

# Translation

---

## Orientierung

- alle Organismen verwenden den gleichen genetischen Code (universeller Code), auch der Translationsapparat ähnelt sich in seinen grundlegenden Komponenten
- tRNA für Zusammenhang zwischen Codon und AS
- Proteinbiosynthese verläuft in drei Phasen: Initiation, Elongation, Termination
  - Regulation v.a. über Initiation (physiologisch meist Kinasen, von extern zB Antibiotika oder Exotoxine)

## Der genetische Code

- je drei der vier Nucleinsäurebasen der mRNA (A, U, G, C) bilden ein Codon für eine AS
  - 64 mögliche Codons, davon 61 für AS und drei Stoppcodons
  - degenerierender Code: Zahl der kodierenden Codons wesentlich größer als Zahl der zu kodierenden AS -> bis zu 6 Codons pro AS (außer Methionin und Tryptophan)
  - Codons werden von Anticodons der tRNA erkannt
  - 21. AS: Selenocystein, wird am Ribosom direkt ins aktive Zentrum einiger Oxidoreduktasen eingebaut
    - Bildung aus Serin durch enzymatische Umwandlung einer tRNA<sup>Sec</sup> -> Sec-tRNA<sup>Sec</sup> bindet an Ribosom und erkennt UGA, wenn es in der Nähe eine Haarnadelstruktur gibt (selenocysteine insertion sequence, SECIS; bei Eukaryonten meist im 3'-UTR)
  - 22. AS: Pyrrolysin, wird per Pyrrolysyl-tRNA an UAG in Methylaminotransferasen eingebaut -> Bedingungen wie bei Selenocystein
- geringe Abweichungen vom universellen Code wurden bisher nur in Mitos und Ziliaten gefunden
- Codon AUG: für Methionin; in bestimmtem Kontext Startcodon
  - abhängig von tRNA: Initiator-tRNA<sup>Met</sup> oder Elongator-tRNA<sup>Met</sup>
- Stoppcodons: UGA, UAG, UAA; werden nicht von tRNA, sondern von Terminationsfaktoren (Proteine) erkannt
- Missense-Mutationen: Basenaustausch bleibt wegen des degenerierenden Codes meistens ohne Folgen („stumm“), kann aber auch zum Einbau anderer AS führen (Missense)
  - Missense tritt auch bei Insertion / Deletion auf (Triplet-Codons!), außer bei Veränderung von drei Basen bzw. einem Vielfachen von drei
- Nonsense-Mutationen: Punktmutationen, durch die ein Codon zu einem Stoppcodon mutiert, zB UGG (Tryptophan) zu UGA -> vorzeitiger Abbruch der Proteinsynthese => verkürztes, funktionsunfähiges Protein, das Zellfunktion stören kann

- => NMD (nonsense-mediated decay) führt zu gezieltem raschen Abbau dieser mRNA
  - Signal: bei Spleißen verbleiben EJC (exon junction complex) an Exon-Exon-Übergängen, die vom ersten translatierenden Ribosom entfernt werden
    - ⇒ bei vorzeitigem Stopp bleiben einige EJC, woraufhin spezifische Nucleasen diese mRNA abbauen

## transfer-RNA

- kleine RNA-Moleküle (75-85 Nucleotide) mit ähnlicher Sekundär- und Tertiärstruktur und vielen modifizierten Nucleosiden
- Adapterfunktion zwischen mRNA-Codon und kodierter AS -> über Anticodon und 3'-Akzeptorende, auf das AS übertragen wird (durch Aminoacyl-tRNA-Synthetase)
- Dekodierung der mRNA durch Basenpaarung zwischen Codon und Anticodon
  - Isoakzeptoren: werden mit der gleichen AS beladen, reagieren aber auf unterschiedliche Codons (da mehrere für eine AS möglich)
  - Wobble-Hypothese: Basenpaarung in erster und zweiter Position streng nach Watson-Crick, aber in der dritten auch andere Basenpaarungen möglich (Wobble-Paare, zB G-U, I-U, I-C, I-A) => Anticodon kann sich mit zwei oder mehr Codons paaren, die sich in der dritten Position unterscheiden -> mit 40-50 tRNA können alle 61 AS-kodierenden Codons abgelesen werden, in Mitos sogar nur 22 verschiedene tRNA
- Aminoacylierung: Übertragung der AS auf 3'-Ende der tRNA; wird durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysiert (spezifisch für AS und tRNA bzw. Isoakzeptoren -> 20 verschiedene)
  - 1.  $AS + ATP \leftrightarrow \text{Aminoacyl-AMP} + PP_i$ 
    - -> Aktivierung der AS: energiereiche Anhydridbindung zwischen AS-Carboxylgruppe und AMP-Phosphorylgruppe (= Adenylat)
    - Spaltung des  $PP_i$  (Pyrophosphat) wird durch Pyrophosphatase gespalten: Gleichgewicht auf dieser Seite
  - 2.  $\text{Aminoacyl-AMP} + tRNA \leftrightarrow \text{Aminoacyl-tRNA} + AMP$ 
    - -> Übertragung des Aminoacylrests auf OH-Gruppe der Ribose des endständigen Adenosinrests der tRNA (Umesterung; Aminoacylrest behält energiereiche Esterbindung!)
    - spontane Wanderung des Aminoacylrestes: 3'-Aminoacyl-Verbindung
  - zwei Klassen an Synthetasen: unterscheiden sich in Struktur des aktiven Zentrums, Art der tRNA-Bindung und übertragen Aminoacylrest entweder auf 2'- oder 3'-OH der tRNA
    - erkennen tRNA oft an Anticodon-Basen und Sequenzen im Akzeptorstamm (Isoakzeptoren weisen hier das gleiche Erkennungsmuster auf)
    - Fehlerrate: 0,1% -> Erkennung meist unproblematisch: AS sind in Molekülgröße und chemischen Eigenschaften hinreichend verschieden,

wenn doch: Editing (Korrekturmechanismus) -> Hydrolyse der inkorrekten Aminoacyl-tRNA: Hydrolyseaktivität der Aminoacyl-tRNA-Synthetase in zweitem aktiven Zentrum

## Ribosomen

- Proteinsynthese im Zytosol an Ribosomen -> Ribozyme, da keine ribosomalen Proteine beteiligt; größtes und einziges mit Polymeraseaktivität
- makromolekulare Ribonucleoproteinpartikel aus zwei UE, mehreren rRNA und vielen, meist kleinen basischen Proteinen
  - Aufbau in Pro- und Eukaryonten ähnlich, aber bei Eukaryonten größere RNA-Moleküle und Proteine, d.h. größere Molekülmasse
  - Mitos: ähneln prokaryontischen, aber deutlich kleinere rRNA und mehr Proteine
  - Kern der UE aus räumlich gefalteter rRNA, außen die Proteine
    - funktionellen Zentren aus rRNA (Dekodierungszentrum, Peptidyltransferasezentrum)
    - Bindungsstellen für Aminoacyl-tRNA (A-Stelle) und Peptidyl-tRNA (P-Stelle), Austrittsstelle für tRNA (E-Stelle -> exit)
    - kleine UE: Codon-Anticodon-Ww
    - große UE: Peptidverknüpfung
- Sedimentationskonstante S (Svedberg): Sedimentationsgeschwindigkeit eines Moleküls/Partikels im Schwerfeld einer Ultrazentrifuge
  - nicht additiv, da abhängig von Größe, Dichte und Gestalt
- Synthese im Nucleolus: Transkription der rRNA-Gene durch RNA-Polymerase I in prä-rRNA mit 28S-, 18S-, 5,8S-Molekülen; 5S-rRNA aus Nucleoplasma durch RNA-Polymerase III
  - spezifische nucleolytische Spaltungen in prä-ribosomalen Partikeln (entstehen durch Anlagerung ribosomaler [Import aus Zytosol] und anderer Proteine)
  - Entstehung der 60S- und 40S-UE im Nucleoplasma, gelangen dann durch Kernporen in Zytoplasma

## Proteinbiosynthese

- Initiation bei Pro- und Eukaryonten unterschiedlich (Regulation!), der Rest vergleichbar
- Prokaryonten: räumlich eng gekoppelte Transkription und Translation -> mRNA kann noch während sie transkribiert wird schon translatiert werden
- Eukaryonten: Transkription im Nucleus, Translation im Zytosol
  - in der Zelle verbleibende Proteine an freie Ribosomen, sekretorische Proteine an Ribosomen am ER (raues ER wegen Ribosomen“knubbeln“) -> Translation ins ER-Lumen, dann Passage durch Golgi-Apparat; dort Modifikation (v.a. Glykosylierung)

- Initiation: Ribosom findet Anfang der mRNA-Sequenz: Initiator-tRNA an AUG-Startcodon in P-Stelle des Ribosoms
- Elongation: zyklischer Vorgang
  - Aminoacyl-tRNA wird mit komplementärem Anticodon an A-Stelle des Ribosoms gebunden und
  - reagiert mit Peptidyl-tRNA der P-Stelle unter Bildung einer Peptidbindung
  - => deacetylierte tRNA in P-Stelle und Peptidyl-tRNA in der A-Stelle
  - Translokation der Peptidyl-tRNA in P-Stelle: mRNA wird um ein Triplet verschoben, deacetylierte tRNA dissoziiert ab
- Termination: mRNA wird so lange verschoben, bis Terminationscodon im Dekodierungszentrum auftritt -> hydrolytische Abspaltung des Proteins von der Peptidyl-tRNA, Freisetzung
- Polysomen: sobald der Initiationsbereich der mRNA wieder frei ist, können weitere Ribosomen andocken und translatieren (Abstand je ca. 80 Nucleotide)
- Initiation bei Prokaryonten:
  - erste Phase: 30S-Initiationskomplex: 30S-UE bindet mRNA und Initiator-tRNA (N-Formylmethionyl-tRNA<sup>fMet</sup>, fMet-tRNA<sup>fMet</sup>, in P-Stelle, Anticodon zu AUG)
    - Shine-Dalgarno-Sequenzen: A- und G-reiche Sequenzen etwa 10 Nucleotide stromaufwärts von AUG -> komplementär zu Sequenz nahe 3'-Ende der 16S-rRNA an 30S-UE: erleichtert Andocken der 30S-UE am Startcodon
    - Initiationsfaktoren IF1, IF2, IF3
      - IF1 stimuliert Funktionen von IF2 und IF3
      - IF2: GTPase -> Bindung der Initiator-tRNA
      - IF3: stabilisiert die freien UE der Ribosomen durch Bindung an 30S-UE, stimuliert Bildung des 30S-Initiationskomplexes, hilft bei Selektion der Initiator-tRNA
  - zweite Phase: Assoziation der 50S-UE -> Bildung eines 70S-Initiationskomplexes
    - Stimulation von IF2 -> GTP-Hydrolyse -> Inaktivierung von IF2 -> Abdissoziation der drei IF vom Ribosom: 70S-Komplex enthält nur noch Initiator-tRNA in der P-Stelle und AUG-Startcodon der mRNA, nächstes Codon in der A-Stelle
- Initiation bei Eukaryonten: über 12 Initiationsfaktoren (eIF)
  - Aufbau der mRNA: m<sup>7</sup>GpppN-5'-UTR-AUG-kodierende Region-3'-UTR-Poly(A)-Sequenz
  - erste Phase: Cap-Bindungskomplex am 5'-Ende aus mehreren eIF und 40S-UE
    - Einleitung: eIF4E, bindet eIF4G (Bestandteil des Initiationskomplexes), wechselwirkt mit eIF3 (mindestens 8 UE; ermöglicht Anlagerung von 43S-Komplex) und bindet Pab1p (Poly(A)-bindendes Protein) -> Kontakt zwischen 5'- und 3'-Ende: „closed loop“, begünstigt Initiation

- 43S-Komplex: 40S-UE, Initiator-tRNA (Met-tRNA<sup>Met</sup>, komplexiert mit eIF2-GTP), eIF3
    - progressive Abbau von Poly(A) verhindert irgendwann closed loop: verminderte Initiationseffizienz, irgendwann Abbau der mRNA
  - zweite Phase: Scanning und AUG-Erkennung -> 43S-Komplex wandert entlang 5'-UTR bis zu AUG (möglich durch eIF4A [Helicase] und eIF4B)
  - dritte Phase: 80S-Initiationskomplex -> Bindung der 60S-UE durch eIF2 (GTP-Hydrolyse) und Abdissoziation der eIF
    - eIF2 benötigt Austauschfaktor eIF2B zur Regeneration (≠ IF2 der Prokaryonten) -> Regulationsansatz
  - Cap-unabhängige Initiation: IRES im 5'-UTR unmittelbar vor kodierender Region (internal ribosome entry site) -> Bildung eines Initiationskomplexes ohne Scanning
    - => Translation kleiner RNA-Viren; unterdrücken 5'Cap-abhängige Initiation durch proteolytische Spaltung von eIF4G
    - aber auch zB Kinasen, die an Regulation von Zellzyklus und Apoptose beteiligt sind
- Elongation: bei Pro- und Eukaryonten ähnlich; durch Elongationsfaktoren (EF bzw. eEF) katalysiert
  - EF-Tu bzw. eEF1 $\alpha$  : beides GTPasen, die in GTP-Form hoch affin Komplex mit Aminoacyl-tRNA bilden (Ternärkomplex), der an A-Stelle des Ribosoms bindet
    - [iz] ist sehr hoch: praktisch gesamte Aminoacyl-tRNA gebunden
    - binden zufällig an Ribosom: entweder passt der Ternärkomplex zu Codon, oder er dissoziiert wieder ab
    - bei Erkennung: Steigerung der GTPase-Aktivität durch Basenpaarung -> (e)EF lässt in GDP-Form los und GDP wird im Cytosol wieder ausgetauscht
      - -> Austauschfaktor EF-Ts bzw. eEF1 $\beta\gamma$
  - nach Loslassen: Aminoacyl-Ende der Aminoacyl-tRNA bewegt sich in Peptidyltransferasezentrum (große UE) -> Peptidverknüpfung: freie  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA reagiert nucleophil mit Carboxyl-C-Atom der Peptidyl-tRNA
    - => energiereiche Esterbindung: exergonische Reaktion, keine weitere Energiezufuhr nötig
    - -> um eine AS verlängerte Peptidyl-tRNA in A-Stelle, deacetylierte tRNA in P-Stelle
    - Peptidyltransferasezentrum: V-Domäne der 23S-rRNA -> Bindungsstellen für Antibiotika, Peptidyl- und Aminoacyl-tRNA
      - davon ausgehend Tunnel bis zur Rückseite der großen UE, darin je 30-40 AS
  - Translokation: beide tRNA und mRNA werden verschoben: neue Peptidyl-tRNA von A- in die P-Stelle, nächstes mRNA-Triplett bindet an A-Stelle;

deacetylierte tRNA wird in E-Stelle verschoben und dissoziiert dann ab, kann aber erneut aminoacyliert werden

- katalysiert durch EF-G bzw. eEF2 -> GTPasen: Bindung an Ribosom und Konformationsänderung des Faktors durch GTP-Hydrolyse bewirken Konformationsänderung des Ribosoms -> Bewegung der tRNA
- Geschwindigkeit: ca. 10 AS / Sekunde
- Genauigkeit: SEHR hoch, durch initiale Selektion und Proofreading
- Termination: bei Stoppcodon hydrolytische Ablösung des Proteins von Peptidyl-tRNA, Freisetzung aus Ribosom
  - katalysiert durch Terminationsfaktoren (release factors RF)
    - Prokaryonten: RF1 erkennt UAG, UAA; RF2 erkennt UGA, UAA
    - Eukaryonten: eRF1 erkennt alle drei
  - (e)RF binden an Stoppcodon in A-Stelle -> Hydrolyse der Peptidyl-tRNA durch Beeinflussung des Peptidyltransferasezentrums
  - (e)RF3: GTPase, beschleunigt Dissoziation der ersten RF nach Hydrolyse
  - nach Freisetzung zerfällt Ribosom in beide UE, wahrscheinlich durch (e)IF3 unterstützt -> binden an kleine UE und stabilisieren sie so
    - Prokaryonten benötigen zusätzlich RRF (ribosome recycling factor) und EF-G
    - Eukaryonten nutzen vorhandene IF und EF

## Regulation der Translation bei Eukaryonten

- Hemmung der Initiation durch eIF2-Kinasen -> Phosphorylierung an  $\alpha$ -UE von eIF2 => eIF2-GDP bildet stabilen Komplex mit Nucleotidaustauschfaktor eIF2B: kein Austausch, keine Regeneration, keine Initiation
  - HRI (heme regulated inhibitor of translation): Kinase, die Translation von Globin-mRNA an Menge des freien Häm anpasst -> ohne freies Häm: Kinase aktiv, Synthese unterdrückt; freies Häm hemmt Kinase als allosterischen Inhibitor, vermehrte Globin-Synthese
  - PKR (RNA-abhängige Protein-Kinase): eIF2-Kinase, durch Interferon induziert: Aktivierung durch doppelsträngige RNA (zB bei Virenreplikation) -> Phosphorylierung von eIF2 hemmt Translation, d.h. Virusvermehrung
  - Hemmung von eIF2 führt auch zur Hemmung aller anderen Translationsvorgänge in der Zelle => lohnt sich eher bei spezialisierten Zellen, zB bei Globin-produzierenden erythropoetischen Zellen
- Protein-Kinasen: über MAP-Kinasen oder PI3-Kinasen an mitogene Stimuli oder Stressfaktoren gekoppelt; phosphorylieren eIF4E, eIF4G, eIF4E-BP -> begünstigte Bildung des Präinitiationskomplexes am 5'-Cap
  - zB stimulierende Wirkung von Insulin über PI3-Kinase
  - mTOR (mammalian target of rapamycin): Kinase wird durch mitogene Stimuli aktiviert und durch Rapamycin (Sirolimus) gehemmt -> zB Immunsuppression nach Organtransplantation

- S6-Kinase: Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 steigert Ribosomenaktivität, hemmt eEF2-Kinase -> eEF2 weniger phosphoryliert, d.h. aktiver
- regulatorische Proteine können an 5'UTR oder 3'UTR binden
  - IRP (iron response element-binding protein) bindet bei niedriger  $[Fe^{2+}]$  an IRE (iron response element, Haarnadel-Struktur in mRNA im 5'UTR nahe Cap) -> kein Initiationskomplex, keine Translation von Ferritin
    - -> Konformationsänderung an IRP bei Eisenmangel: Abgabe eines  $Fe^{2+}$ -Ions aus Eisen-Schwefel-Komplex ( $Fe_4S_4$ ), erhöhte Affinität zu mRNA
    - IRP reguliert auch Expression von Transferrin(rezeptoren), über Bindung an mehrere IRE im 3'-UTR -> Stabilisierung der mRNA gegen Abbau, Begünstigung der Initiation
  - Translationsrepressoren im 3'UTR -> zB bei mRNA, die nur in bestimmten Embryonalphasen translatiert wird / Sequenzen (zB AU-reich), die durch Proteinbindung Stabilität der mRNA gegen Abbau beeinflussen
  - miRNA (Micro RNA) bindet im 3'-UTR an mRNA
    - ca. 22 Nucleotide, teilweise komplementär zu 3'UTR (antisense!)
    - Bildung durch nucleolytische Prozessierung größerer Transkripte
    - Bindung an mRNA führt zur Translationsrepression, teilweise auch zum Abbau (vgl. siRNA)
    - P-bodies: Komplexe aus mRNA, miRNA, Proteinen im Zytosol -> Stilllegung / Abbau von mRNA
    - Kontrolle von Embryonalentwicklung und Zellzyklus
  - myotone Dystrophie: erhöhte Zahl an CTG-Triplets im 3'UTR des Gens für eine cAMP-abhängige Protein-Kinase (1000 oder mehr bei normal 5 bis 30 Wdh)

## Hemmstoffe der Translation

- Antibiotika:
  - meist Inhibitoren der Translation durch Bindung an ribosomale RNA
    - Aminoglykoside (Neomycin, Paromomycin, Gentamicin) an 16S-rRNA der kleinen ribosomalen UE im Dekodierungszentrum -> häufiger Fehler bei Codon-Erkennung
      - Streptomycin (aus anderer Aminoglykosidgruppe) bindet an andere Stelle der 16S-rRNA, hat aber dieselbe Wirkung
    - Hemmstoffe der Peptidyltransferase binden im Peptidyltransferasezentrum der 23S-rRNA der großen UE
    - Thiostrepton: Faktorbindungsstelle der 23S-rRNA: hemmt Translokation durch Blockierung bestimmter Konformationsänderungen des Ribosoms
    - Fusidinsäure: bindet an EF-G, hemmt dessen Dissoziation vom Ribosom -> blockiert weitere Elongation

- Wirksamkeit geht wegen zunehmender Resistenzen zurück
- Exotoxine: Ausscheidung durch pathogene Bakterien, gelangen durch Endocytose in die Zelle
  - -> Hemmung der Proteinsynthese in der Wirtszelle
  - Diphtherietoxin (*Corynebacterium diphtheriae*): greift Translokation an
    - Toxin-A-UE inaktiviert eEF2 durch ADP-Ribosylierung (Cofaktor NAD<sup>+</sup>) an Histidinrest (Diphthamid, für Translokation essentiell)
    - ein einziges Molekül kann Zelle töten
  - Exotoxin A (*Pseudomonas aeruginosa*): wirkt ähnlich
    - -> verursacht u.a. Lungenentzündung, Harnwegs- / Hautinfektionen
  - Shiga-Toxin (Verotoxin, *Shigella dysenteriae*/EHEC-E.coli): A-UE hat N-Glykosidase-Aktivität -> inaktiviert Ribosom durch Abspaltung eines bestimmten Adeninrestes in 28S-rRNA
    - -> verursacht u.a. hämorrhagische Kolitis und hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)
- RIP (ribosome inactivating proteins): toxische Proteine aus Pflanzen, spalten bestimmten Adeninrest aus 28S-rRNA ab und inaktivieren dadurch Ribosomen
  - zB Ricin aus Rizinus-Samen, Viscumin aus Mistel (B-UE [ein Lektin] vermittelt Eintritt der A-UE [N-Glykosidase] in die Zelle)
    - Ricin ist wirksam: 1 mg oral / eingeatmet wirkt tödlich -> nach 4-8 h hohes Fieber, dann Einblutungen in Lunge, Exitus nach 36-70 h
    - relativ hohe Dosis im Vergleich zu hochwirksamen Giften nötig
- $\alpha$ -Sarcin: Pilztoxin, spezifische Endonuclease: spaltet 28S-rRNA an bestimmter Phosphodiesterbindung -> Inaktivierung der Ribosomen