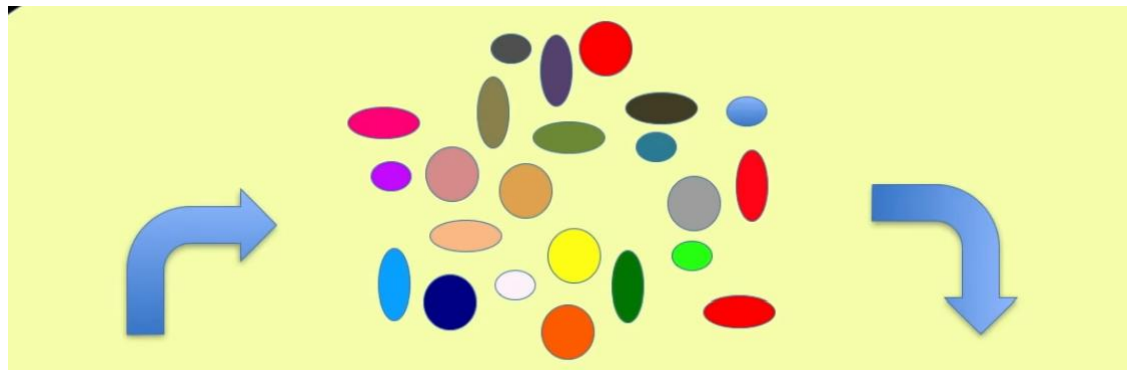
1. Genom
2. Transkription
3. RNA-Prozessierung & Kern-Export
4. mRNA Degradation
5. Translation
6. Posttranslation



# Zelluläre Proteindynamik

---

Proteingehalt der Zelle ist kontrolliert durch ein Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation.

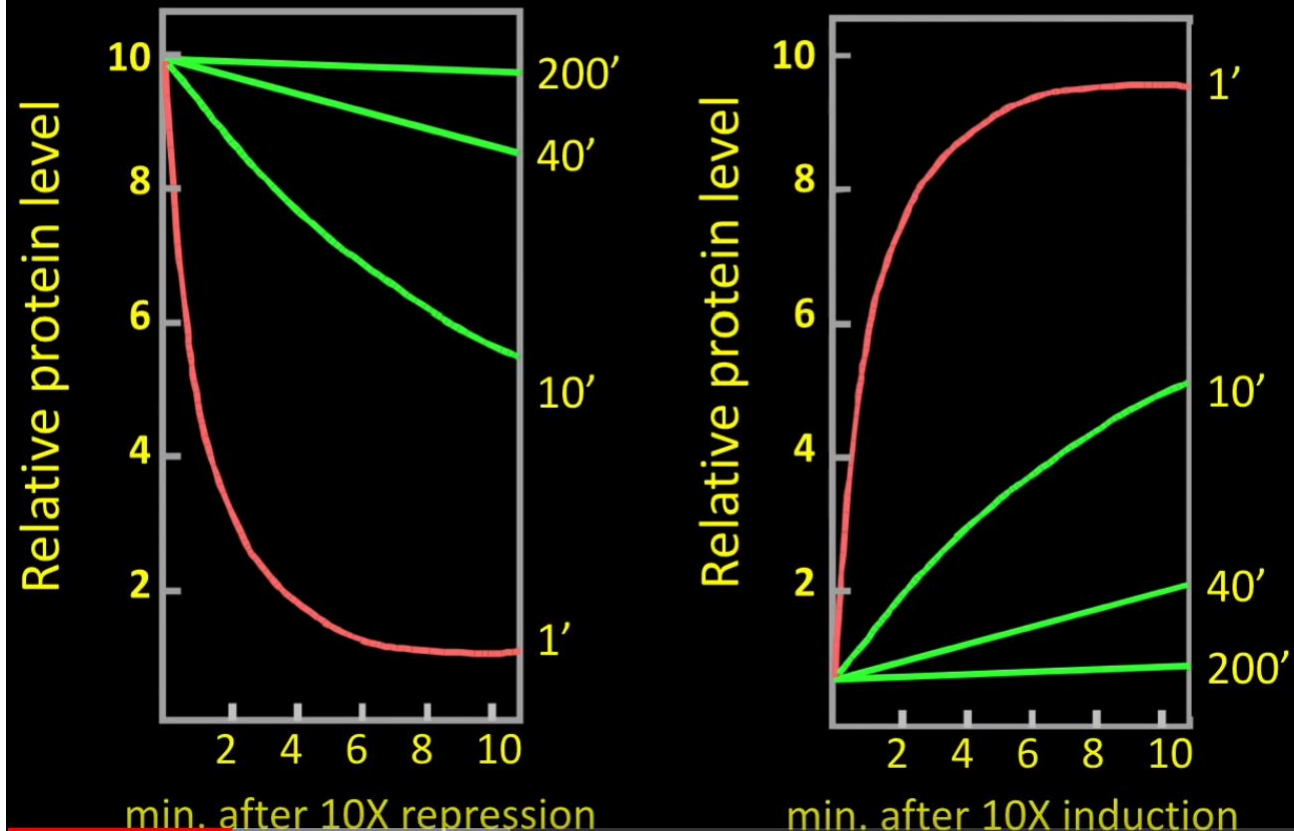


**neu synthetisierte Proteine**

**alte degradierte Proteine**

*Warum ist das sinnvoll? Verschwendung?*

## Rapid turnover is important to dynamic regulation of proteome



# Proteinfaltungshelfer: Chaperone & Chaperonine

---

- **Aufgabe:** zelluläre Proteine, die an hydrophobe Regionen von partiell gefalteten Proteinen binden und die „Falschfaltung“ bzw. Assoziation dieser Proteine mit „falschen“ Partnern verhindern
- **Wirkungsweise:** Faltungsprozess wird verlangsamt und dadurch zuverlässiger, irreversible Aggregation von Proteinen wird verhindert
- **Chaperonine:** spezielle Chaperone, die bei Hitzeschock gebraucht werden und Faltungsprozesse von großen Proteinen unterstützen
- **weitere Funktionen von Chaperonen:** Vermittlung des Proteinabbaus (unterstützen die Ubiquitinierung)
- **Probleme durch Akkumulation fehlgefalteter Proteine:** Alzheimer, Parkinson

# Beispiel: Hsp60 in Mitochondrien (auch in Bakterien)

## Proteinfehlfaltungen erfolgen:

- unmittelbar nach der Synthese
- nach Denaturierung, z.B. nach Hitze erfolgt die Renaturierung nicht korrekt

Abhilfe durch Hsp60- und Hsp10-Chaperonine (heat shock protein)

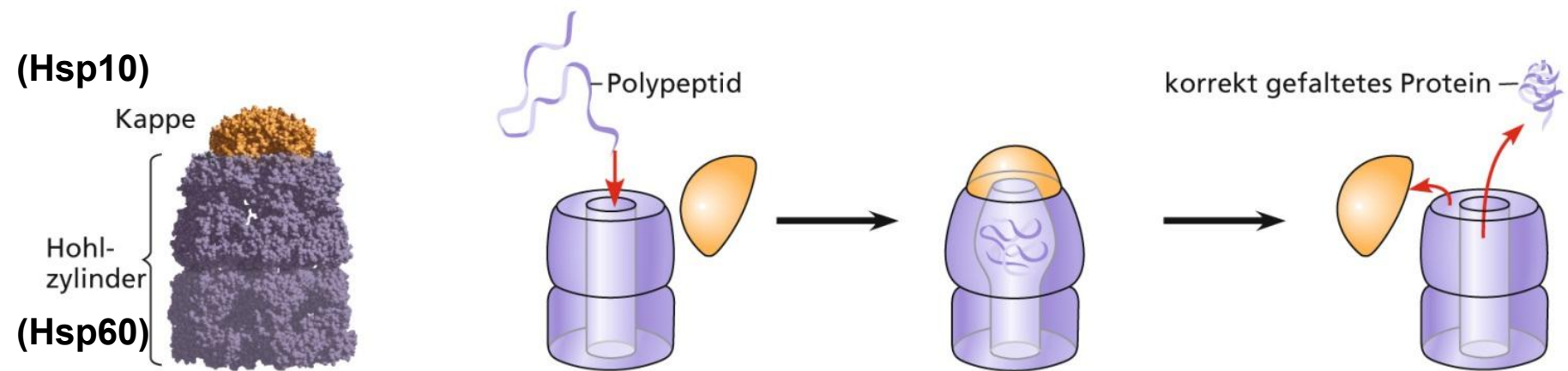


Abbildung 5.21:

# Proteasom

## Aufbau:

- Proteinkomplex (im Zellkern und Zytoplasma) aus multikatalytischen Peptidasen
- Zwei Untereinheiten (**Hohlzylinder** mit zwei **Deckeln**)

## Proteasomen übernehmen den ATP-abhängigen Abbau von:

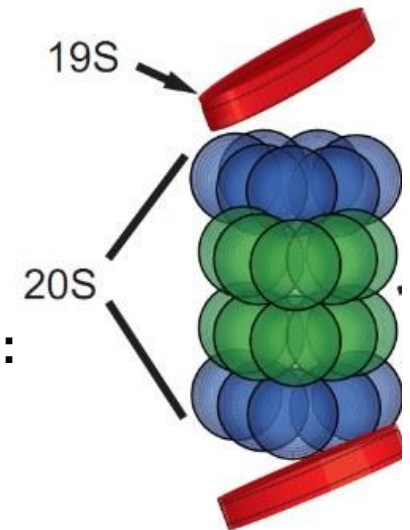
- falsch gefalteten Proteinen
- nicht funktionalen oder gealterten Proteinen

## Funktion des Proteasoms für die Zelle/Organismus:

- Durch die Proteolyse wird verhindert, dass sich diese Proteine in den Zellen anreichern und der Zelle schaden
- Recycling von Aminosäuren

## Wie erfolgt die Erkennung der abzubauenen Proteine?

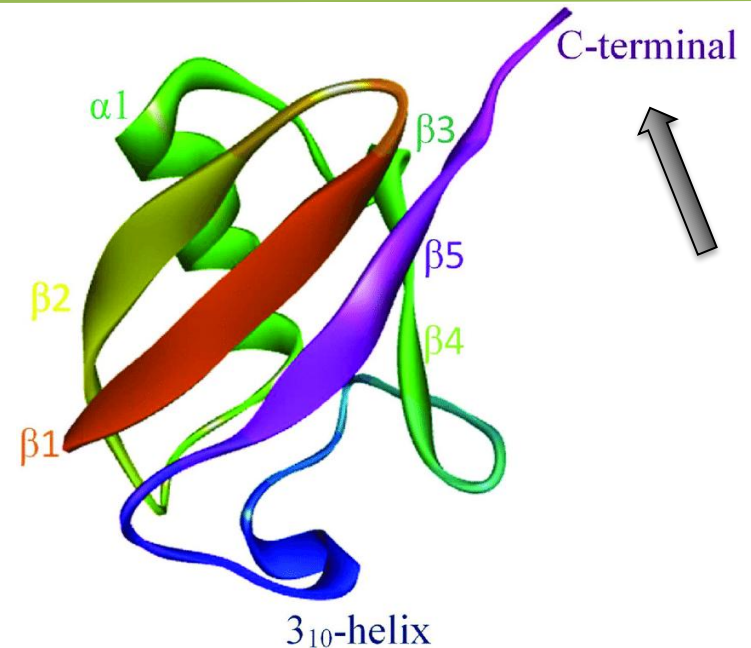
- Ubiquitinketten am Zielprotein
- Nur entfaltete Zielproteine gelangen in das Proteasom (Durchmesser für Tertiärstrukturen zu klein)



# Ubiquitinierung

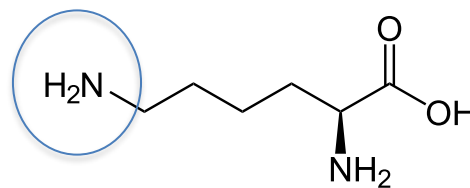
## Ubiquitin (Ub):

- 76 Aminosäuren (ca. 8,5 kDa)

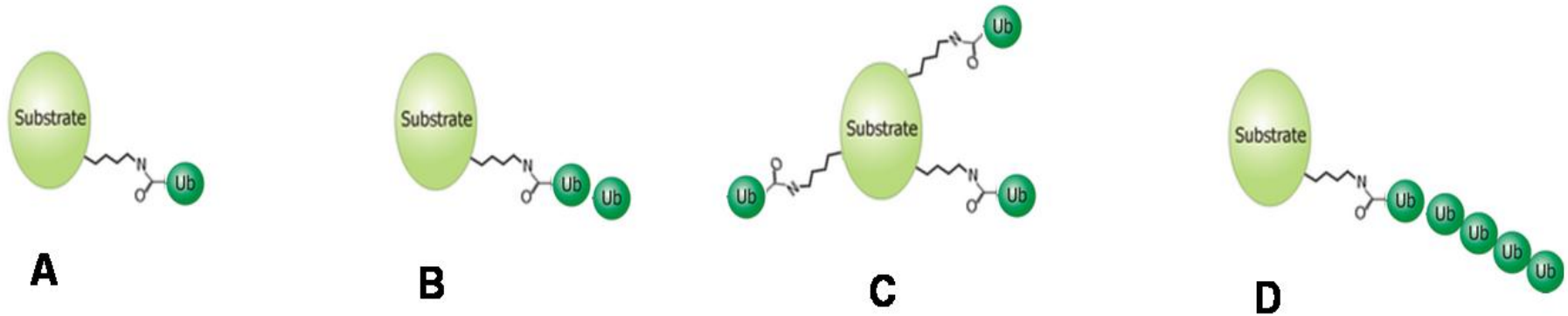


## Ubiquitinierung:

- Ub wird über die C-terminale Carboxylgruppe auf eine bestimmte **Lysin-Seitenkette eines Substrats** übertragen (reversible kovalente Modifikation des Zielproteins)

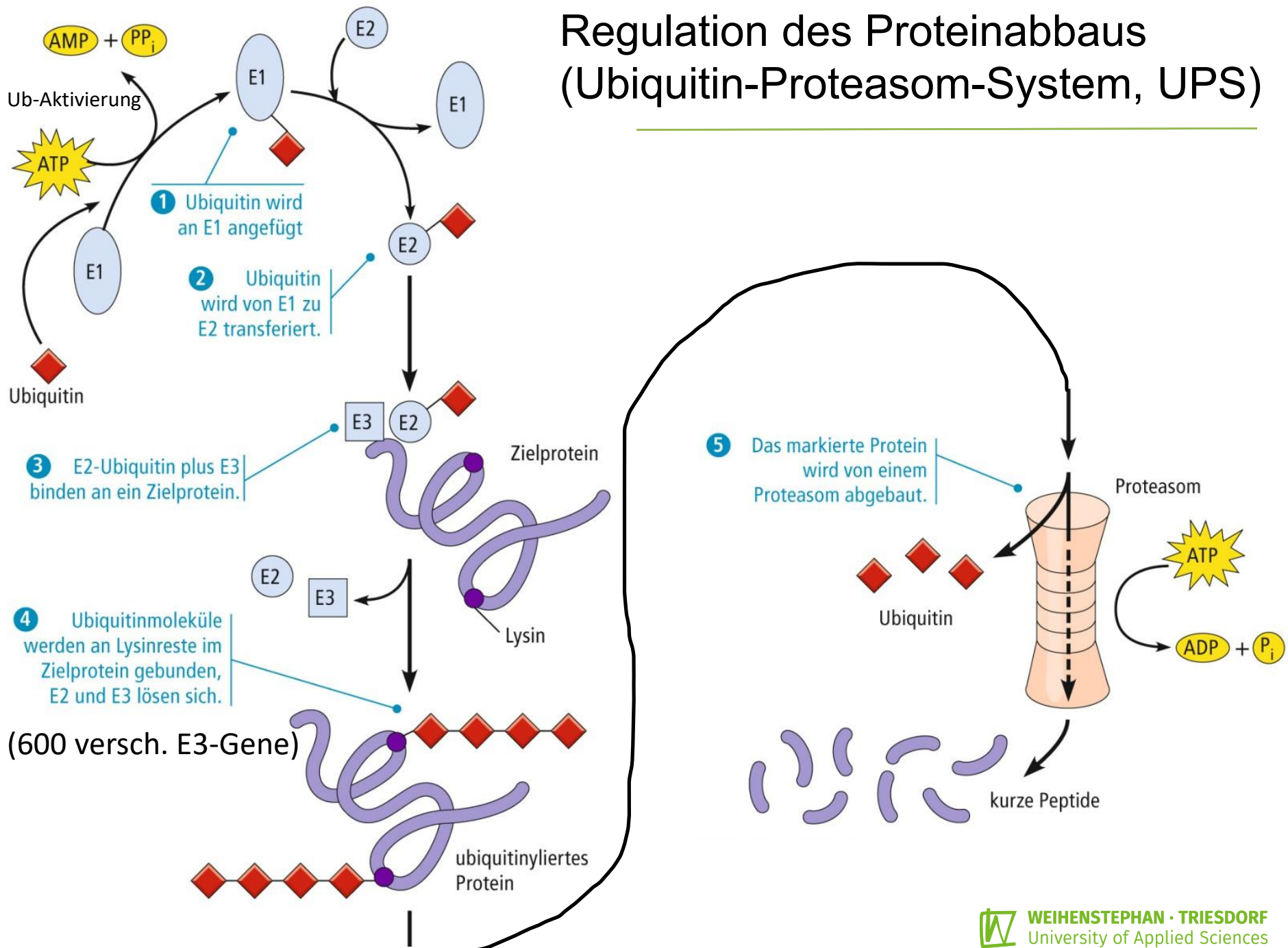


# Exkurs: Ubiquitinierung



- **Unterscheidung:** Mono-, Oligo-, Multi- bzw. Poly-Ubiquitinierung
- **Mono- bis Multi-Ubiquitinierung:** beeinflusst intrazelluläre Verteilung und Interaktion mit anderen Proteinen (Bsp. Einfluss auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren)
- **Poly-Ubiquitinierung** kennzeichnet für Abbau über Proteasom (Lysin 48) oder Lysosom (Lysin 63) für Abbau im Lysosom  
(Bei der Polyubiquitinierung kann die Verknüpfung der Ubiquitine miteinander über 7 verschiedene Lysinreste des Ubiquitins erfolgen: K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63. Je nach dem, welche Reste für die Bindung genutzt werden, entstehen Ketten mit unterschiedlicher Struktur. K = Lysin)

# Regulation des Proteinabbaus (Ubiquitin-Proteasom-System, UPS)



# Regulation des Proteinabbaus (Ubiquitin-Proteasom-System, UPS)

---

Enzymkaskade (E1-, E2- und E3-Enzyme) baut Ubiquitinierung des Zielproteins auf:

1. E1 aktiviert Ubiquitin (ATP-abhängig)
2. E2 trägt aktiviertes Ubiquitin
3. E3-Ligase überträgt Ubiquitin auf Lysin des abzubauenen Proteins  
(**E3 ist spezifisch für Zielprotein**)

## **Vorteil der Kaskade:**

- Signalverstärkung dadurch, dass E1 viele E2 aktivieren kann
- Spezifität durch verschiedene E3 (Es gibt wenige E1, aber > 600 E3)

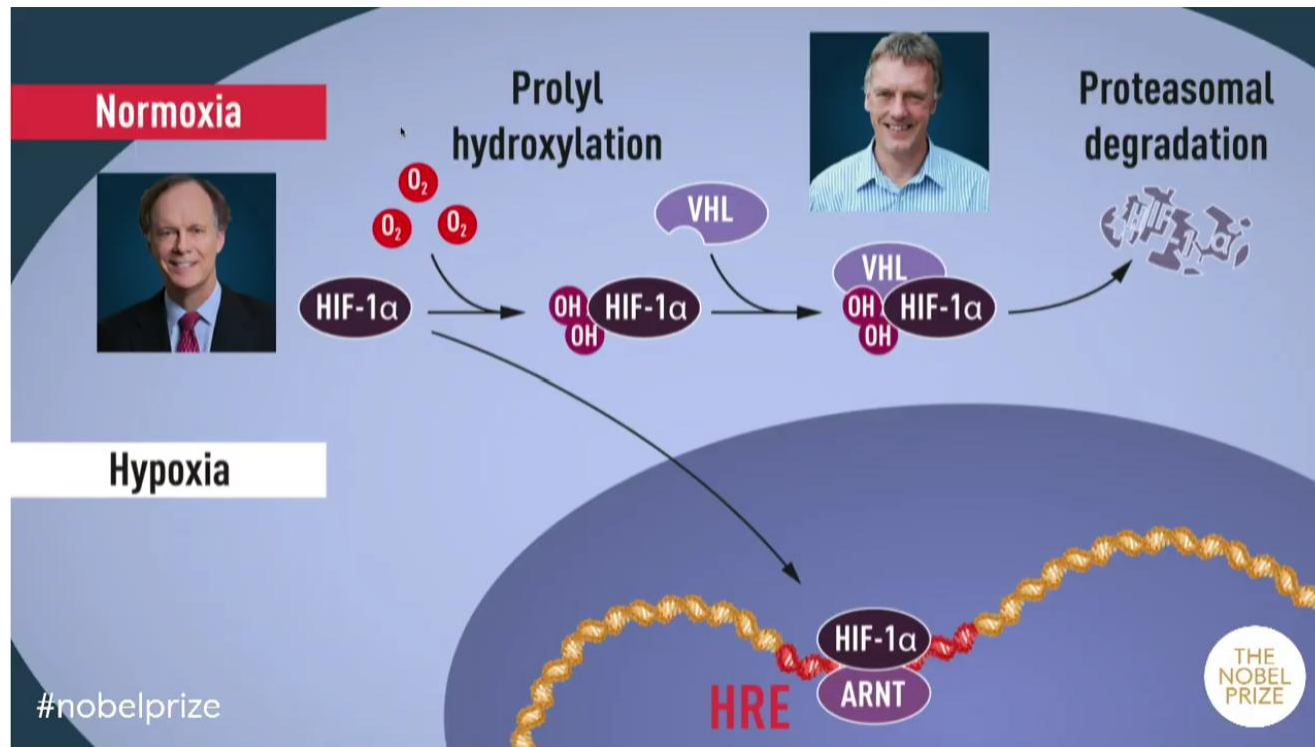
# Nobelpreis für Medizin 2019: Sauerstoffversorgung von Zellen

Preis für die Entdeckung molekularer Mechanismen, mit denen Zellen den Sauerstoffgehalt wahrnehmen



# HIF1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor 1-alpha)

- Masterregulator der Hypoxie (Transkriptionsfaktor, der Gene (>300, z.B. Erythropoetin/Epo) anschaltet, wenn nicht genug Sauerstoff vorhanden ist)



RNA-Typ	Funktion
	Übermittelt die Information der Aminosäuresequenz von der DNA zum Protein
	Dient als Adaptermolekül bei der Proteinsynthese, übersetzt mRNA-Codons in Aminosäurereste
	Spielt katalytische (Ribozym) und strukturelle Rollen im Ribosom
	Vorstufe der reifen mRNA/rRNA/tRNA vor der Prozessierung. Manche Introns haben Ribosomaktivität und katalysieren ein Selbstspleißen.
	Strukturelle und katalytische Rolle im Spleißosom (Multimolekülkomplex aus Protein und RNA, der das Spleißen der Prä-mRNA durchführt).
	Regulatorische RNA bei RNA-Interferenz



# Zusammenfassung: Translation

---

- Die **Translation** bedient sich Aminosäure-tragenden tRNAs, die über **Codon-Anticodon Interaktion** mit der RNA an den Ribosomen paaren. Ribosomen koordinieren: **Initiation, Elongation, Termination** (→ vgl. Ablauf). Die Peptidbindung wird von der rRNA der großen Untereinheit katalysiert (Ribozym).
- Proteinstabilität bestimmt die Halbwertszeit des Proteins. Schlüsselproteine sind meist instabil, sodass Effekte auf die Transkriptions- und Translationsprozesse gravierender sind.
- **Proteasome** sind große Multiproteinkomplexe, die Proteine erkennen (Ubiquitinkette) und abbauen. Damit werden falsch gefaltete, funktionslose Proteine entsorgt (Qualitätskontrolle), aber auch durch gezielten Abbau zelluläre Prozesse verändert (Effekte von HIF1 $\alpha$ ). Defizit im Abbau von Proteinen führt zu neurodegenerativen Erkrankungen oder Tumoren.