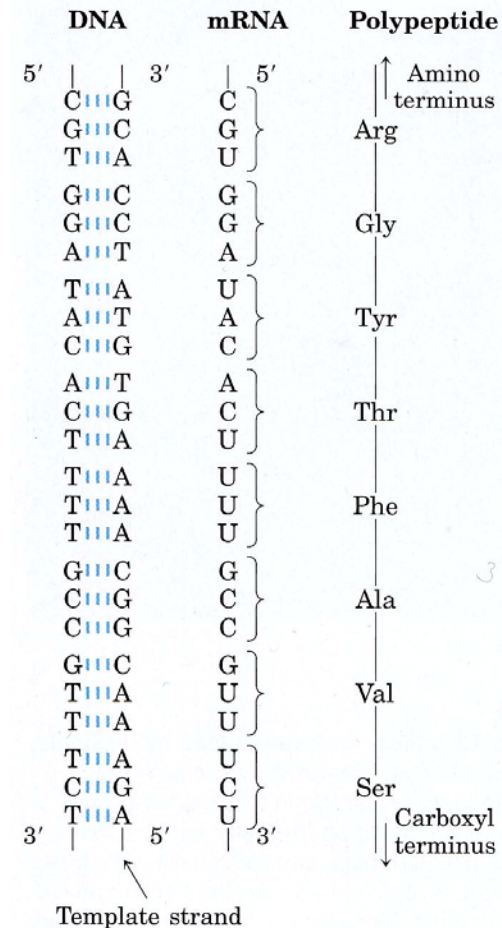

Proteinbiosynthese

Prof. Dr. Albert Duschl

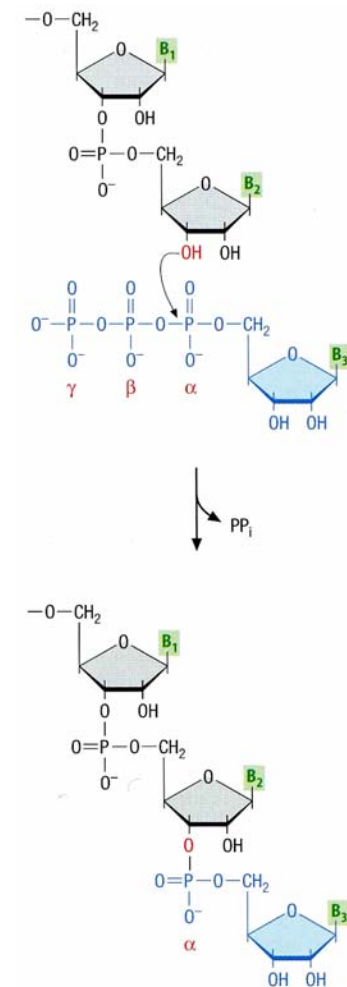
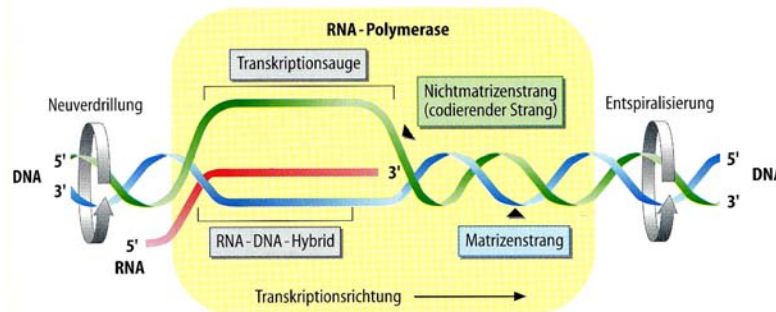
DNA/RNA/Protein

- Im Bereich von Genen sind die beiden Stränge der DNA nicht funktionell äquivalent, weil nur einer der beiden Stränge transkribiert, d.h. in RNA übersetzt wird.
- Der Strang, der als Matritze der RNA-Synthese dient, heisst Template Strang = antisense strand = - (minus) strand.
- Der zweite Strang, dessen Sequenz mit der der RNA übereinstimmt, heisst kodierender Strang (coding strand) = sense strand = + (plus) strand.
- Die RNA wird 5' → 3' synthetisiert und daher von einem 3' → 5' laufenden DNA-Strang abgelesen.



RNA-Polymerasen

- Chemisch erfolgt die RNA-Synthese wie die DNA-Synthese: Die OH-Gruppe am C-Atom 3 der Ribose (bzw. Desoxyribose) greift die Bindung zwischen α - und β -Phosphat eines Nukleotid-Triphosphats an, das nun in einer Kondensationsreaktion angehängt wird.
- Im Unterschied zu DNA-Polymerasen benötigen RNA-Polymerasen keinen Primer.
- Bakterien haben nur eine RNA-Polymerase, Eukaryonten drei: I macht rRNA, II macht hnRNA und III macht tRNA.
- RNA-Polymerasen haben im Gegensatz zu DNA-Polymerasen keine "proofreading" $3' \rightarrow 5'$ Exonuklease Aktivität.



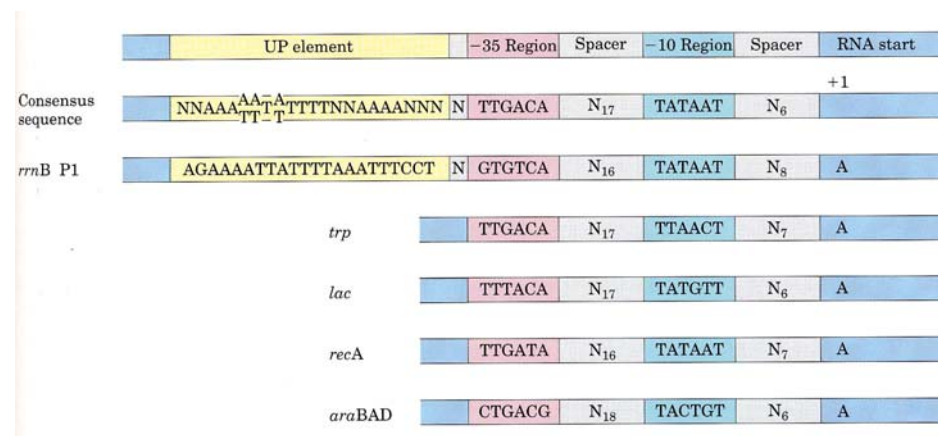
© both figures Löffler/Petrides:
Biochemie und Pathobiochemie

Initiation

- Die Initiation der Transkription geschieht am Promotor (engl. Promoter), der die Initiation an dieser spezifischen Stelle erlaubt. Die RNA Synthese beginnt weiter 5' als die codierende Sequenz des eigentlichen Gens, so daß am 5'-Ende der RNA zunächst nicht codierende Bereiche liegen.
 - Der Promotor ist ein DNA-Abschnitt mit Bindungsstellen für die Transkriptionsmaschinerie, also RNA Polymerase plus weitere Proteine.
 - Im Bereich des Promotors liegen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Deren Aufgabe ist die Regulation der Transkription: Nur wenn die richtigen Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich gebunden sind, kann das Gen abgelesen werden.
 - Weiter entfernt liegende DNA-Bereiche können ebenfalls Transkriptionsfaktoren binden, die Transkription fördern (Enhancer) oder unterdrücken (Suppressor). Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren wird reguliert, oft über Signalwege von verschiedenen Rezeptoren.
 - "Housekeeping"-Gene können ziemlich gleichmässig transkribiert werden, weil sie auf einem konstanten Niveau benötigt werden. Beispiele sind Aktin und GAPDH.
-

Promotorelemente

- Promotorelemente liegen 5' und 3' vom Transkriptionsstart. Bei *E. coli* erfolgt RNA-Polymerase-Bindung zwischen -70 und +30
- Ca. 10 bp aufwärts vom Start liegt eine konservierte Region mit dem Konsensus TATAAT (TATA-Box).
- Ca. 35 bp aufwärts liegt eine weitere konservierte Region mit dem Konsensus TTGACA.
- Noch weiter aufwärts liegt bei hoch exprimierten Genen eine AT-reiche Sequenz (UP-Box).
- Die Sequenz und Position der Promotorelemente bestimmt wie "stark" ein Promotor ist.



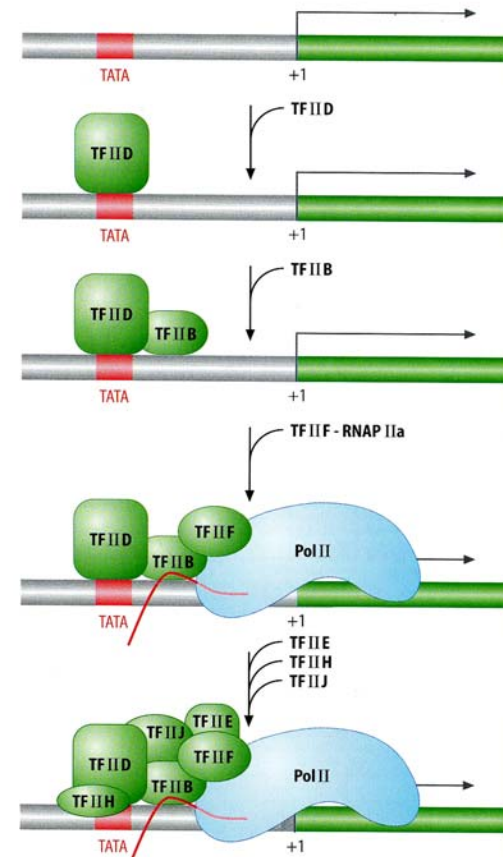
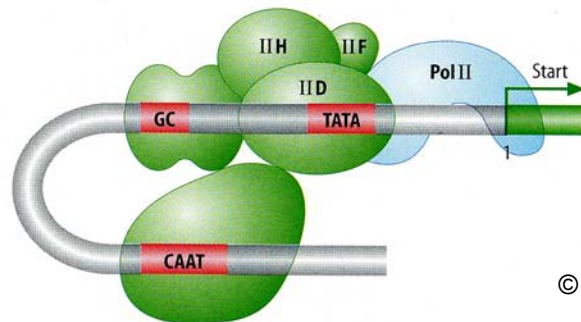
Promotoren von *E. coli* Genen

© Nelson/Cox: Lehninger Principles of Biochemistry

Achtung: Alle diese Elemente können in Einzelfällen auch fehlen. Es gibt durchaus Promotoren z.B. ohne TATA-Box.

Transkriptionsfaktoren

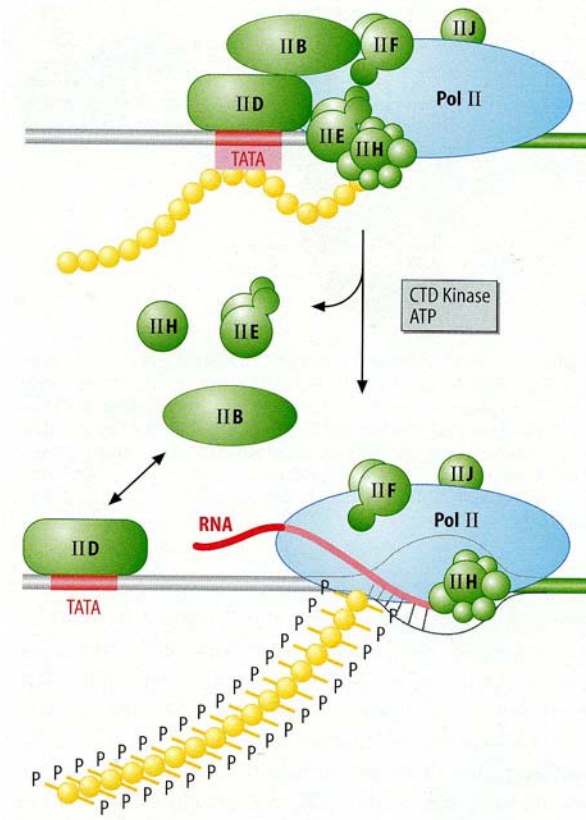
- Bakterielle RNA-Polymerasen können alleine an Promotoren binden, eukaryontische benötigen dafür zusätzlich Transkriptionsfaktoren.
- Der Komplex aus Pol II und den assoziierten TF wird RNA Polymerase II Holoenzym genannt.
- Pol I und Pol III interagieren mit anderen TF und sind etwas einfacher reguliert.
- Transkriptionsaktivatoren und -suppressoren binden an entfernte DNA-sites, interagieren aber mit dem Holoenzym.



© both figures Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie

Elongation und Termination

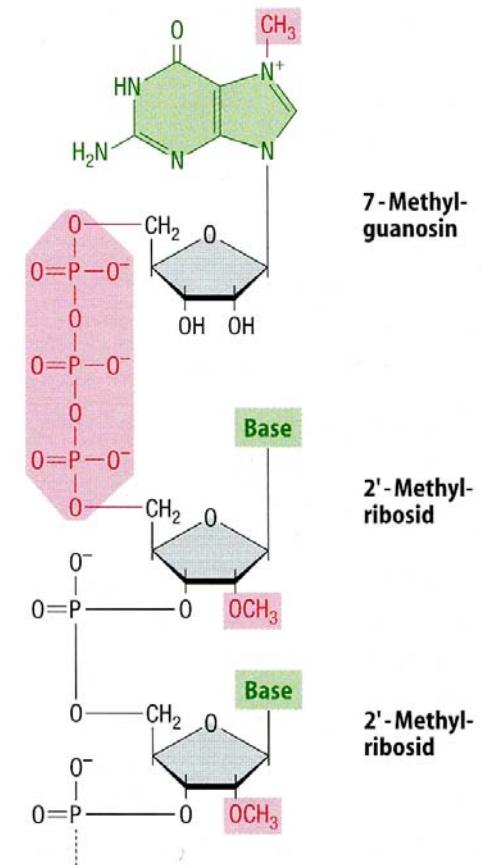
- Zur Elongation wird Pol II am C-Terminus S/T-phosphoryliert. Dort liegt ein repetitives Heptapeptid vor (YSPTSPS) dessen Phosphorylierung bewirkt, daß sich Pol II von der Initiationsstelle ablöst.
- Bei Beginn der Elongation dissoziieren auch die meisten TF ab.
- Die Terminationsstelle wird durch ein Stop-Codon definiert, aber zusätzlich tauchen palindrome Sequenzen auf, die Ausbildung von Haarnadelstrukturen zulassen. An diese Strukturen können Terminationsfaktoren binden.
- Der Terminationsmechanismus von Pol II ist noch nicht genau aufgeklärt. Für Bakterien sind die Faktoren ρ und τ bekannt.



© Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie

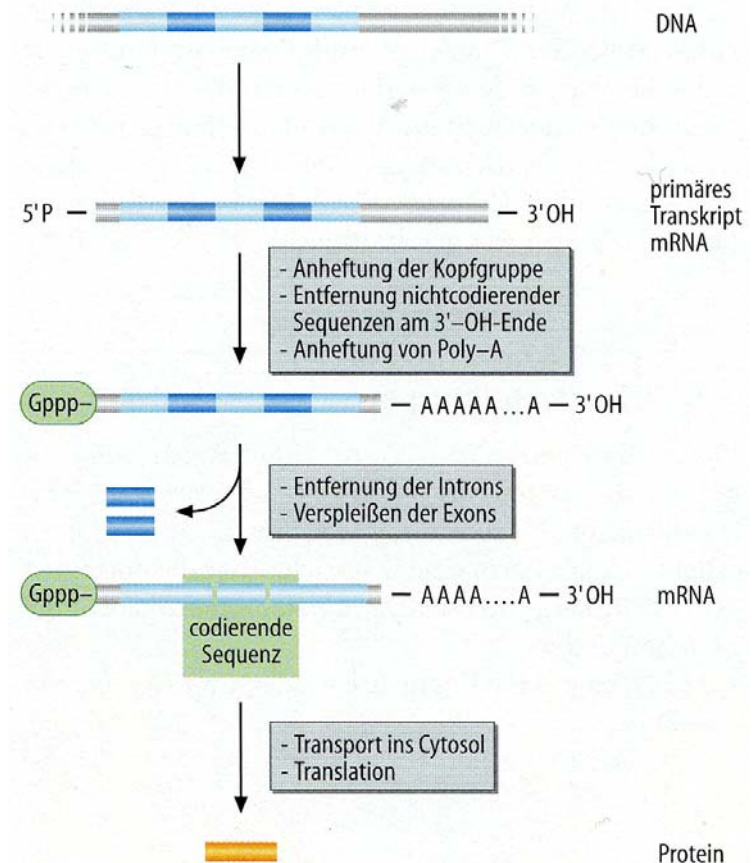
RNA-Modifikationen 1

- Das primäre RNA-Transkript wird bei Eukaryonten auf drei Arten modifiziert:
 - Anheften einer Kopfgruppe (Cap) am 5'-Ende.
 - Verkürzung des 3'-Endes und Anhängen eines Poly-A-Endes.
 - Herausschneiden nicht codierender Sequenzen (Splicing).
 - Durch diese Veränderungen entsteht aus der **hnRNA** (heavy nuclear oder heterogeneous nuclear RNA) die **mRNA** (messenger RNA).
-
- Cap: Es wird ans 5'-Nukleotid 7-Methyl-GTP angehängt und häufig werden auf die folgenden Nukleotide Methylgruppen von S-Adenosyl-Methionin übertragen.
 - Diese Veränderungen schützen das 5'-Ende vor Abbau und bewirken Transport der reifen RNA aus dem Kern ins Cytoplasma. Das 7-Methyl-GTP wird auch für die Lokalisierung am Ribosom benötigt.



RNA-Modifikationen 2

- Fast alle eukaryontischen (aber nicht bakteriellen) Gene enthalten Introns: Nicht codierende Sequenzen die aus dem primären Transkript entfernt werden müssen.
- Die codierenden Sequenzen heissen Exons.
- Das Entfernen der Introns nennt man Splicing. Verantwortlich sind snRNPs (enthalten **snRNAs**).
- Das 3'-Ende wird verkürzt bis zu einem Polyadenylierungssignal. Dort bindet dann eine Polyadenylat-polymerase, die den poly-A-Tail anhängt.
- Poly A schützt das 3' Ende vor Abbau und definiert ihr Alter für den späteren Abbau.



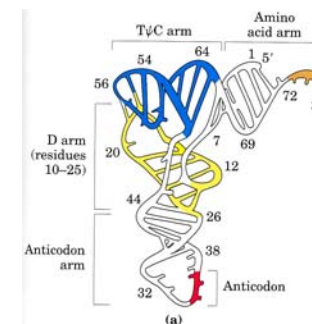
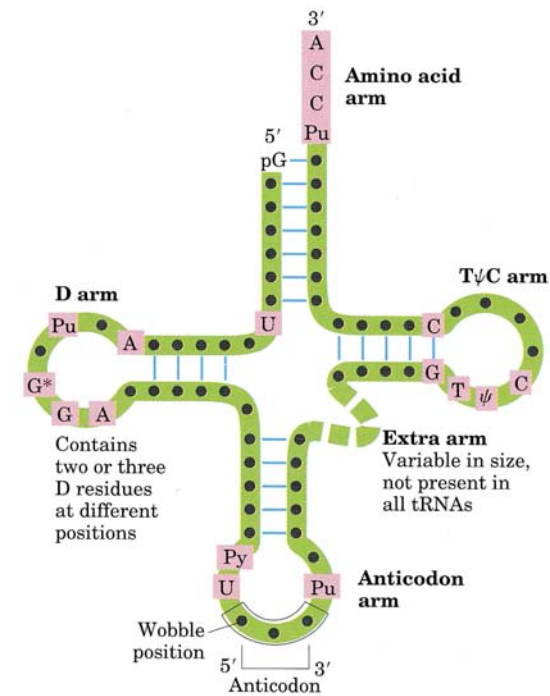
Initiation der Translation

- Transkription startet nicht am 5'-Ende der mRNA, das ja wegen des Cap ohnehin nicht ablesbar ist.
- Der Translationsstart wird von dem Codon AUG markiert (Met bzw. Start) oder bei Bakterien selten auch von einem GUG (Val) Codon.
- 5' von diesem Start-Codon liegt eine Purin-reiche Sequenz von etwa 10 bp, die Shine-Dalgarno-Sequenz. Sie definiert das nachfolgende AUG als Start-Codon.
- Bei Eukaryonten gibt es keine Shine-Dalgarno-Sequenz, sondern es wird das erste AUG von 5'-Ende her verwendet.



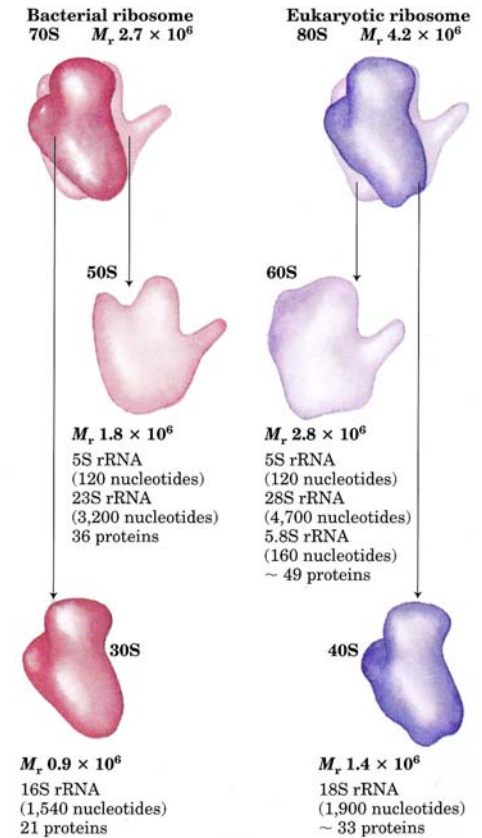
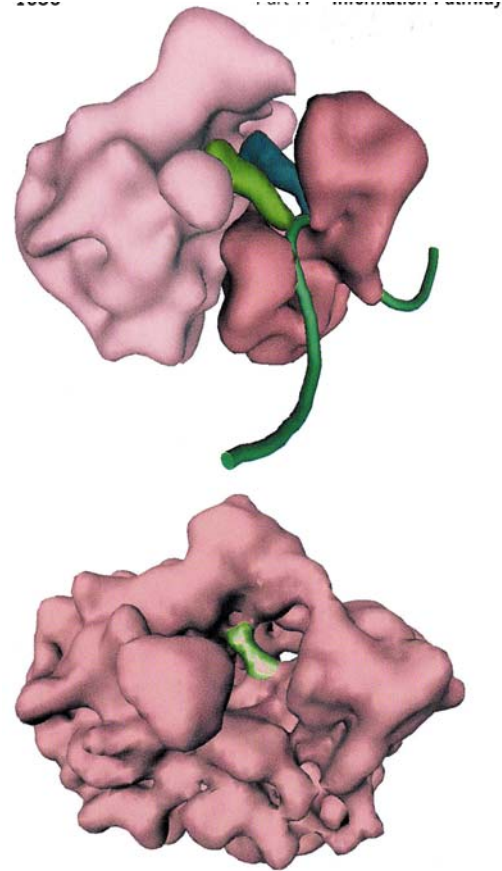
tRNA

- Für die Übersetzung des DNA-Codes in eine Aminosäureabfolge sind **tRNAs** verantwortlich (transfer RNAs).
- tRNA bindet ein spezifisches Codon und an einer anderen Stelle die dazugehörige Aminosäure.
- tRNAs enthalten seltene Nukleotide, die durch Modifikation entstehen, z.B. ψ (Pseudouridin), I (Inosin), T (Ribothymidin), m^1G (1-Methylguanosa).
- Am 3' Terminus wird die Aminosäure angehängt.
- Das Anticodon paart mit dem passenden Codon der mRNA.
- Die 3. Position hat z.T. keine strenge Basenpaarung mehr. Dadurch können mehrere Codons von gleichem Anticodon erkannt werden (Wobble).
- Die betreffenden Codons codieren die gleiche Aminosäure.



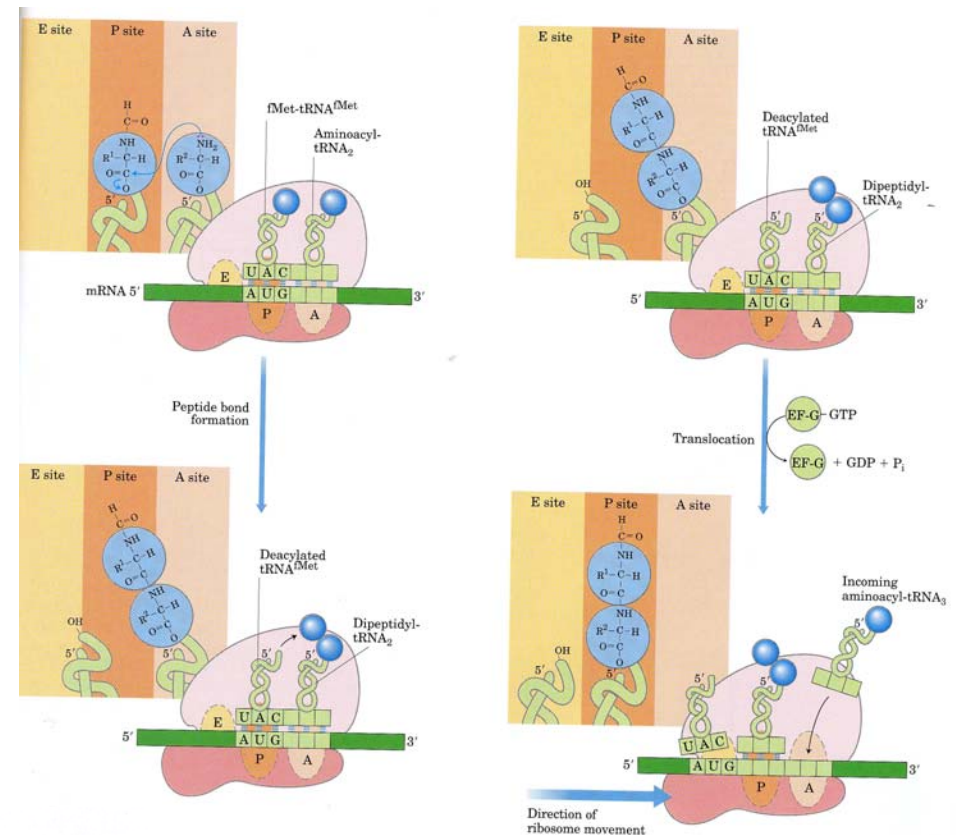
Ribosomen

- Ribosomen sind die Orte des Proteinbiosynthese (= Translation).
- Sie bestehen aus **rRNA** (ribosomaler RNA) und Proteinen.
- 70 S Ribosomen gibt es in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten.
- 80 S Ribosomen liegen im Cytoplasma vor.
- S: Svedberg-Einheiten, bestimmt nach der Sedimentationsgeschwindigkeit in der Ultrazentrifugation.



Translation

- Bakterielle Proteine beginnen in der Translation immer mit einem N-Formylmethionin (fMet), eukaryontische mit Met. In beiden Fällen wird aber eine spezifische tRNA verwendet.
- Das Ribosom hat 3 Bindungsstellen: Die A oder Aminoacyl Site, die P oder Peptidyl Site und die E oder Exit Site.
- Es gibt spezifische Initiations- und Elongationsfaktoren, sowie Release Faktoren die die Translation beenden, das Ribosom spalten und das neue Peptid freisetzen.



© Nelson/Cox: Lehninger Principles of Biochemistry

Folding und posttranslationale Modifikation

- Nach der Translation muß das Protein die korrekte Raumstruktur finden, wobei Hitzchock- und andere Hilfsproteine die Faltung erleichtern.
- Häufig werden das N-terminale Met oder f-Met und ev. weitere Aminosäuren enzymatisch entfernt. Bei 50% der eukaryontischen Proteine wird an die N-terminale Aminosäure eine Acetylgruppe angehängt. Auch der C-Terminus kann modifiziert werden.
- Einzelne Aminosäuren können verändert werden, so daß seltene Aminosäuren im Protein auftauchen.
- Bei sezernierten Proteinen wird die Signalsequenz entfernt, nachdem sie den Transport ins ER vermittelt hat. Im ER werden ggf. Kohlenhydrate angehängt.
- Es können Fettsäuren angehängt werden oder prosthetische Gruppen, andere Proteine werden durch Proteolyse oder Modifikation von Disulfidbrücken verändert.



© Panagl/Schweiger: Die Fledermaus.
Die wahre Geschichte einer Operette

Proteinsynthese
ist ganz schön anstrengend