

Molekulární biologie

5. Translace genomu

Translace (překlad): tvorba proteinů na ribozomech podle mRNA

Osnova

Translace bakteriální mRNA

Translace eukaryotické mRNA

Posttranslační procesy

Hlavní zdroje:

S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4

Masarykova Universita Brno

ISBN 80-902562

B. Staveley, Principles of Cell Biology

Memorial University of Newfoundland

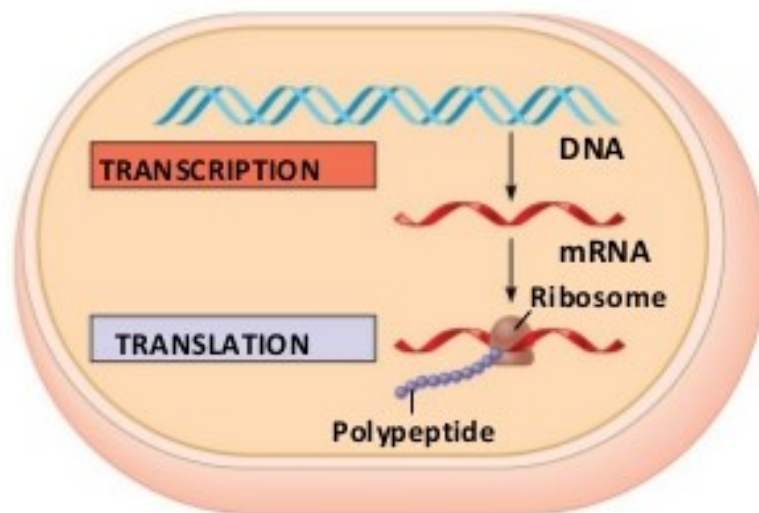
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

M. Muller, Biology of Cells and Organisms

University of Illinois, Chicago

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

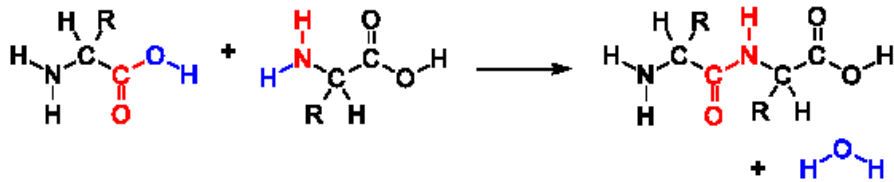
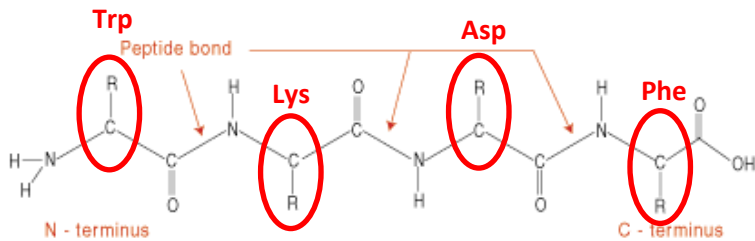
Translace bakteriální mRNA



Část první: Bakteriální translace

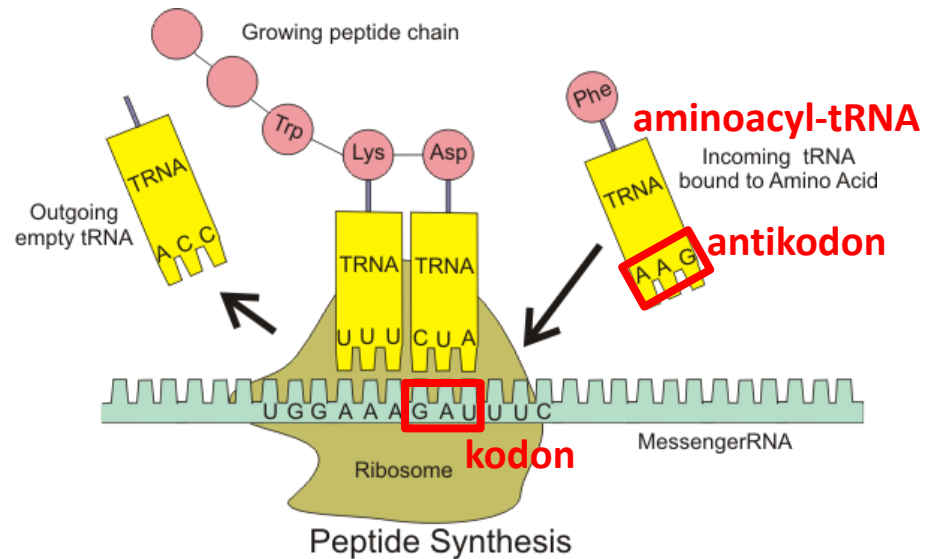
Peptid = krátký řetězec aminokyselin (AA); polypeptid = dlouhý řetězec AA

- na ribozomech se tvoří polypeptidové řetězce za účasti tRNA podle informace obsažené v mRNA
- výchozími látkami je 20 standardních aminokyselin + selenocystein a pyrrolisin
- aminokyseliny se nejprve aktivují enzymem **aminoacyl-tRNA-syntetázou**
- dojde k vazbě aminokyseliny na tRNA a vzniká **aminoacyl-tRNA (aa-tRNA)**
 1. Inicie: tvorba iniciačního komplexu z ribozomů 70S, mRNA a tRNA
 2. Elongace: prodlužování polypeptidového řetězce
 3. Terminace: zakončení syntézy polypeptidového řetězce, signalizováno terminačním kodonem.



Aminokyselinový (poly-peptidový) řetězec (protein)

- AA spojeny peptidovou vazbou mezi -NH₂ a COOH
- rozlišujeme N-konec a C-konec
- na tRNA se váže C-koncem, k řetězci se připojí N-koncem

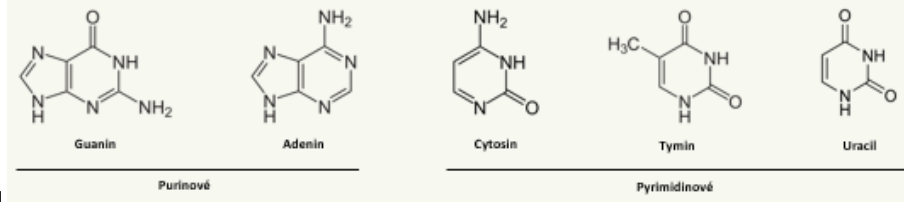


NH₂ - Amin; COOH - karboxylová kyselina

Trp (tryptofan; W; kodon UGG); Lys (lyzín; K; AAA a AAG); Asp (kyselina asparagová; D; GAU a GAC); Phe (fenylalanin; F; UUU a UUC)

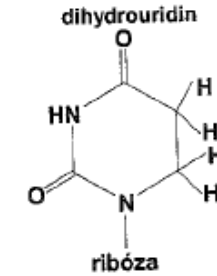
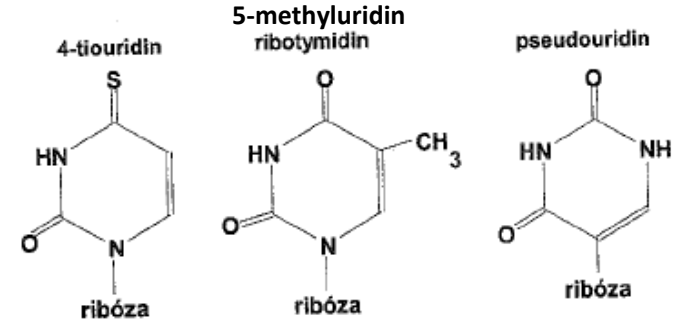
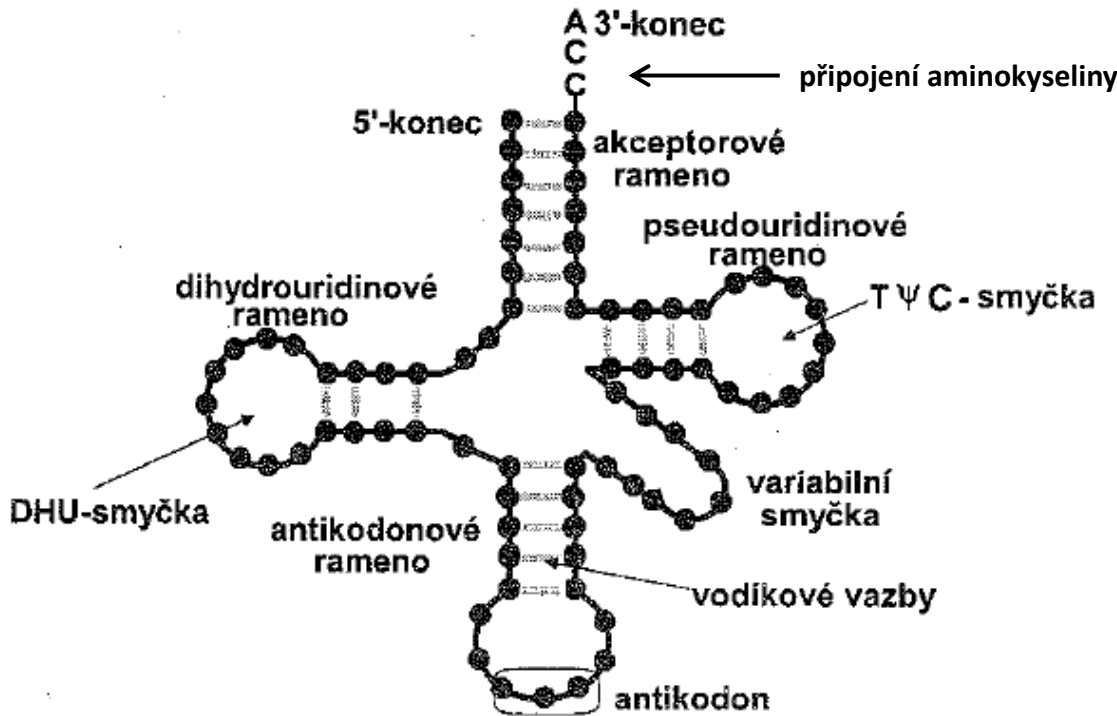
Transferová RNA (tRNA)

- sekvence CCA na 3'-konci
- obsahuje neobvyklé báze - zpřesňují syntézu proteinů
- jednotlivé tRNA uskutečňují přenos jednotlivých aminokyselin (existuje více tRNA pro jednu aminokyselinu)

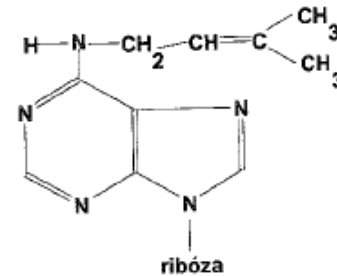


Sekundární struktura - jetelový lístek (komplementární sekvence)

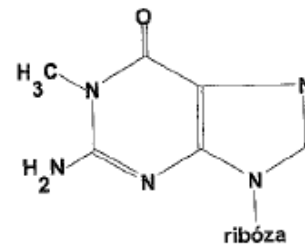
- 4 hlavní ramena
- variabilní smyčka
 - a) krátká (3-5 nukleotidů)
 - b) dlouhá (13-21n., 75%RNA)



N⁶ - izopentenyladenozin



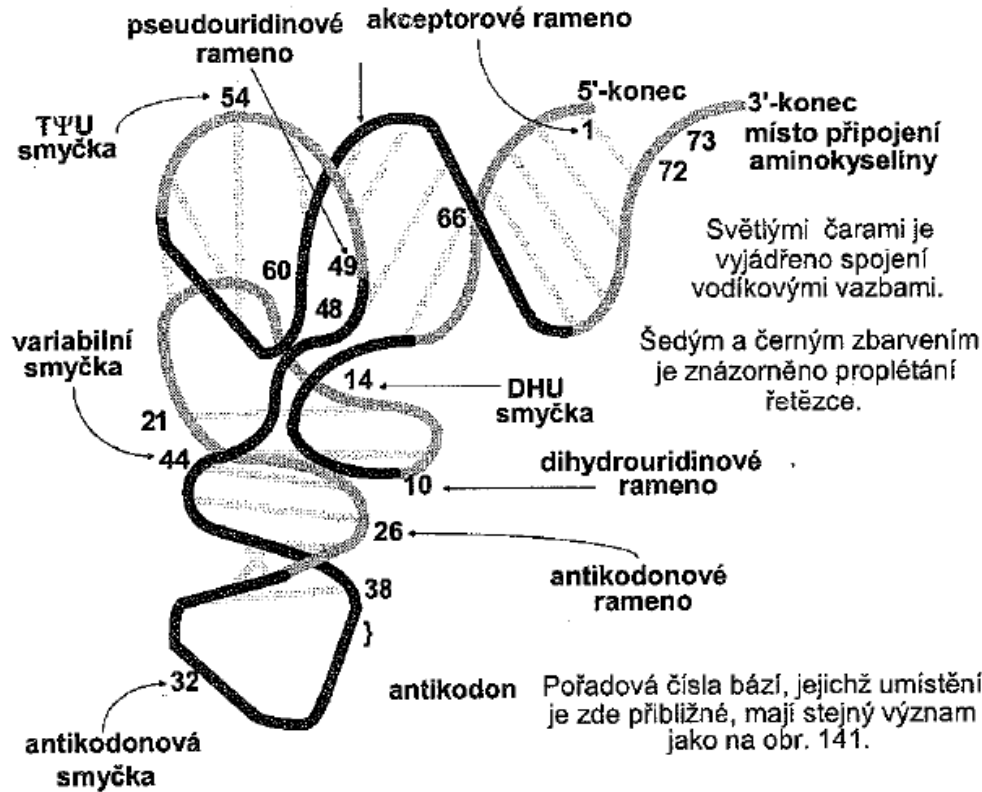
1-metylguanozin



Transferová RNA (tRNA)

Terciární struktura

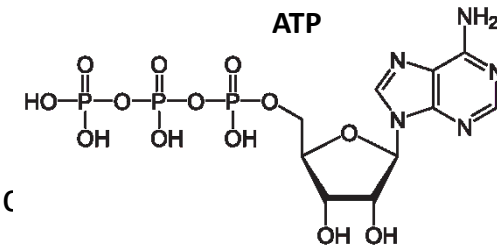
- vodíkové vazby mezi bazemi dihydrouridinového ramena a pseudouridinového ramena



Aktivace aminokyselin

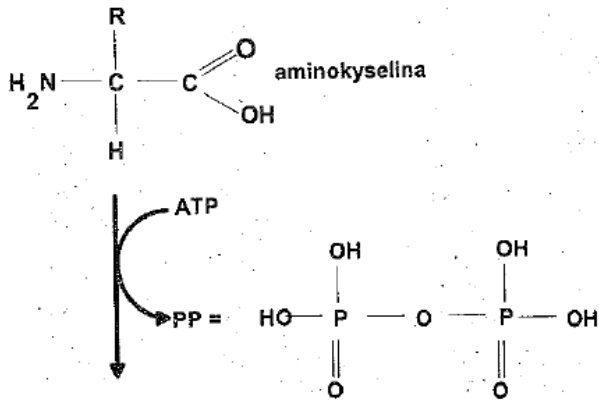
Připojení aminokyseliny (AA) k příslušné tRNA

- ve dvou krocích za katalýzy enzymem aminoacyl-tRNA-syntetázou (esterifikac

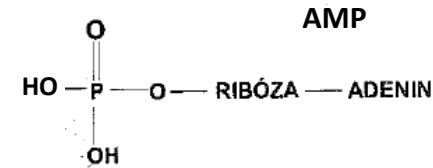


1. AA + ATP \leftrightarrow AA-AMP + PP
2. AA-AMP + tRNA \leftrightarrow AA-tRNA + AMP

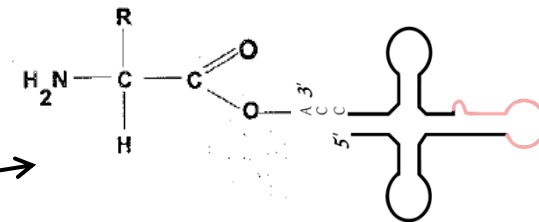
1.



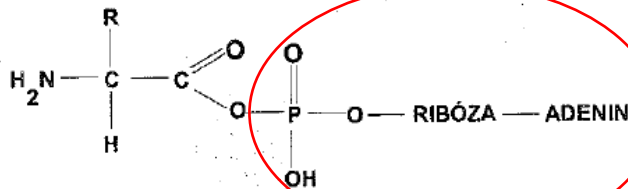
2.



+



aminoacyladenylát



Estery: organické sloučeniny, ve kterých je -OH skupina (např. z karboxylu COOH) nahrazena organickým zbytkem vzniklým z alkoholu po odštěpení vodíku.

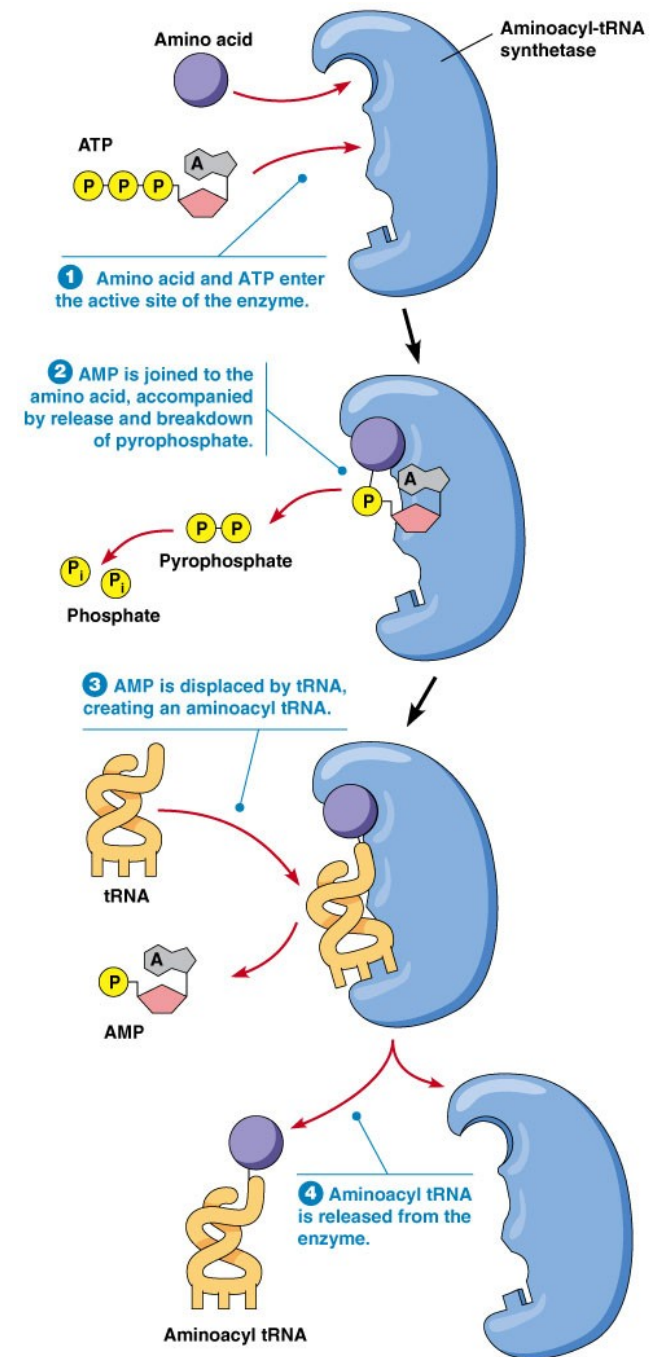
Esterifikace: chemická reakce, při které ester vzniká

Vazebná rozpoznávací místa na enzymu:

1. pro aminokyselinu
2. pro ATP
3. pro tRNA

Aktivace aminokyselin enzymem aminoacyl-tRNA-syntetázou

- AA + ATP vstupuje do aktivního místa enzymu
- ATP ztrácí pyrofosfát (PP) a AMP se kovalentně váže na AA
- PP je hydrolyzován na dvě fosfátové skupiny
- tRNA se kovalentně váže na AA a nahrazuje tak AMP
- AA-tRNA se uvolňuje z enzymu

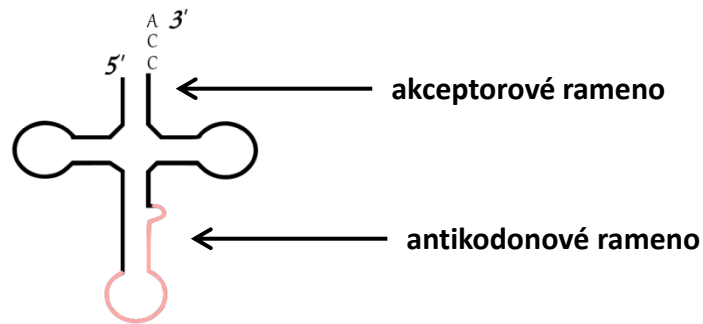


Enzym aminoacyl-tRNA-syntetáza

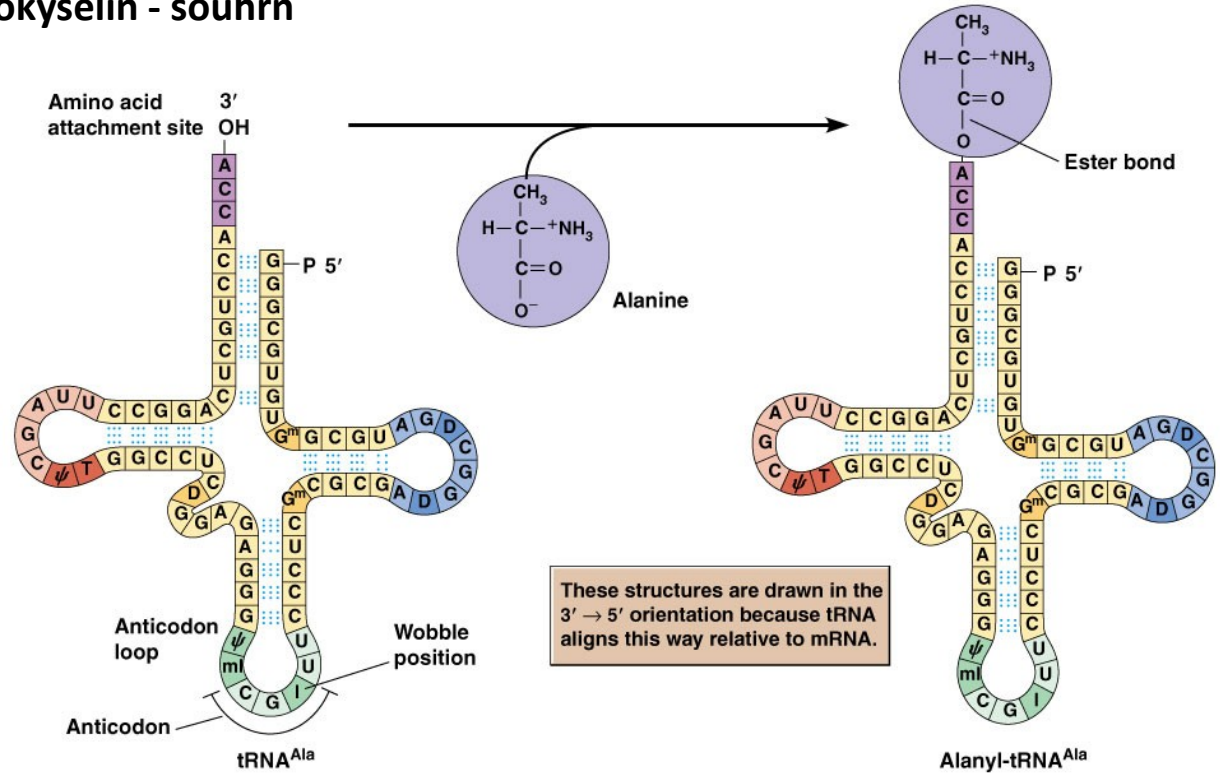
- každá aminoacyl-tRNA-syntetáza je specifická jen pro jednu aminokyselinu a k ní odpovídající varianty tRNA (příbuzné)
- evolučně konzervovaná: 70% homologie mezi bakteriemi a savci
- patří mezi nejstarší enzymy, spjat s vývojem genetického kódu

Vazba enzymu na příslušnou tRNA:

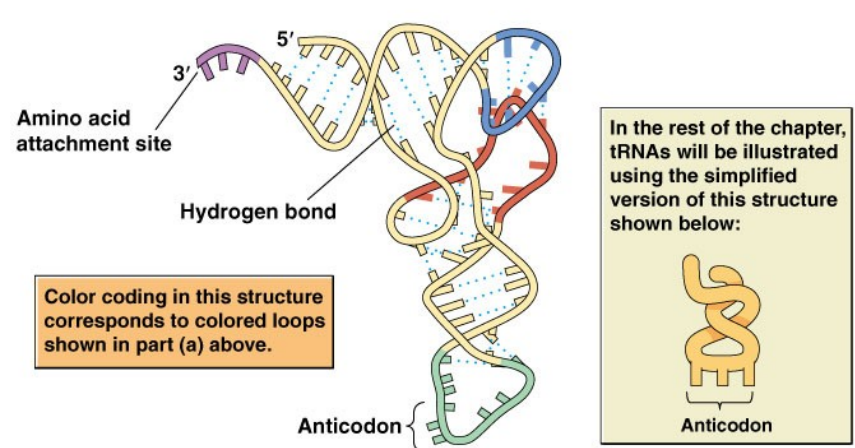
- mimořádně přesná (mutace v jednom nukleotidu způsobí nerozpoznání)
- rozpoznávací místa leží na akceptorovém a antikodonovém rameni



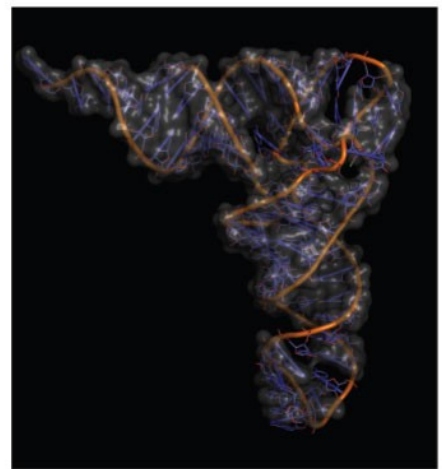
Aktivace aminokyselin - souhrn



(a) Secondary structure of tRNA, before and after amino acid attachment



(b) Tertiary structure of tRNA



Aminokyseliny

Kde se berou?

Syntéza AA probíhá v biochemických drahách za katalýzy enzymy

Ne všechny organismy dokáží syntetizovat všechny AA

Člověk nedokáže syntetizovat 9 z 21 AA (esenciální aminokyseliny)

Esenciální AA přijímá člověk v potravě

Základním kamenem pro aminokyseliny je **dusík** (též pro nukleotidy)

Hlavním problémem v přírodě je získat dusík v použitelné formě; ve vzduchu 78%

Atmosferický dusík N_2 ($N\equiv N$) je relativně inertní a netvoří snadno sloučeniny

Řešení: mikroorganismy redukují atmosferický dusík $N\equiv N$ na amoniak (čpavek, NH_3) a ten pak používají rostliny pro tvorbu aminokyselin

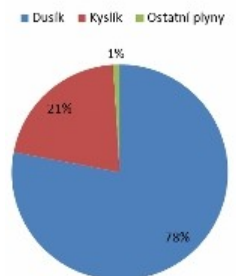
* za určitých patofyziologických podmínek může být syntéza těchto AA omezena

- Fenylketonurie: porucha přeměny fenylalaninu na tyrosin; genetická, mentální retardace

** pyrrolyzin není zahrnut v tabulce, jelikož se nevyskytuje u člověka (zdroj: Wikipedia)

| Essential | Nonessential ** |
|---------------|-----------------|
| Histidine | Alanine |
| Isoleucine | Arginine* |
| Leucine | Aspartic acid |
| Lysine | Cysteine* |
| Methionine | Glutamic acid |
| Phenylalanine | Glutamine* |
| Threonine | Glycine* |
| Tryptophan | Proline* |
| Valine | Serine* |
| | Tyrosine* |
| | Asparagine* |
| | Selenocysteine |

Složení vzduchu



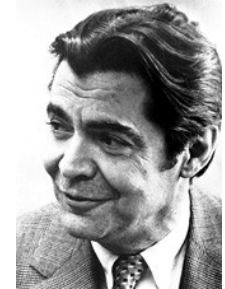
Ribozom

Ribonukleoproteinová částice (rRNA + proteiny)

Funkce: Katalyzuje připojování aminokyselin podle kodu v mRNA

Poprvé popsán rumunským vědcem **Georgem Emilem Paladem** v 1950s

- v elektronovém mikroskopu se jeví jako "husté částice" či "granula"
- r. 1974 obdržel Nobelovu cenu

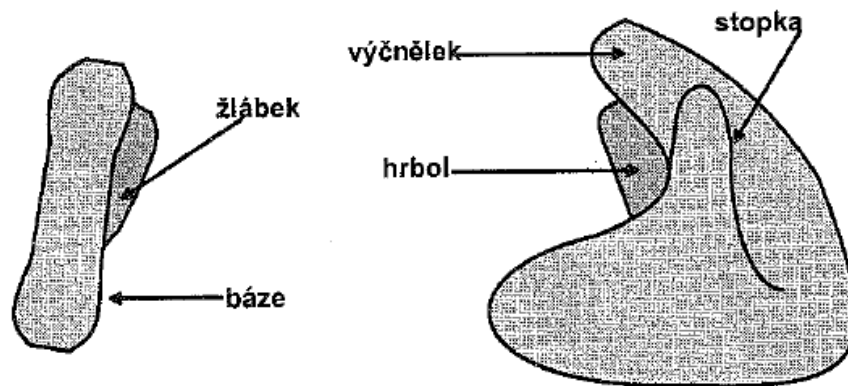


Termín "ribozom" byl navrhnut na konferenci "Syntézy proteinů" r. 1958

During the course of the symposium a semantic difficulty became apparent. To some of the participants, microsomes mean the ribonucleoprotein particles of the microsome fraction contaminated by other protein and lipid material; to others, the microsomes consist of protein and lipid contaminated by particles. The phrase 'microsomal particles' does not seem adequate, and 'ribonucleoprotein particles of the microsome fraction' is much too awkward. During the meeting the word 'ribosome' was suggested; this seems a very satisfactory name, and it has a pleasant sound. The present confusion would be eliminated if 'ribosome' were adopted to designate ribonucleoprotein particles in the size range 20 to 100 S.

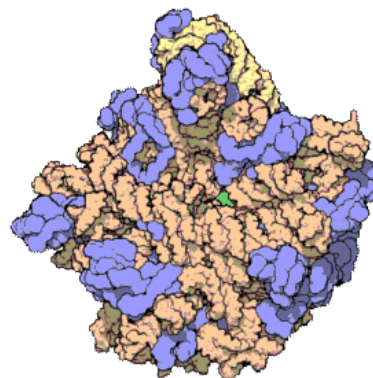
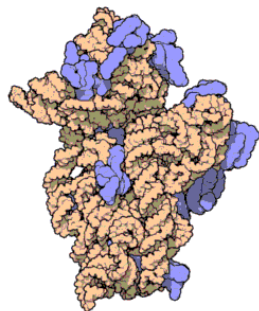
Prokaryotické ribozomy 70S

- Sedimentační koeficient 70S
- Podjednotky: 30S a 50S



Podjednotka 30S

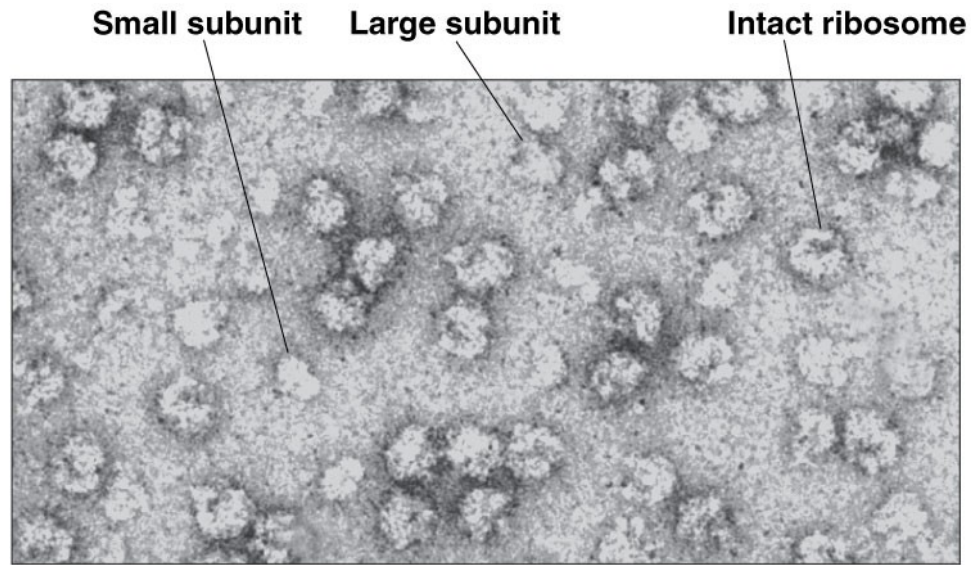
Podjednotka 50S



Proteiny - fialová; rRNA oranžová/žlutá

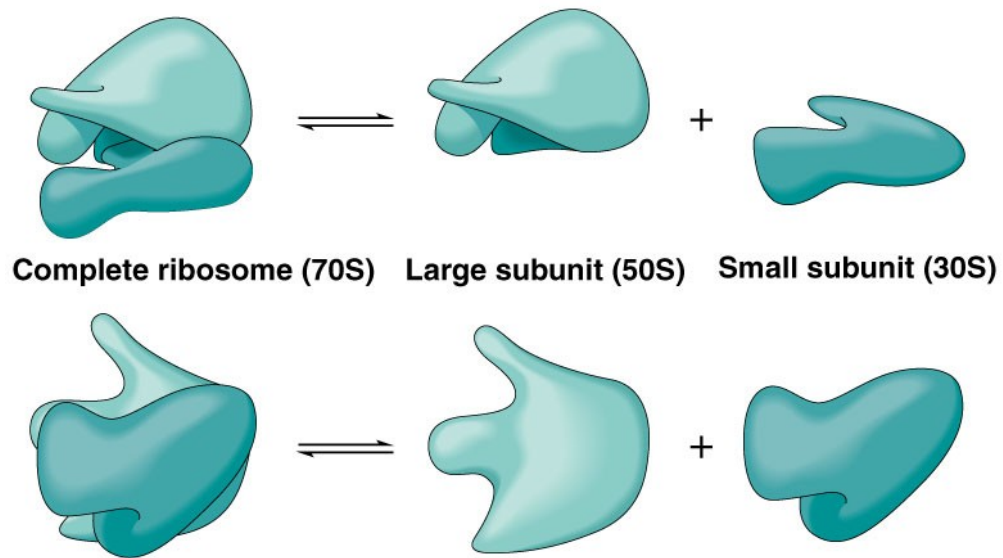
S - Svedberg - sedimentační koeficient

Ribozom



(a) Bacterial ribosomes and free subunits

0.1 μm



(b) Two views of a bacterial ribosome and its subunits

Vazebná místa na prokaryotickém ribozomu

1. pro mRNA

- na podjednotce 30S
- obsahuje proteiny a 3'-konec 16S-rRNA

2. Aminoacylové místo (A-místo)

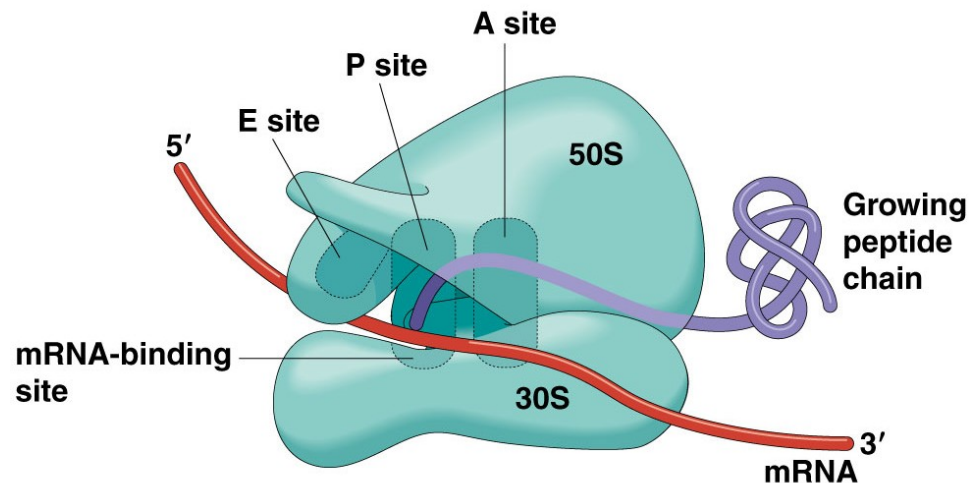
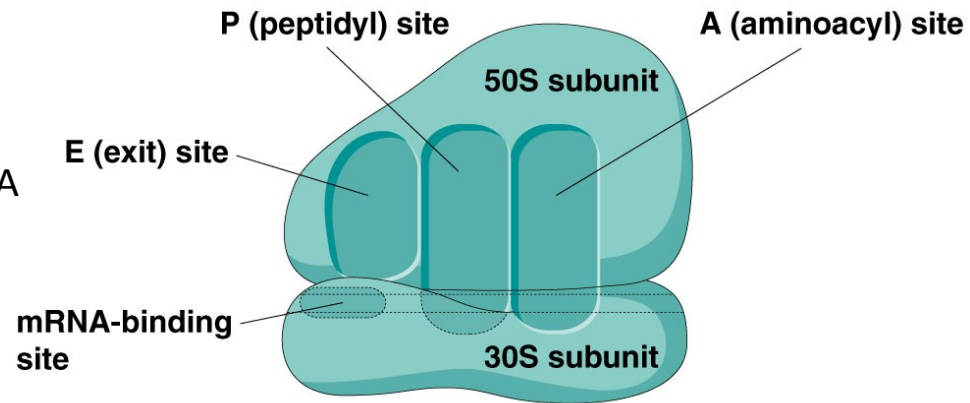
- vazba AA-tRNA
- na obou podjednotkách

3. Peptidylové místo (P-místo)

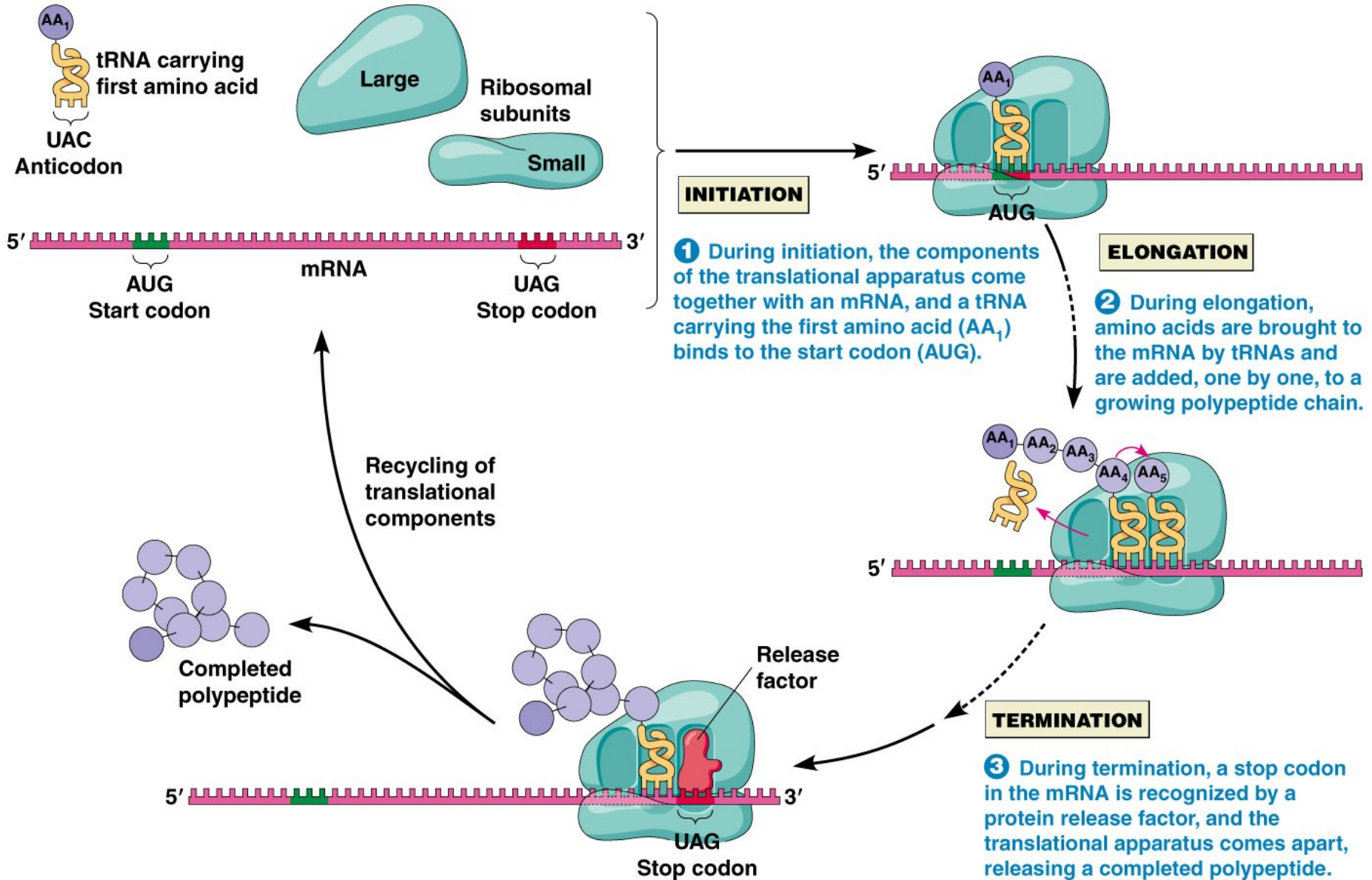
- na obou podjednotkách
- připojení nové AA (na tRNA) k nascentnímu polypeptidovému řetězci

4. Výstupní místo pro deacylovanou tRNA (exit; E-místo)

- výstup pro tRNA bez AA
- na podjednotce 50S



PROCES TRANSLACE



Průběh translace - Iniclace

- bakteriální mRNA se váže do mRNA binding site ribozomu 5'-koncem (Shine-Dalgarno sekvencí)
- začíná AUG a končí stop kodonem (UAG, UAA nebo UGA) a za ním nekodující sekvence na 3'-konci
- tyto sekvence jsou společné pro všechny prokaryotní geny
- u prokaryot jsou geny polycistronní (více genů na jedné mRNA) a tyto sekvence má každý gen zvlášť

Shine-Dalgarno sequence

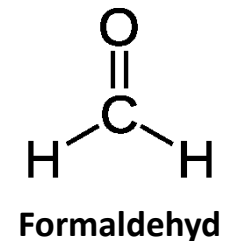
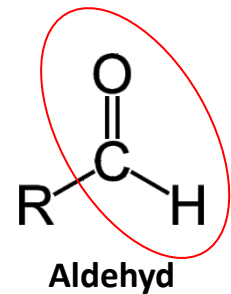
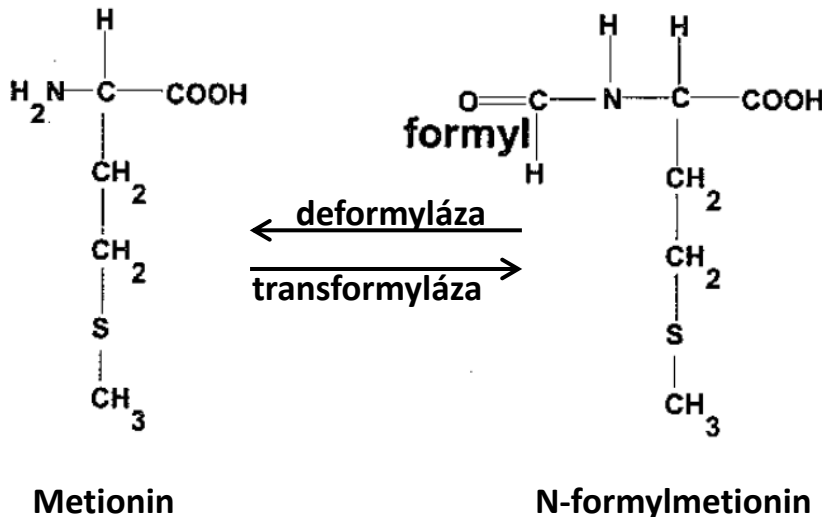
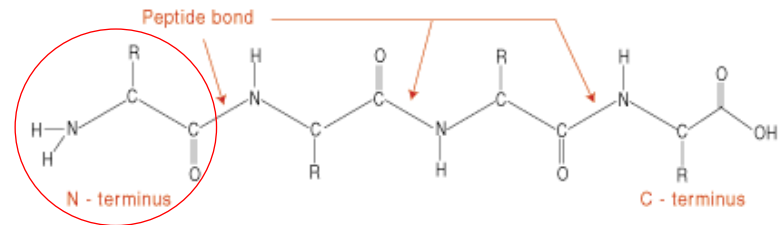


(a) Bacterial mRNA

Průběh translace - Iniclace

- první se zařazuje aminokyselina **formylmethionin**

- vznik katalyzován transformylázou
- k formylaci dochází až po připojení metioninu k tRNA ($\text{fMet-tRNA}^{\text{fMet}}$)
- vazba na kodon **AUG**, pokud je na začátku $\rightarrow \text{fMet-tRNA}^{\text{fMet}}$, pokud není $\rightarrow \text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$
- po prodloužení na 15-30 AA se (50/50):
 - a) deformuluje na zpět methionin (katalyzováno deformylázou)
 - b) odbourává (katalyzováno aminopeptidázou)
- tedy cca 50% polypeptidů začíná methioninem a zbytek tou druhou AA (kterákoli)

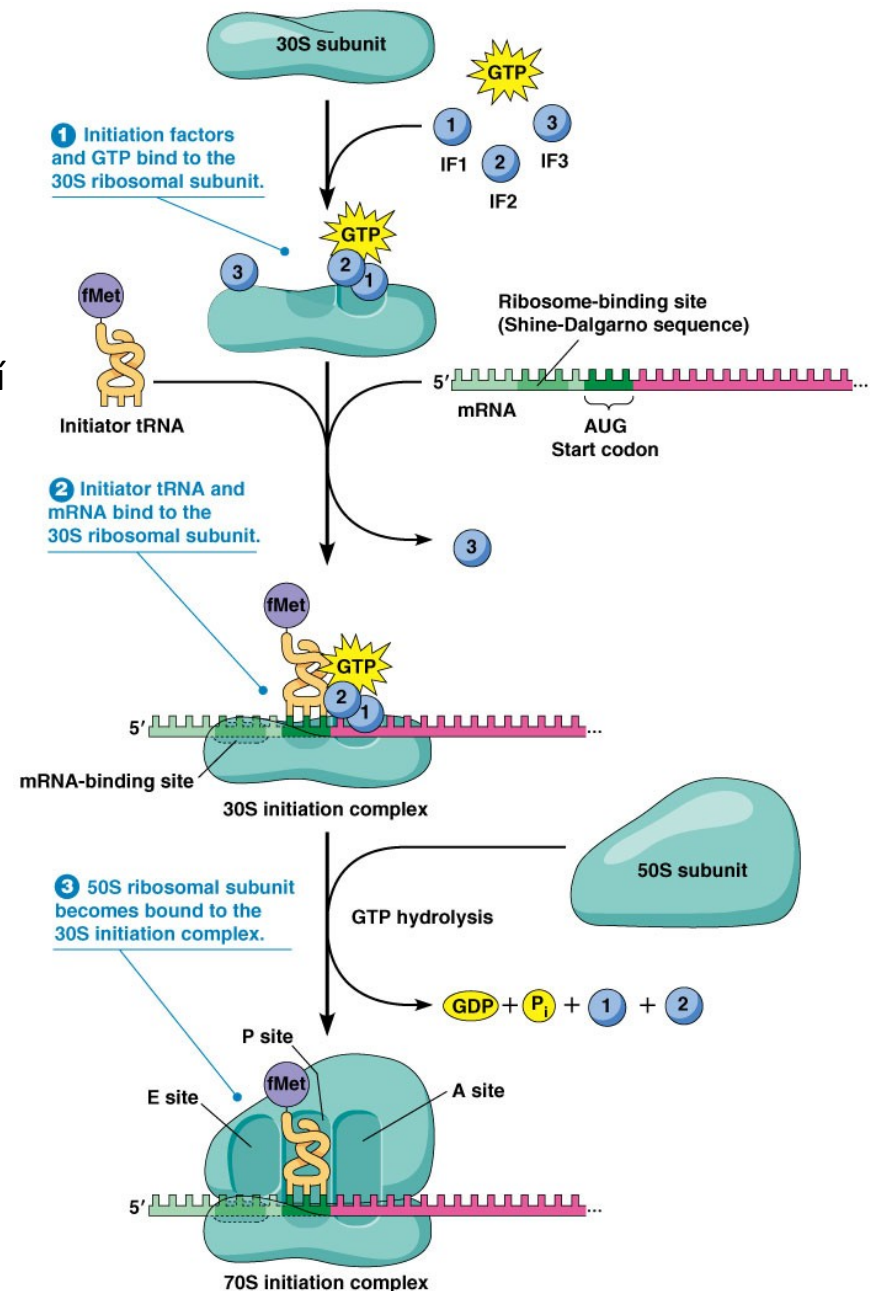


Aldehyd: organická sloučenina, která obsahuje aldehydickou funkční skupinu formyl (-CHO)
neplést s alkoholem ($\text{R-CH}_2\text{-OH}$)

Průběh translace - Iniclace

Iniciaci řídí iniciační faktory IF1, IF2 a IF3

1. Disociace ribozomu na jednotky 30S a 50S
 - vazba IF na 30S mj. zabraňuje znovuspojení
 - mRNA se spojuje Shine-Dalgarno sekvencí s podjednotkou 30S
2. IF2 se váže s fMet-tRNA^{fMet} a ten nasedne na AUG
3. Odpojení IF1 a IF2 za hydrolýzy GTP je signálem pro připojení velké podjednotky - zůstává fMet-tRNA^{fMet} na AUG kodonu mRNA v peptidylovém místě - **iniciační komplex** na úplném ribozomu



© 2012 Pearson Education, Inc.

Průběh translace - Elongace

Elongaci řídí elongační faktory:

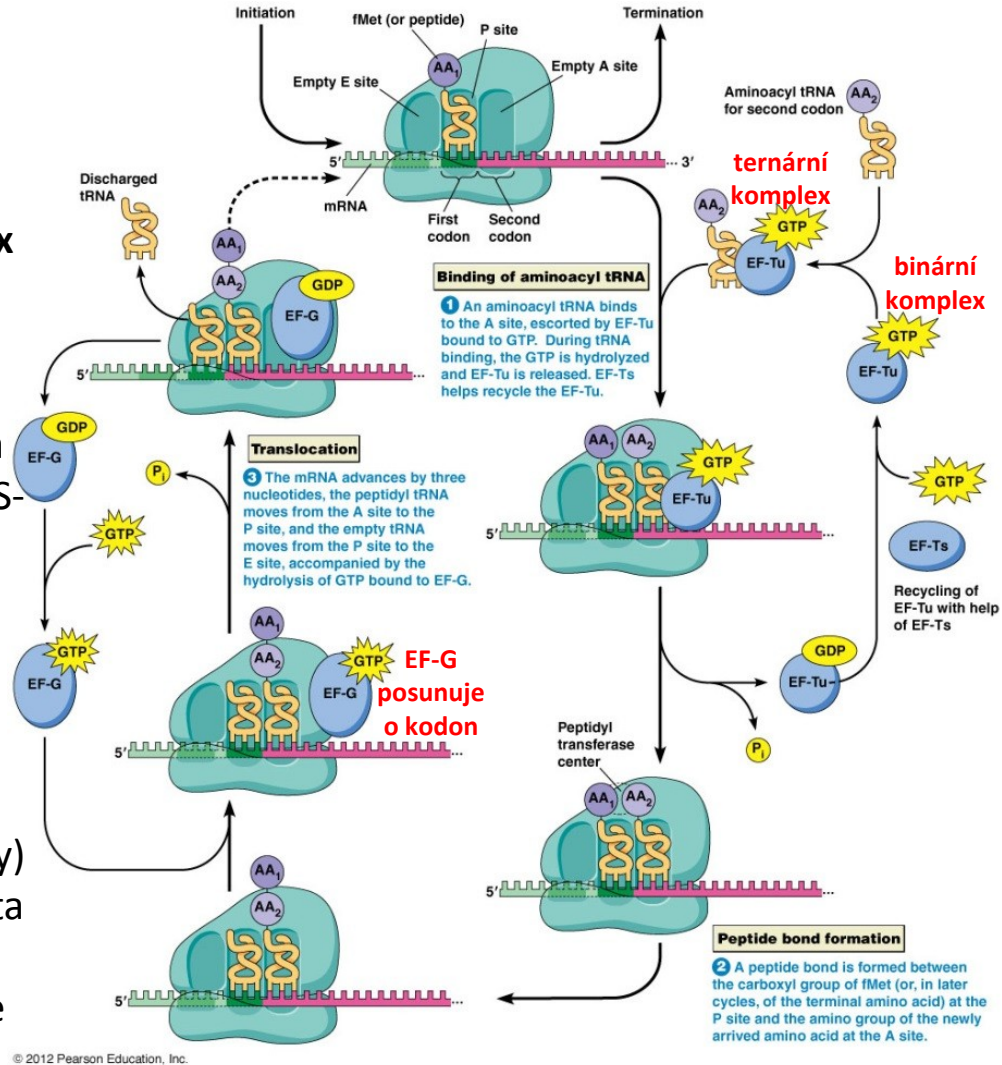
1. EF-Tu (přináší aminocyl tRNA)
2. EF-G (posunuje ribozom o 1 kodon)

1. **binární komplex** EF-Tu.GTP → **ternární komplex** EF-Tu.GTP.AA-tRNA (všechny AA s výjimkou fMET-tRNA^{fMet}) kodon AUG je čten vždy jako metionin

2. ternární komplex řídí vazbu aa-tRNA do A-místa ribozomu. Vazba na kodon mRNA a nukleotidy 16S-rRNA a 23S-rRNA. Hydrolýza GTP a uvolnění EF-Tu

3. přesun z A-místa do P-místa. Tvorba peptidové vazby se sousední AA. Z E-místa je vytěsněna deacylovaná tRNA

4. Ribozom se posune o jeden kodon (3 nukleotidy) směrem ke 3'-konci mRNA. Vlivem EF-G Do A-místa se dostává nový kodon. Prodloužení polypeptidového řetězce o jednu AA. Označujeme jako **translokace ribozomu**.



Latinsky: "binarius" = složený ze 2 částí; "ternarius" = složený ze 3 částí

Průběh translace - Terminace

Nutná přítomnost **terminačního kodonu** a **terminačních faktorů**

Terminaci řídí "release" faktory RF1, RF2 a RF3

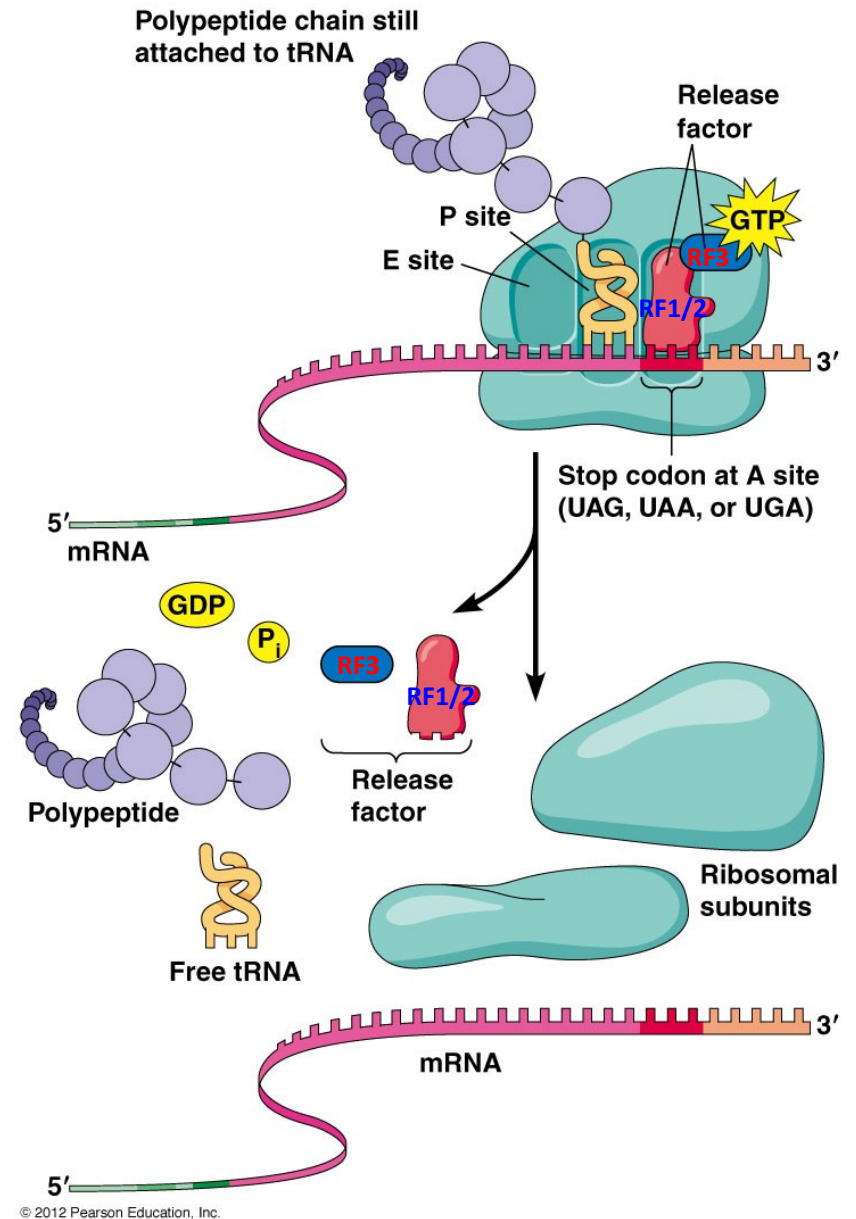
RF1: rozeznává kodony UAA a UAG

RF2: rozeznává kodony UAA a UGA

RF3: váže GTP a stimuluje činnost RF1 a RF2

Průběh terminace:

faktory uvolní tRNA z karboxylového konce polypeptidového řetězce - zastaví jeho prodlužování. Následuje uvolnění polypeptidu a rozpad ribozomu na podjednotky



Pojmenování STOP kodonů:

| | |
|-----|-------|
| UAG | Amber |
| UGA | Opal |
| UAA | Ochre |

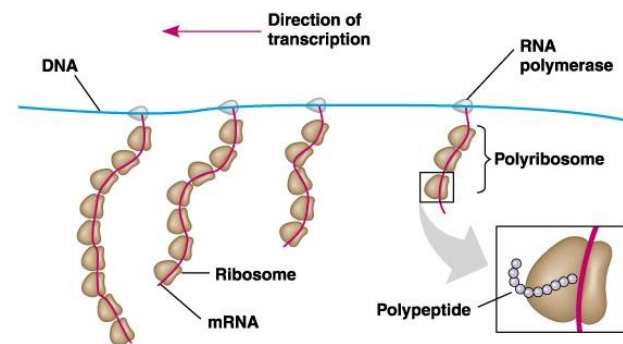
Nejprve byl objeven STOP kodon UAG a jeho objevitelé Richard Epstein a Charles Steinberg pojmenovali "Amber" po svém kamarádovi Harris Bernsteinovi. Další 2 STOP kodony byly pojmenovány pro zachování "pojmenování barevných nerostů".

| | | |
|--------------------|------------|--------|
| der Bernstein..... | Amber..... | Jantar |
| der Opal..... | Opal..... | Opál |
| das Ocker..... | Ochre..... | Okr |



Rychlost syntézy polypeptidu

- v *E. coli* se řetězec prodlužuje 10-20 AA/sek (cca 40 nukleotidů/s)
- na jedné molekule mRNA obvykle 10-15 ribozomů (polyribosom)



Genetický kód

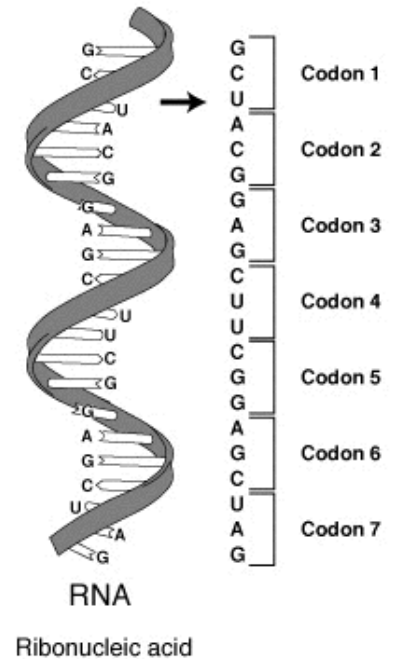
Sady tří nukleotidů (kodony) kódují jednotlivé aminokyseliny

4 druhy nukleotidů v kodonu po třech: **$4^3 = 64$ kombinací**

Platný pro všechny organismy od bakterie po člověka

Genetický kód prolomen v **1960's**

- Nebuněčný systém translace přeložil poly-uracil (UUUU...) do peptidu ze samých fenylalaninů, poly-adenin (AAAA...) do poly-lysinu
- Kombinace krátkých řetězců mRNA filtrovány skrz filtr s ribozomy a byly analyzovány výsledné aminokyseliny - odhalení tripletů kódujících jednotlivé AA



1959 Nobelova cena "syntéza RNA a DNA"

S. Ochoa
A. Konberg



Photo from the Nobel Foundation archive.
Severo Ochoa
Prize share: 1/2

Photo from the Nobel Foundation archive.
Arthur Kornberg
Prize share: 1/2

1968 Nobelova cena "breaking the genetic code"

M. W. Nirenberg
H. G. Khorana
R. W. Holley



Photo from the Nobel Foundation archive.
Robert W. Holley
Prize share: 1/3

Photo from the Nobel Foundation archive.
Har Gobind Khorana
Prize share: 1/3

Photo from the Nobel Foundation archive.
Marshall W. Nirenberg
Prize share: 1/3

Tabulka mRNA kodonů

Celkem 64 kodonů (4 x 4 x 4; dle tabulky) kóduje 20 + 1 + 1 aminokyselin
Platný pro prokaryota i eukaryota

| | | | | |
|----------|-------|-------|--------|--------------|
| nonpolar | polar | basic | acidic | (stop codon) |
|----------|-------|-------|--------|--------------|

Standard genetic code

| 1st base | 2nd base | | | | | | | | 3rd base | | |
|----------|--------------------|-----------------------|-----|-------------------|-----|-----------------------|-----------------------|------------------|----------|--------------------|---|
| | U | | C | | A | | G | | | | |
| U | UUU | (Phe/F) Phenylalanine | UCU | (Ser/S) Serine | UAU | (Tyr/Y) Tyrosine | UGU | (Cys/C) Cysteine | U | | |
| | UUC | | UCC | | UAC | | UGC | | C | | |
| | UUA | | UCA | | UAA | | Stop (Ochre) | | UGA | Stop (Opal) | A |
| | UUG | | UCG | | UAG | | Stop (Amber) | | UGG | (Trp/W) Tryptophan | G |
| C | CUU | (Leu/L) Leucine | CCU | (Pro/P) Proline | CAU | (His/H) Histidine | CGU | (Arg/R) Arginine | U | | |
| | CUC | | CCC | | CAC | | CGC | | C | | |
| | CUA | | CCA | | CAA | | (Gln/Q) Glutamine | | CGA | A | |
| | CUG | | CCG | | CAG | | | | CGG | G | |
| A | AUU | (Ile/I) Isoleucine | ACU | (Thr/T) Threonine | AAU | (Asn/N) Asparagine | AGU | (Ser/S) Serine | U | | |
| | AUC | | ACC | | AAC | | AGC | | C | | |
| | AUA | | ACA | | AAA | | (Lys/K) Lysine | | AGA | A | |
| | AUG ^[A] | | ACG | | AAG | | | | AGG | G | |
| G | GUU | (Val/V) Valine | GCU | (Ala/A) Alanine | GAU | (Asp/D) Aspartic acid | GGU | (Gly/G) Glycine | U | | |
| | GUC | | GCC | | GAC | | GGC | | C | | |
| | GUA | | GCA | | GAA | | (Glu/E) Glutamic acid | | GGA | A | |
| | GUG | | GCG | | GAG | | | | GGG | G | |

AUG na začátku řetězce je rozpoznán formylmethioninem, jinde pouze methioninem

21. aminokyselina Selenocystein je rozpoznávána stop kodonem Opal (UGA) za specifických podmínek (vč. člověka)

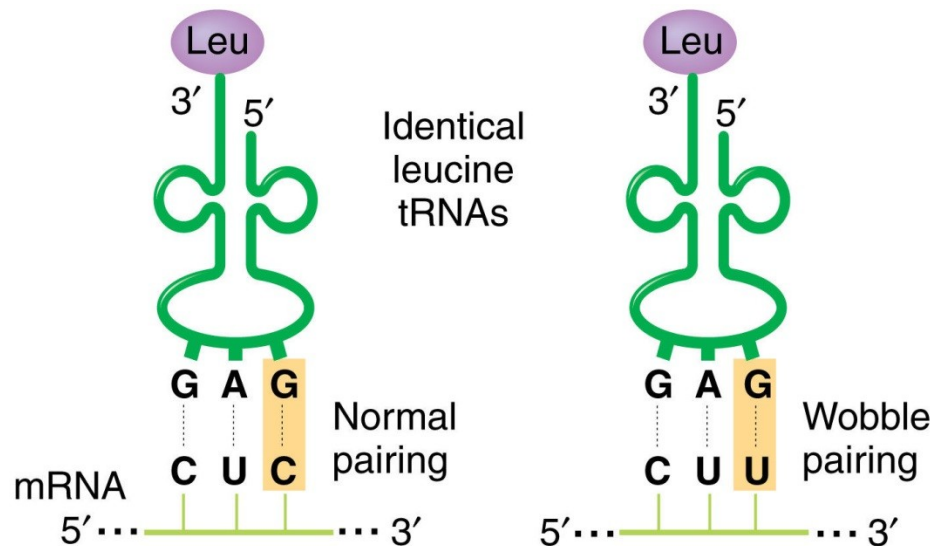
22. aminokyselina Pyrrolysin je rozpoznávána stop kodonem Amber (UAG) za specifických podmínek (pouze prokaryota)

Kodování aminokyselin:

- Celkem 64 kodonů na mRNA (4 x 4 x 4; dle tabulky) kóduje 20 + 1 + 1 aminokyselin
- Antikodonů na **tRNA**, které rozeznávají kodony na mRNA je **vždy méně** a liší se dle skupiny organismů
- Tedy, jedna tRNA, která přináší aminokyselinu dokáže rozpoznat více kodonů na mRNA (na posledním - třetím - místě kodonu nemusí odpovídat komplementární baze)

= Pravidlo o kolísavém párování bazí (wobble base pairing)

- v závislosti na druhu organismu může existovat více tRNA pro jednu AA
 - *E. coli*: 40 antikodonů (tRNA) pro 64 kodonů (gramnegativní bakterie)
 - Grampozitivní bakterie: 33 tRNA; mykoplasmata: 28 tRNA



Mykoplasmata: drobné bakterie bez buněčné stěny. Resistentní vůči antibiotikům cílícím na buněčnou stěnu (např. Penicilin)

Pravidlo o kolísavém párování bazí

Gramnegativní bakterie: 40 antikodonů* (tRNA) pro 64 kodonů

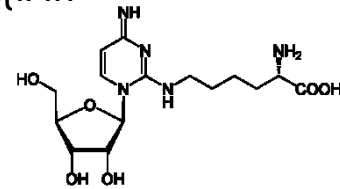
Antikodony tRNA používané ke čtení genetického kódu v ribozomech gramnegativních bakterií

| kodon antikodon (5'XXX3') (5'XXX3') | | kodon antikodon (5'XXX3') (5'XXX3') | | kodon antikodon (5'XXX3') (5'XXX3') | | kodon antikodon (5'XXX3') (5'XXX3') | |
|--|-----|--|-----|--|-----|--|-----|
| Phe (UUU) | GAA | Ser (UCU) | GGA | Tyr (UAU) | QUA | Cys (UGU) | GCA |
| Phe (UUC) | | Ser (UCC) | | Tyr (UAC) | | Cys (UGC) | |
| Leu (UUA) | UAA | Ser (UCA) | UGA | Trm (UAA) | 0 | Trm (UGA) | 0 |
| Leu (UUG) | CAA | Ser (UCG) | CGA | Trm (UAG) | 0 | Trp (UGG) | CCA |
| Leu (CUU) | GAG | Pro (CCU) | GGG | His (CAU) | QUG | Arg (CGU) | ICG |
| Leu (CUC) | | Pro (CCC) | | His (CAC) | | Arg (CGC) | |
| Leu (CUA) | UAG | Pro (CCA) | UGG | Gln (CAA) | UUG | Arg (CGA) | CCG |
| Leu (CUG) | CAG | Pro (CCG) | CGG | Gln (CAG) | CUG | Arg (CGG) | |
| Ile (AUU) | GAU | Thr (ACU) | GGU | Asn (AAU) | QUU | Ser (AGU) | GCU |
| Ile (AUC) | | Thr (ACC) | | Asn (AAC) | | Ser (AGC) | |
| Ile (AUA) | LAU | Thr (ACA) | UGU | Lys (AAA) | UUU | Arg (AGA) | UCU |
| Met (AUG) | CAU | Thr (ACG) | CGU | Lys (AAG) | | Arg (AGG) | CCU |
| Val (GUU) | | Ala (GCU) | | Asp (GAU) | QUC | Gly (GGU) | GCC |
| Val (GUC) | UAC | Ala (GCC) | GGC | Asp (GAC) | | Gly (GGC) | |
| Val (GUA) | | Ala (GCG) | | Glu (GAA) | UUC | Gly (GGA) | UCC |
| Val (GUG) | GAC | Ala (GCA) | UGC | Glu (GAG) | | Gly (GGG) | CCC |

**Neobvyklé baze typické v tRNA
(na posledním místě*)**

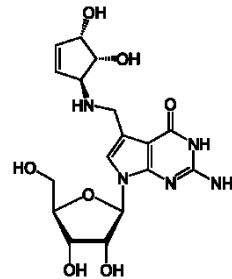
Lyzidin (L)

- specifický pro isoleucin
- vazba na adenin



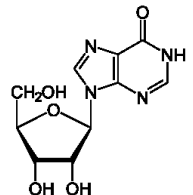
Queosine (Q)

- specifický pro histidin, tyrosin, kyselinu asparagovou a asparagin
- vazba na uracil a cytosin



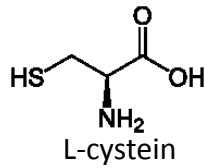
Inosine (I)

- specifický pro arginin
- vazba na uracil a cytosin

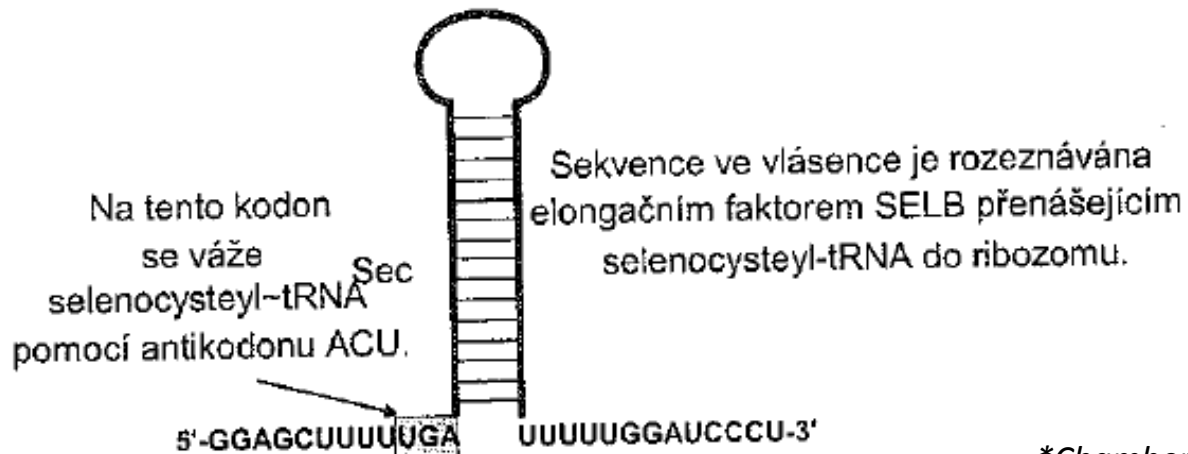


* Antikodon v tabulce nutno obrátit zrcadlově

21. aminokyselina Selenocystein (Sec)



- je obsažen v tzv. "selenoproteinech" (např. enzym glutathion peroxidáza)
- vyskytuje se i u člověka
- přenášen speciální tRNA (tRNA^{Sec})
- na tRNA^{Sec} se nejprve váže serin, který je pomocí selenocysteinázy přeměněn na selenocystein
- rozpoznává Opal kodon UGA (normálně terminační); známo od r1986*
- aby nebyl UGA rozpoznán jako terminační, je nutná vlásenka (hairpin) na mRNA a protein SELB
- selenocysteyl-tRNA^{Sec} je do ribozomu přenášena specifickým **elongačním faktorem SELB**

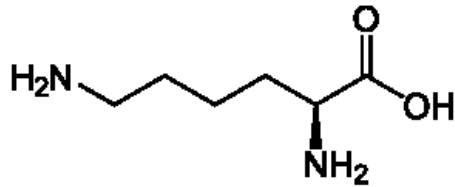


*Chambers et al., Zinoni et al.

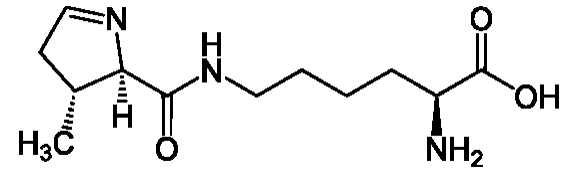
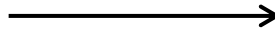
Glutathion peroxidáza: enzym, který v těle mění jedovatý peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík

22. aminokyselina Pyrrolysin (Pyl)

- obsažena v některých archea a bakteriích, ne u člověka
- rozpoznává Amber kodon UAG (normálně terminační)
- objeven v r. 2002*
- vyskytuje se v aktivním místě enzymu methyltransferázy u archeí produkujících metan
- syntetizován ze 2 molekul lysinu
- podobně jako u selenocysteinu, přítomnost RNA vlásenky (PYLIS; Pyl insertion structure) za UAG místem umožňuje inserci Pyrrolysinu v archaea.
- ostatní varianty lysinu (např. hydroxylysin, methyllysin) nejsou kódovány samostatným kodonem a vznikají post-translační modifikací lysinu



2x L-lysine



Pyrrolysine

REPORTS

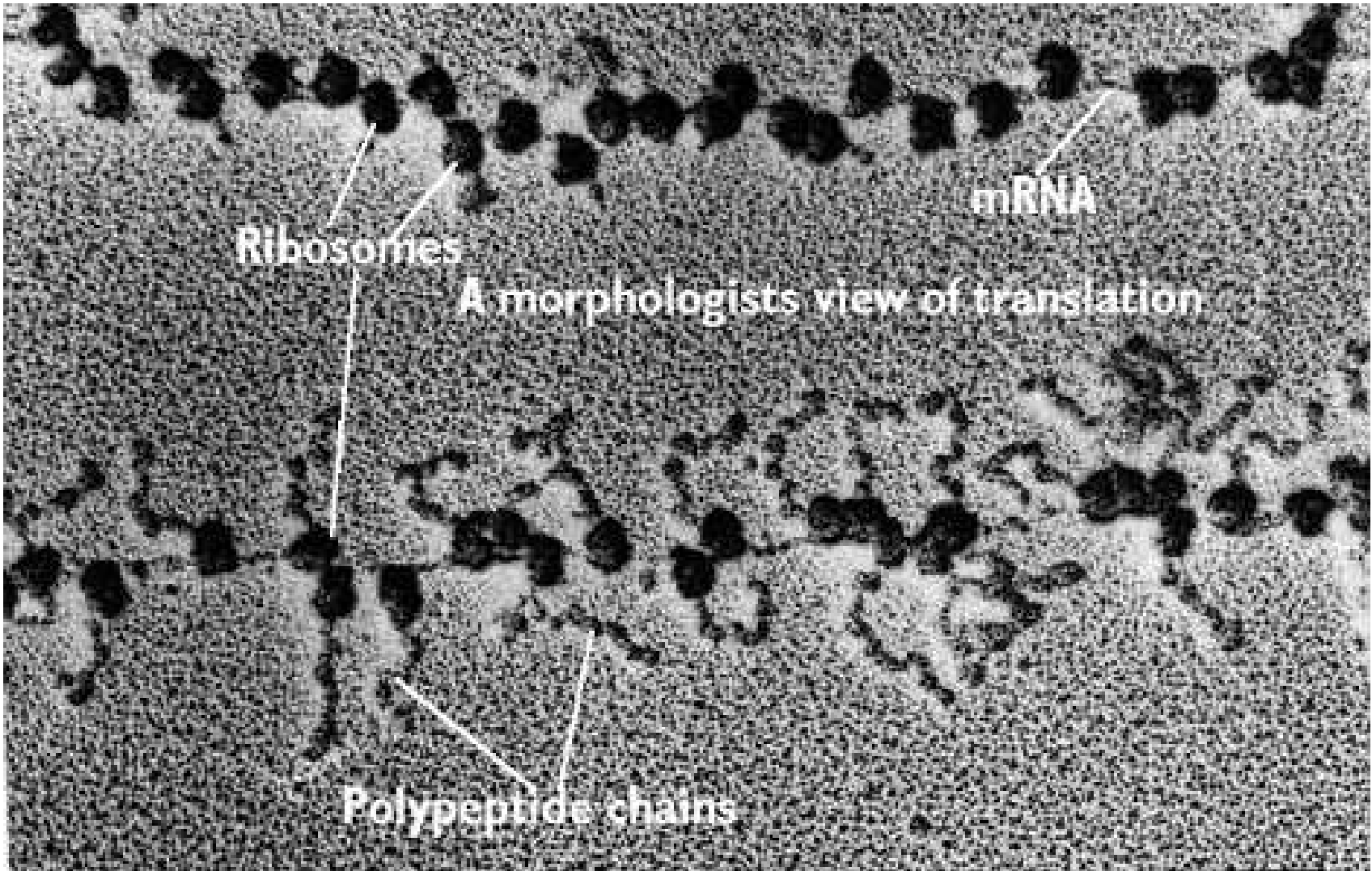
Pyrrolysine Encoded by UAG in Archaea: Charging of a UAG-Decoding Specialized tRNA

Gayathri Srinivasan, Carey M. James, Joseph A. Krzycki*

Pyrrolysine is a lysine derivative encoded by the UAG codon in methylamine methyltransferase genes of *Methanosarcina barkeri*. Near a methyltransferase gene cluster is the *pylT* gene, which encodes an unusual transfer RNA (tRNA) with a CUA anticodon. The adjacent *pylS* gene encodes a class II aminoacyl-tRNA synthetase that charges the *pylT*-derived tRNA with lysine but is not closely related to known lysyl-tRNA synthetases. Homologs of *pylS* and *pylT* are found in a Gram-positive bacterium. Charging a tRNA_{CUA} with lysine is a likely first step in translating UAG amber codons as pyrrolysine in certain methanogens. Our results indicate that pyrrolysine is the 22nd genetically encoded natural amino acid.

* Srinivasan et al., Science 2002

Translace v elektronovém mikroskopu



Translace eukaryotické mRNA

Část druhá: Eukaryotická translace

a) u živočichů v cytoplasmě a v mitochondriích

b) u rostlin v cytoplasmě, mitochondriích a chloroplastech

Cytoplasmatické ribozomy: liší se od prokaryotických; 80S

Mitochondriální a chloroplastové ribozomy: stejné jako u prokaryot; 70S

Rozdíly v eukaryotické (cytoplasmatické) translaci oproti prokaryotické:

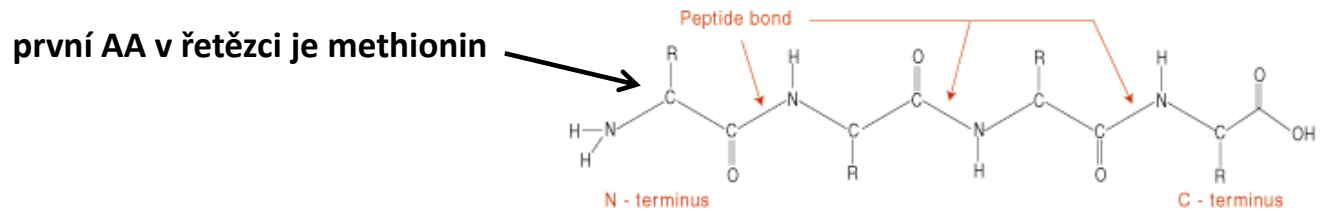
1. Počáteční AA je methionin (na N-konci polypeptidového řetězce)

- iniciační tRNA^{Met} není formylována *in vivo**

- stejný iniciační kodon AUG

- po prodloužení řetězce bývá odštěpen aminopeptidázou

2. Vyšší počet iniciačních faktorů než u prokaryot



* pokusy prokázaly, že *in vitro* ji lze formylovat formylázou z *E. coli*

Eukaryotní mRNA:

- narušil od prokaryotní mRNA neobsahuje Shine-Dalgarno sekvenci (ribosome binding site)
- startovací kodon se nachází v "sekvenci Kozakové" CAAA**AUG**, kam je položena první AA Met-tRNA^{Met} proti kodonu AUG (ne, formylmethionin)
- oproti prokaryotům, obsahuje navíc:
 - čepička na 5'-konci (5 prime cap; m7G - 7-metylguanozin) - váže CBP-proteiny* nezbytné pro iniciaci translace (posadí mRNA na ribozom)
 - polyadenylace 3'-konce (3 prime poly(A) tail) - ochrana proti účinku exonukleáz



(a) Bacterial mRNA



(b) Eukaryotic mRNA

© 2012 Pearson Education, Inc.

*CREB-binding protein (poprvé izolován jako nukleární protein, který se váže na CREB protein)

Cytoplasmatický ribozom 80S:

- 2 podjednotky složené z:
 - 4 molekuly rRNA (18S, 5S, 5,8S a 28S u savců)
 - 70 proteinů
- Sedimentační koeficient závisí na druhu organismu:
 - celkem kolem 80S
 - podjednotky cca 40S a 60S

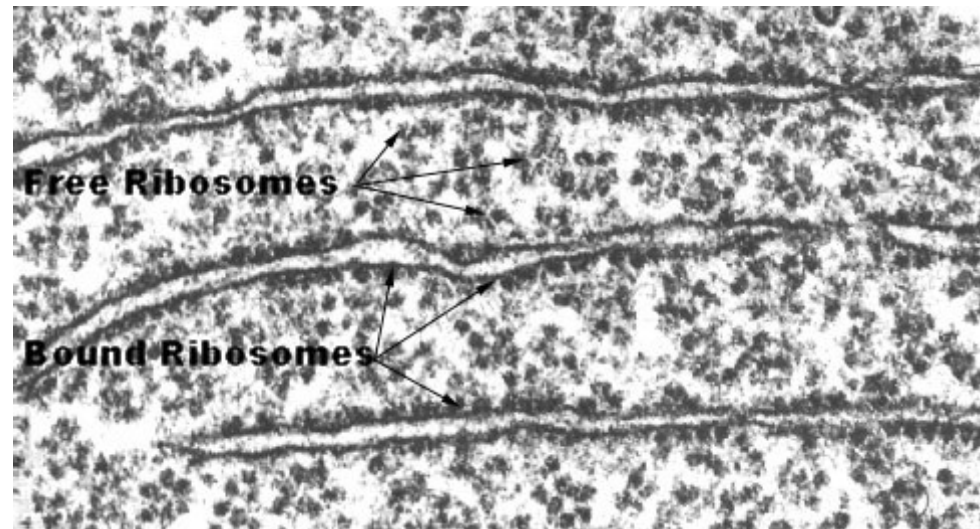
| |
|--|
| 40S 18S rRNA 30 proteinů |
| 60S 5,0S rRNA 5,8S rRNA 28S rRNA (savci) 25S rRNA (rostliny) 40 proteinů |

a) Volné ribozomy: volně v cytoplasmě

- většinou syntéza intracelulárních proteinů

b) Vázané ribozomy: vázané na endoplazmatické retikulum (ER)

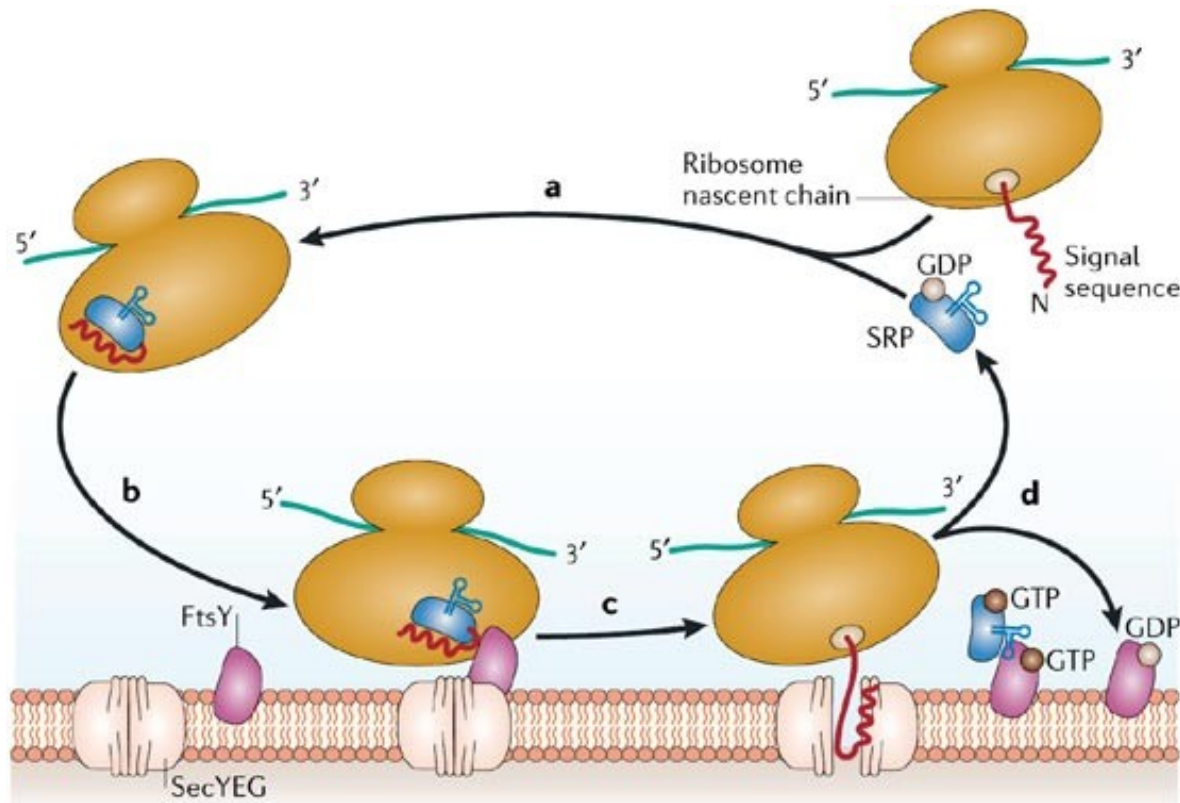
- pokryté části ER (drsňé ER) a nepokryté části ER (hladké ER)
- většinou syntéza extracelulárních proteinů (cirkulující v krvi a membránové)



Signální rozpoznávací částice (SRP)

- SRP slouží pro vazbu proteinů na endoplasmatické retikulum (pro transport ven z buňky či zabudování do membrán) u eukaryot*
- SRP se vyskytuje též u prokaryot u proteinů cytoplasmatické membrány*
- N-konec polypeptidu obsahuje signální sekvenci (15-25 AA)
- Během syntézy vazba na SRP a zastavení elongace
- Komplex nascentního polypeptidu + SRP se váže na specifický receptor v membráně ER
- SRP je odštěpen

- po dokončení translace je ribozom uvolněn z ER

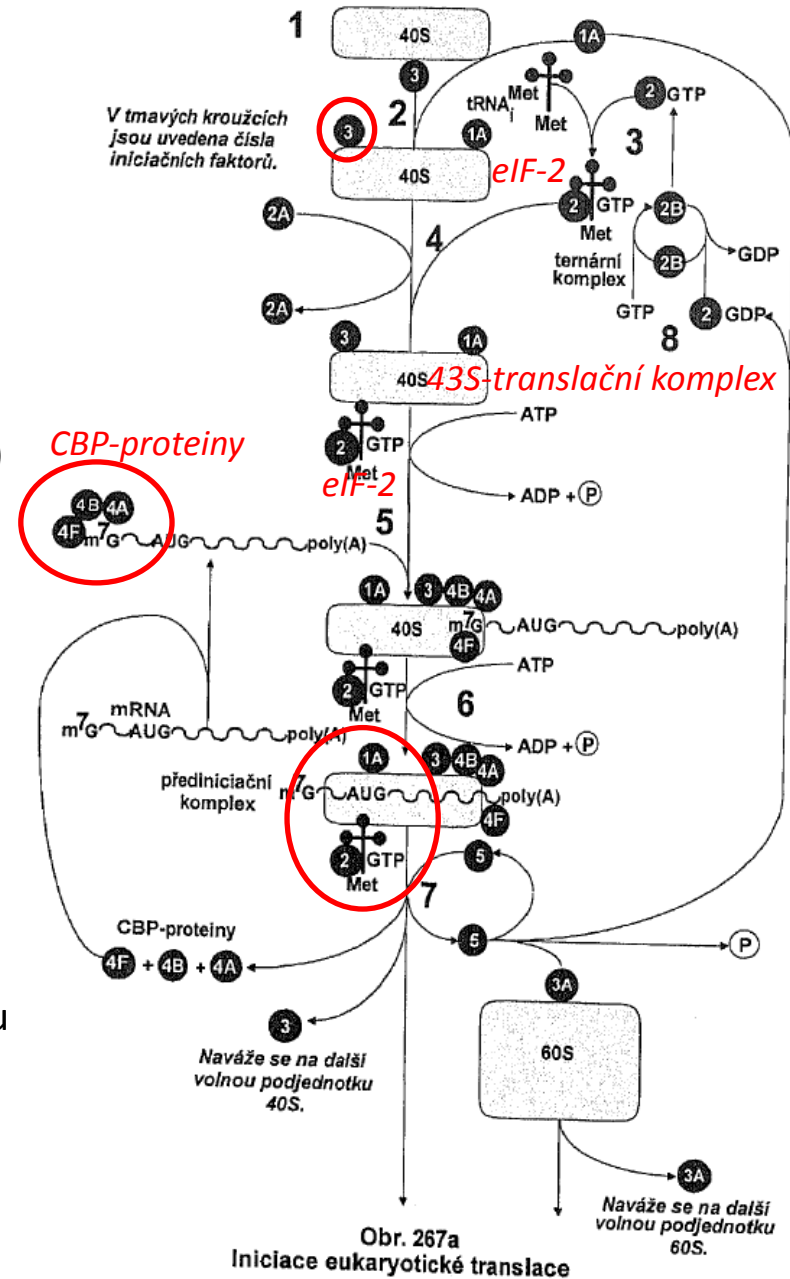


Průběh cytoplasmatické translace

Iniciace

Účastní se soubor eukaryotických iniciačních faktorů - "**eIFs**"

- eIF-3 (na malé podjednotce) a eIF-3A (na velké) udržují ribozomové podjednotky od sebe
- Důležitou roli hraje eIF-2, který váže iniciační tRNA^{Met} na malou ribozomální podjednotku 40S (43S-translační komplex)
- mRNA se napojí na malou podjednotku ribozomu (43S-komplex) pomocí CBP-proteinů 5'-konci mRNA (m⁷G)
- Není zde Shine-Dalgarno sekvence za kterou by následoval AUG kodon - probíhá tzv. skenování (hledání začátku AUG)
- 40S podjednotka se pohybuje po mRNA od 5'-konce k 3'-konci až nalezne "sekvenci Kozakové" CAAAUG
- Met-tRNA^{Met} je položena na peptydylové místo proti kodonu AUG
- Uvolněním faktorů eIF-3 a eIF-3A se ribozomové podjednotky spojí



Průběh cytoplasmatické translace

Elongace

- Řízena elongačními faktory EF-1 a EF-2
- Oba faktory značně homologní s bakteriálními EF-T a EF-G
- Elongace probíhá stejně jako u bakterií

Terminace

- Na rozdíl od prokaryot (3 RFs) pouze jeden terminační faktor: **eRF** (eukaryotic release factor)
- Rozeznává stejné 3 terminační kodony jako u prokaryot a uvolňuje polypeptidový řetězec z ribozomu

UAG

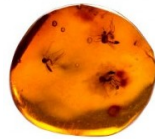
UGA

UAA

Amber

Opal

Ochre



Kódování aminokyselin u eukaryot

- Standardní genetický kód
- Platí pravidlo o kolísavém párování bazí: **45 tRNA** pro 64 mRNA
- z neobvyklých bazí se vyskytuje pouze inosine (I) (vazba na uracil a cytosin)

Tab. 27

Antikodony tRNA používané ke čtení genetického kódu v cytoplazmatických ribozomech eukaryotické buňky

| aminokyselina kodon (5'XXX3') | antikodon (5'XXX3') | aminokyselina kodon (5'XXX3') | antikodon (5'XXX3') | aminokyselina kodon (5'XXX3') | antikodon (5'XXX3') | aminokyselina kodon (5'XXX3') | antikodon (5'XXX3') |
|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Phe (UUU) | GAA | Ser (UCU) | IGA | Tyr (UAU) | GUA | Cys (UGU) | GCA |
| Phe (UUC) | | Ser (UCC) | | Tyr (UAC) | | Cys (UGC) | |
| Leu (UUA) | UAA CAA | Ser (UCA) | UGA CGA | Trm (UAA) | 0 | Trm (UGA) | 0 |
| Leu (UUG) | | Ser (UCG) | | Trp (UGG) | | CCA | |
| Leu (CUU) | IAG | Pro (CCU) | IGG | His (CAU) | GUG | Arg (CGU) | ICG |
| Leu (CUC) | | Pro (CCC) | | His (CAC) | | Arg (CGC) | |
| Leu (CUA) | UAG CAG | Pro (CCA) | UGG CGG | Gln (CAA) | UUG CUG | Arg (CGA) | UCG CCG |
| Leu (CUG) | | Pro (CCG) | | Gln (CAG) | | Arg (CGG) | |
| Ile (AUU) | IAU UAU | Thr (ACU) | IGU | Asn (AAU) | GUU | Ser (AGU) | GCU |
| Ile (AUC) | | Thr (ACC) | | Asn (AAC) | | Ser (AGC) | |
| Ile (AUA) | CAU | Thr (ACA) | UGU CGU | Lys (AAA) | UUU CUU | Arg (AGA) | UCG CCG |
| Met (AUG) | | Thr (ACG) | | Lys (AAG) | | Arg (AGG) | |
| Val (GUU) | IAC | Ala (GCU) | IGC | Asp (GAU) | GUC | Gly (GGU) | GCC |
| Val (GUC) | | Ala (GCC) | | Asp (GAC) | | Gly (GGC) | |
| Val (GUA) | UAC CAC | Ala (GCA) | UGC CGC | Glu (GAA) | UUC CUC | Gly (GGA) | UCC CCC |
| Val (GUG) | | Ala (GCG) | | Glu (GAG) | | Gly (GGG) | |

* Antikodon v tabulce nutno obrátit zrcadlově

Translace v mitochondriích

- translace podobná jako u bakterií (podpora endosymbiotické teorie)
- začíná formylmethioninem
- ribozomy 70S
- probíhá uvnitř mitochondrie, ale není úplně autonomní
- závislá na některých proteinech tvořených v cytoplasmě
 - aminoacyl-tRNA-syntetázy; ribozomové proteiny a iniciační a elongační faktory
 - vlastní tRNA

Genetický kód:

- pouze 22 tRNA (bez neobvyklých bazí)
- **nejnižší** známý počet druhů tRNA schopný zajistit translaci

| aminokyselina kodon (5'XXX3') | antikodon (5'XXX3') | aminokyselina kodon (5'XXX3') | antikodon (5'XXX3') | aminokyselina kodon (5'XXX3') | antikodon (5'XXX3') | aminokyselina kodon (5'XXX3') | antikodon (5'XXX3') |
|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Phe (UUU) | GAA | Ser (UCU) | UGA | Tyr (UAU) | GUA | Cys (UGU) | GCA |
| Phe (UUC) | | Ser (UCC) | | Tyr (UAC) | | Cys (UGC) | |
| Leu (UUA) | UAA | Ser (UCA) | | Trm (UAA) | 0 | Trp (UGA) | UCA |
| Leu (UUG) | | Ser (UCG) | | Trm (UAG) | 0 | Trp (UGG) | |
| Leu (CUU) | UAG | Pro (CCU) | UGG | His (CAU) | GUG | Arg (CGU) | UCG |
| Leu (CUC) | | Pro (CCC) | | His (CAC) | | Arg (CGC) | |
| Leu (CUA) | | Pro (CCA) | | Gln (CAA) | Arg (CGA) | | |
| Leu (CUG) | | Pro (CCG) | | Gln (CAG) | Arg (CGG) | | |
| Ile (AUU) | GAU | Thr (ACU) | UGU | Asn (AAU) | GUU | Ser (AGU) | GCU |
| Ile (AUC) | | Thr (ACC) | | Asn (AAC) | | Ser (AGC) | |
| Met (AUA) | UAU | Thr (ACA) | | Lys (AAA) | UUU | Trm (AGA) | 0 |
| Met (AUG) | | Thr (ACG) | | Lys (AAG) | Trm (AGG) | 0 | |
| Val (GUU) | UAC | Ala (GCU) | UGC | Asp (GAU) | GUC | Gly (GGU) | UCC |
| Val (GUC) | | Ala (GCC) | | Asp (GAC) | | Gly (GGC) | |
| Val (GUA) | | Ala (GCA) | | Glu (GAA) | Gly (GGA) | | |
| Val (GUG) | | Ala (GCG) | | Glu (GAG) | Gly (GGG) | | |

* Antikodon v tabulce nutno obrátit zrcadlově

Translace v chloroplastech

- podobná jako u bakterií a mitochondrií
- začíná formylmethioninem
- ribozomy 70S
- 30 druhů tRNA (bez neobvyklých bazí)

| aminokyselina kodon (5'XXX3') | antikodon (5'XXX3') | aminokyselina kodon (5'XXX3') | antikodon (5'XXX3') | aminokyselina kodon (5'XXX3') | antikodon (5'XXX3') | aminokyselina kodon (5'XXX3') | antikodon (5'XXX3') |
|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Phe (UUU) | GAA | Ser (UCU) | CGA | Tyr (UAU) | GUA | Cys (UGU) | GCA |
| Phe (UUC) | | Ser (UCC) | | Tyr (UAC) | | Cys (UGC) | |
| Leu (UUA) | UAA CAA | Ser (UCA) | UGA | Trm (UAA) | 0 | Trm (UGA) | 0 |
| Leu (UUG) | | Ser (UCG) | | Trm (UAG) | 0 | Trp (UGG) | CCA |
| Leu (CUU) | UAG | Pro (CCU) | UGG | His (CAU) | GUG | Arg (CGU) | ACG |
| Leu (CUC) | | Pro (CCC) | | His (CAC) | | Arg (CGC) | |
| Leu (CUA) | | Pro (CCA) | | Gln (CAA) | UUG | Arg (CGA) | |
| Leu (CUG) | | Pro (CCG) | | Gln (CAG) | | Arg (CGG) | CCG |
| Ile (AUU) | GAU | Thr (ACU) | GGU | Asn (AAU) | GUU | Ser (AGU) | GCU |
| Ile (AUC) | | Thr (ACC) | | Asn (AAC) | | Ser (AGC) | |
| Ile (AUA) | CAU | Thr (ACA) | UGU | Lys (AAA) | UUU | Arg (AGA) | UCU |
| Met (AUG) | CAU | Thr (ACG) | | Lys (AAG) | | Arg (AGG) | |
| Val (GUU) | GAC | Ala (GCU) | UGC | Asp (GAU) | GUC | Gly (GGU) | GCC |
| Val (GUC) | | Ala (GCC) | | Asp (GAC) | | Gly (GGC) | |
| Val (GUA) | UAC | Ala (GCA) | | Glu (GAA) | UUC | Gly (GGA) | UCC |
| Val (GUG) | | Ala (GCG) | | Glu (GAG) | | Gly (GGG) | |

* Antikodon v tabulce nutno obrátit zrcadlově

Posttranslační procesy

Posttranslační procesy

- U prokaryot i eukaryot
- translací končí přenos genetické informace ze strukturního genu na protein
- vlastnosti proteinu určuje primární struktura: tvar, chemické vlastnosti...

Úpravy polypeptidového řetězce

- a) kotranslační - úprava nascentního* řetězce polypeptidu
- b) posttranslační - vzniká funkční polypeptidový řetězec

Úrovně organizace proteinu (3D tvar)

1. Primární struktura: *pořadí aminokyselin v řetězci*
2. Sekundární struktura: *prostorové uspořádání hlavního řetězce (α -helix a β -skládaný list)*
3. Terciární struktura: *prostorové uspořádání celého řetězce (vč. reakce na okolí hydrofobní)*
4. Kvartérní struktura: *uspořádání více podjednotek (oligomerní protein)*

**Nascentní řetězec: ještě se prodlužující (rozlišujte mezi nascentním řetězcem mRNA a polypeptidu)*

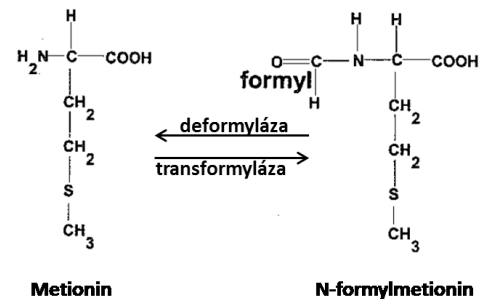
Někdy nebývá rozlišována kotranslace a posttranslace a oba děje jsou spojeny do posttranslačních modifikací

KOTRANSLACE

Úprava nascentního* řetězce

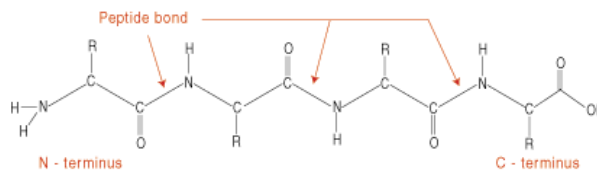
- Deformylace

- u prokaryot; u eukaryot pouze v mitochondriích a chloroplastech
- odstranění formylové skupiny z formylmethioninu na N-koci polypeptidového řetězce
- enzym: deformyláza



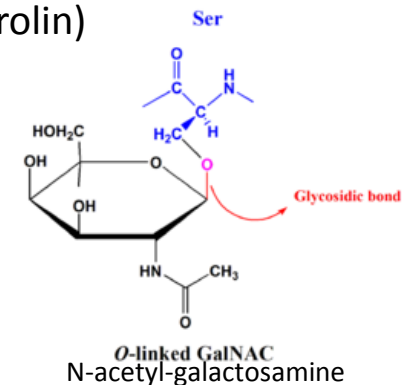
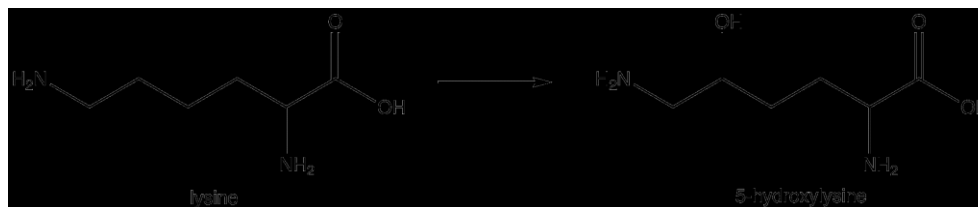
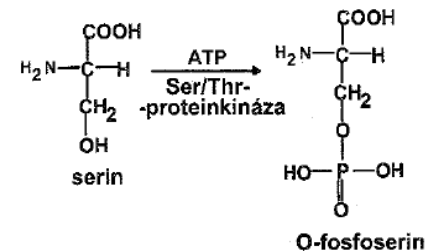
- Odštěpení aminokyselin

- u prokaryot i eukaryot
- odštěpení první AA (N-terminálního methioninu) (popř. i dalších AA)
- enzym: aminopeptidáza



- Chemická modifikace aminokyselin polypeptidu

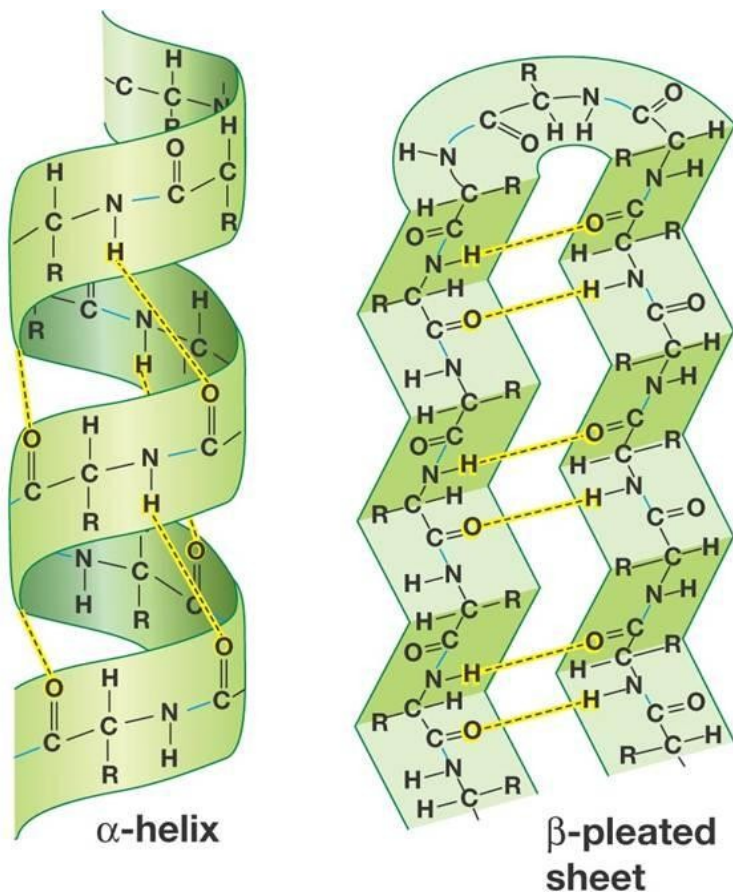
- modifikace R-zbytků aminokyselin
 - a) Fosforylace - připojení fosfátu (serin, treonin a tyrozin)
 - b) Glykozylace - připojení cukru (asparagin a serin)
 - c) Hydroxylace - připojení hydroxylové skupiny (-OH; lyzin a prolin)
- katalýza příslušnými enzymy



*Nascentní řetězec: ještě se prodlužující

Sekundární struktura

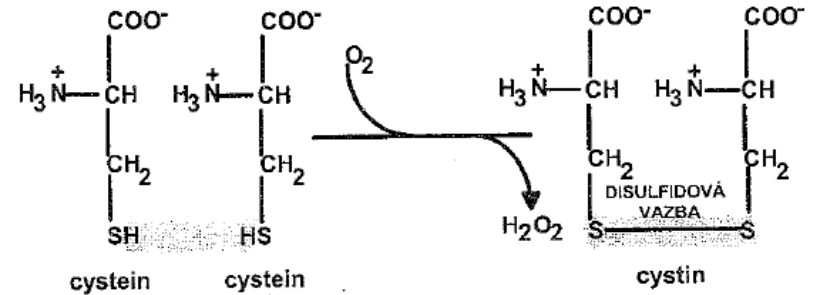
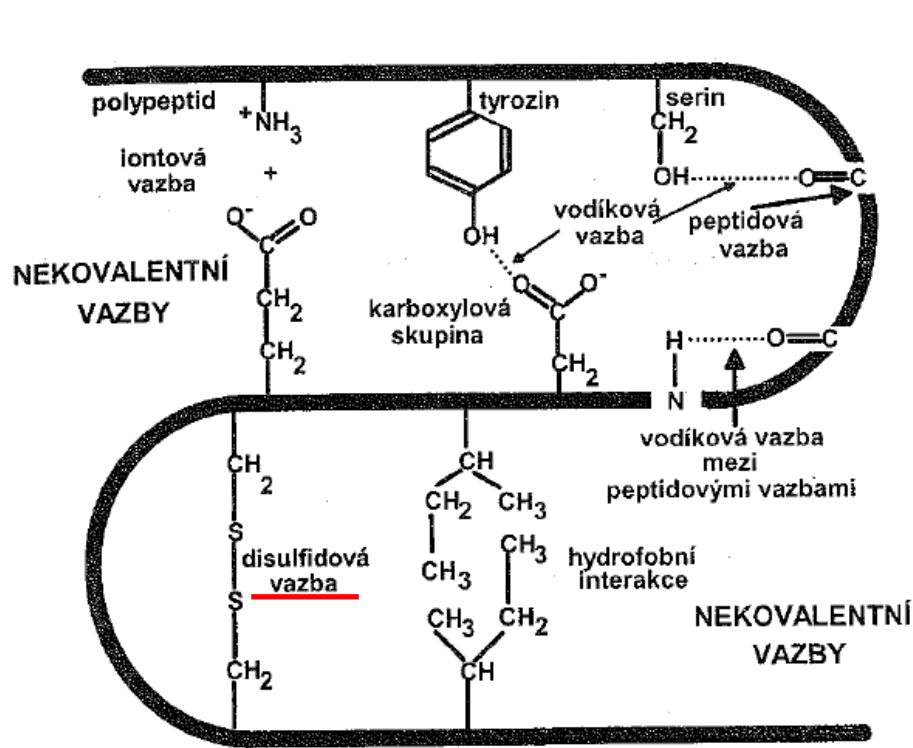
- Spontánní tvorba **sekundární** struktury ještě před dokončením syntézy polypeptidu
- Sekundární strukturu proteinu určují vodíkové vazby mezi CO- a NH- skupinami
- α -helix nebo β -skládaný list
- rozhodnutí jestli bude helix nebo list je zřejmě určeno primární strukturou



Terciární struktura

- Tvorba disulfidových vazeb (SS můstek)

- proti sobě položené sulfhydrylové skupiny mohou být oxidovány - tvorba **disulfidových vazeb**
- pouze u cysteinu (vodíky se odštěpí a vytvoří peroxid vodíku)
- tvorba terciární struktury polypeptidového řetězce
- **disulfidová vazba je kovalentní**
- spontánně se tvoří pomalu oxidací (hodiny), v buňce je však katalyzována enzymem **proteindisulfidizomerázou** (sek.)



Kovalentní vazba: dva prvky sdílí jeden nebo více párů elektronů, vysoká vazebná energie
Nekovalentní vazby: nižší vazebná energie, např. iontová nebo vodíková

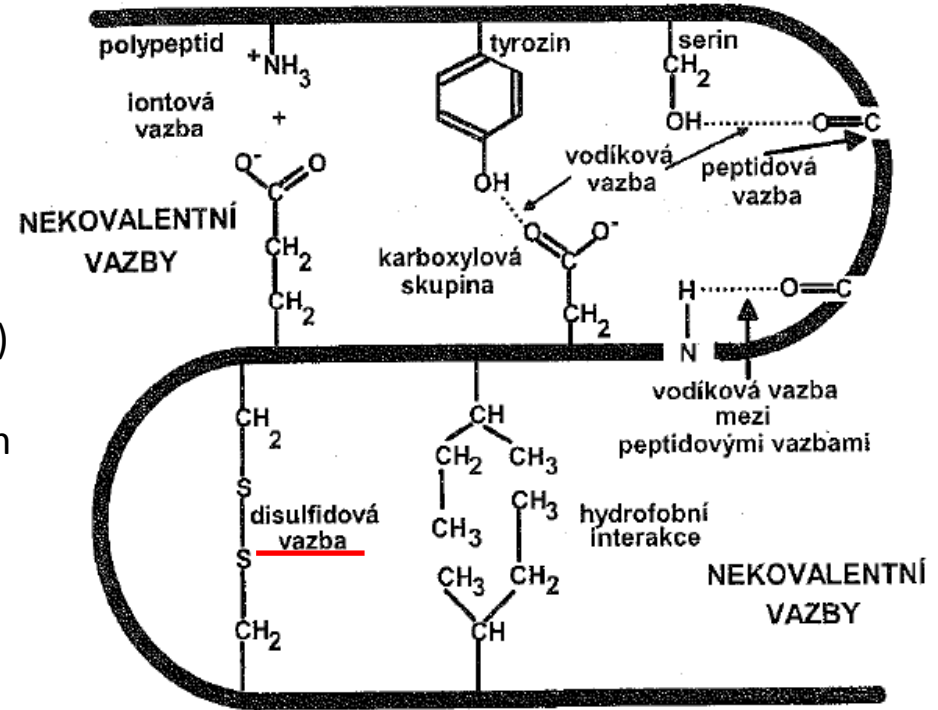
Terciární struktura

- Tvorba disulfidových vazeb (SS můstek)

Disulfidová vazba spojuje

- cysteiny stejného řetězce (např. u ribonukleáz)
- cysteiny různých řetězců (např. glutathion, inzulín)

Mikroorganismy žijící v extrémně vysokých teplotách mají ve svých bílkovinách mnohem více SS můstků než ostatní organismy



Definice nekovalentních vazeb účastnících se tvorby **terciární struktury proteinu**:

Nekovalentní vazby:

- **iontová**: jeden prvek přitáhne elektron(y) druhého a stane se aniontem (-), druhý prvek kationtem (+). Prvky jsou vázány elektrostaticky. Slabší vazba než kovalentní
- **vodíková** (též vodíkový můstek): podstatně slabší než kovalentní a iontová. Vodík je vázán na silný elektronegativní prvek (kyslík, fluor, dusík). Jediný elektron vodíku je odčerpán a (např. kyslíkem) kladně nabitě jádro je odhaleno a vzniká parciální kladný náboj, který poutá okolní elektronegativní prvky (např. kyslík)

Kovalentní vazba:

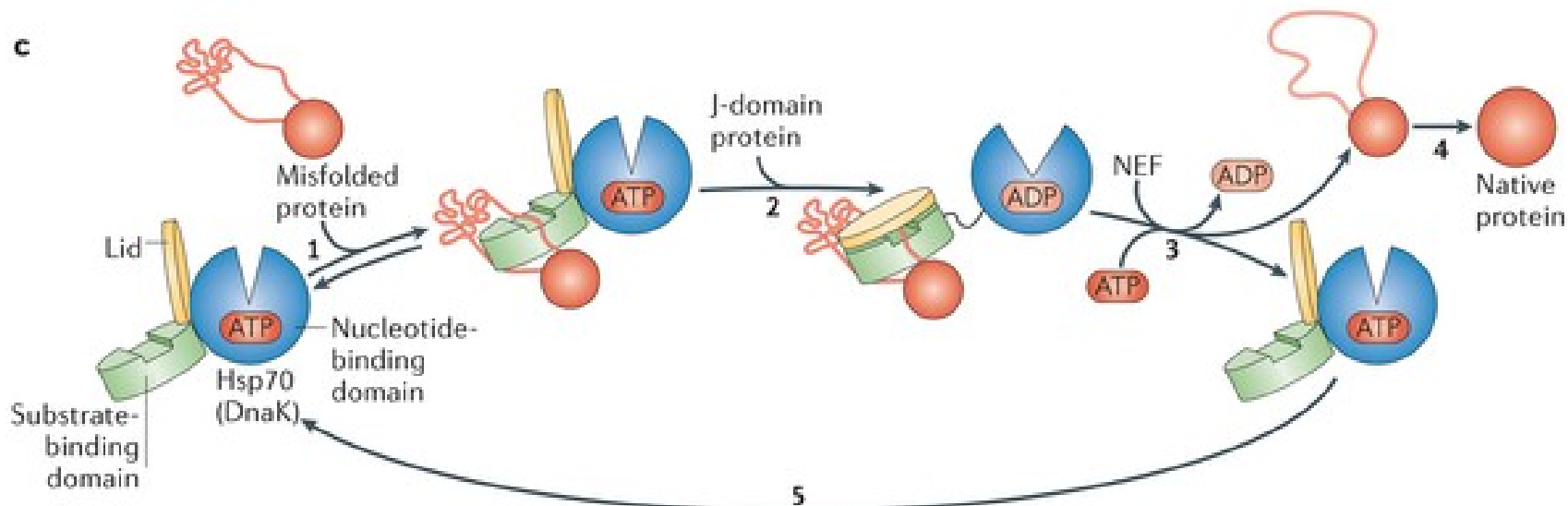
dva prvky sdílí jeden nebo více párů elektronů, vysoká vazebná energie

Skládání proteinů (folding)

- pro správnou funkci musí být protein správně složen
- Primární sekvence je někdy dostatečná pro přímé skládání

Chaperony

- Čerstvě vytvořené nebo denaturované proteiny často potřebují pomoc "chaperonů" pro složení do správného tvaru
- **Funkce:** Chrání nesbalené proteiny a pomáhají jejich správnému sbalení
- Nejznámějšími chaperony jsou **heatshock proteiny** rodiny **Hsp70** (velikost 70 kDa), které v podobné struktuře existují u všech organismů
- Prokaryota exprimují 3 proteiny Hsp70 rodiny: **DnaK**, HscA (Hsc66) a HscC (Hsc62)
- Heatshock proteiny se také tvoří vlivem stresu (např. vysoké teplotě)
- Proteiny denaturované teplem mohou být renaturovány pomocí chaperonů



POSTTRANSLAČNÍ ÚPRAVY

Chemická modifikace, kterou vzniká funkční polypeptidový řetězec

- Vyštěpení peptidů

- odstraňují se větší úseky polypeptidu
- podobně jako u pre-mRNA dochází ke "splicingu"
- vyštěpují se "inteiny" a zůstávají "exteiny"

- Tvorba kvartérní struktury

- spojení více polypeptidových řetězců do "oligomerních proteinů"
- většinou vodíkové můstky a jiné nekovalentní vazby
- dimer, trimer, tetramer...
- oligomer se v živé soustavě chová jako jedna molekula s biologickou funkcí

- Sestavování nadmolekulárních struktur

- enzymové komplexy, ribozomy, proteinové filamenty, membrány aj.

- Přidání prostetických skupin (kofaktorů)

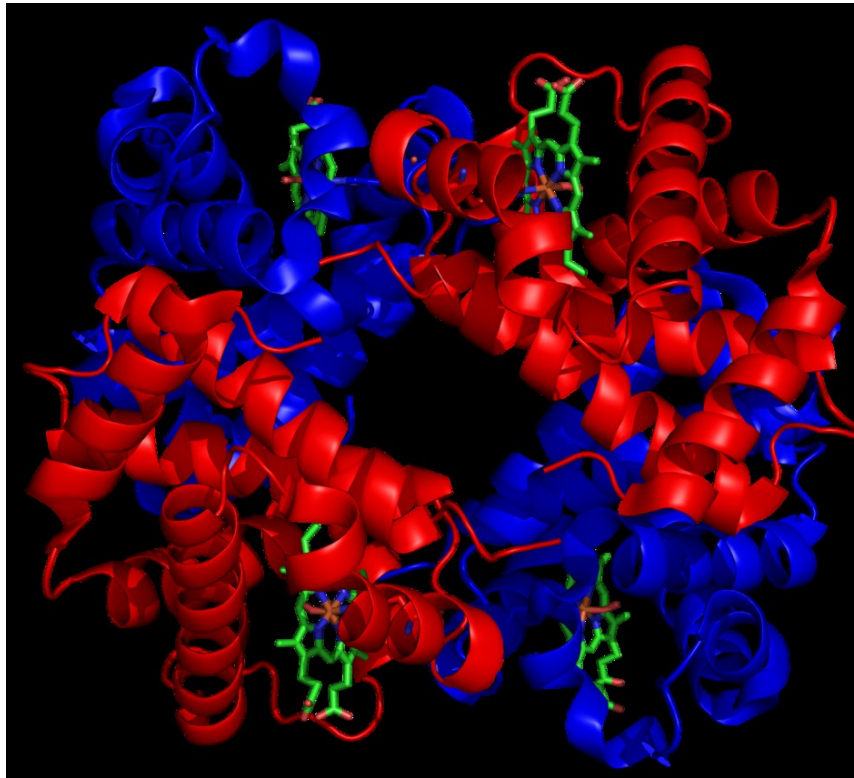
- kofaktor: nepolypeptidová jednotka nutná pro funkci určitého proteinu
- prostetická skupina: kofaktor pevně vázaný na protein (i kovalentně)
- nachází se v aktivním místě enzymu

a) organická: vitamín, lipid, cukr

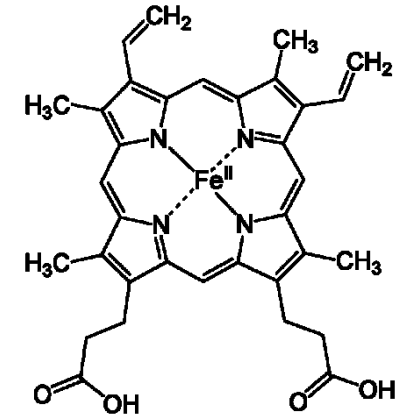
b) anorganická: iont kovu

POSTTRANSLAČNÍ ÚPRAVA HEMOGLOBINU

- transportní metaloprotein červených krvinek obratlovců
- **Funkce:** transport kyslíku z plic do tkání a odstraňování oxidu uhličitého z tkání do plic
- u dospělého člověka se skládá ze **4 podjednotek** (2x α , 2x β)
- každá podjednotka obsahuje
 - a) bílkovinnou část – globin
 - b) prostetickou část – hem (s železem)



Struktura hemoglobinu: Proteiny 2x α (červená) a 2x β (modrá) a hemové skupiny (zelená) (zdroj: wikipedia)



Hemová skupina (zdroj: wikipedia)

POSTTRANSLAČNÍ ÚPRAVA HEMOGLOBINU

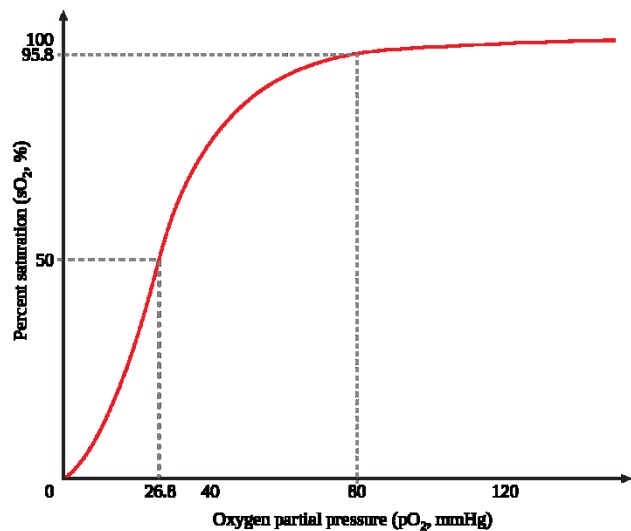
- podle polarity aminokyselin v globinu se molekula ve vodě uspořádá do terciární struktury (hydrofobní interakce)

a) hydrofilní AA vně molekuly

b) hydrofobní AA dovnitř molekuly (tzv. hydrofobní kapsa)

- do hydrofobní kapsy je vložena molekula hemu (dvojmocné železo chráněno proti oxidaci $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$)

- každý ze 4 Fe^{2+} iontů hemu reverzibilně váže molekulu kyslíku (oxygenace hemoglobinu)

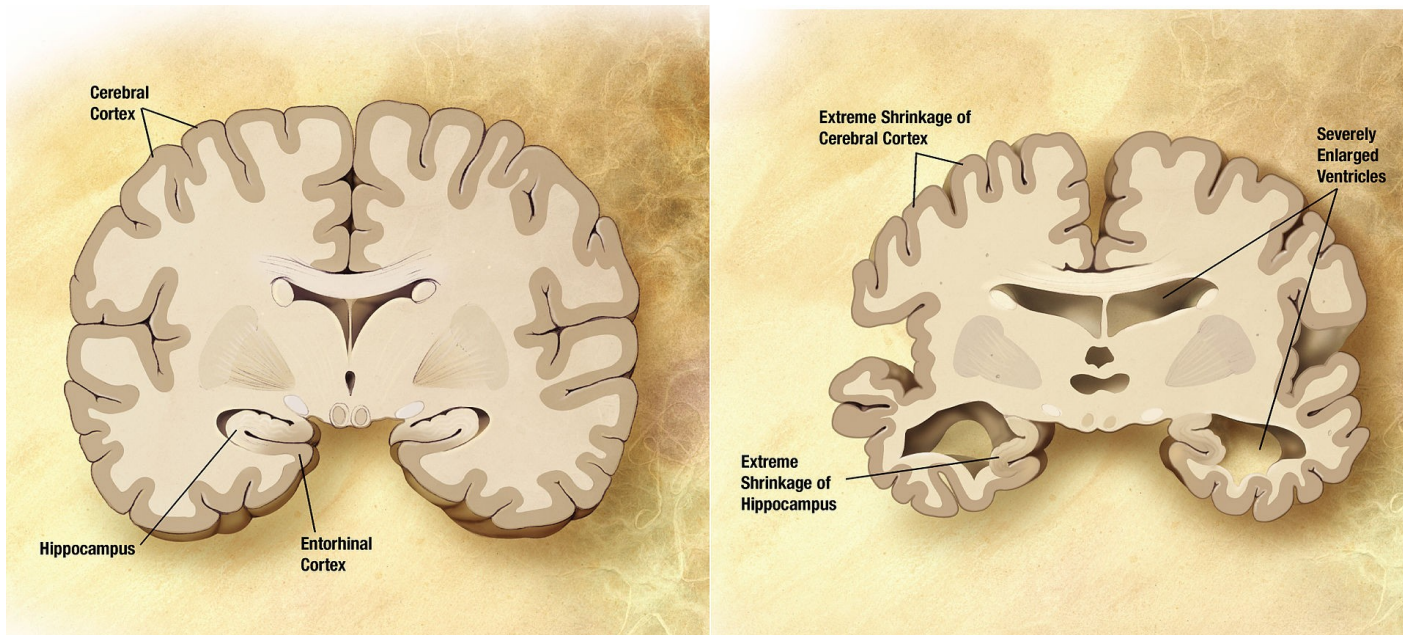


Schopnost navázání O₂ a ztráta CO₂ na železnatém ionu je úměrný parciálnímu tlaku dýchacích plynů (v plicích má kyslík vyšší parciální tlak než oxid uhličitý – ve tkáních je tomu naopak). Zdroj Wikipedia.

Některé nemoci jsou charakteristické chybným tvarem určitých proteinů

Alzheimerova nemoc (AD)

- 70% případů demence je způsobeno AD
- ztráta krátkodobé paměti → problémy s řečí, dezorientace, výkyvy nálad, nevhodné chování → ztráta tělních funkcí a smrt
- doba přežití od diagnózy: 3-9 let
- příčiny: genetické predispozice (70%), vysoký tlak, deprese
- fyzické a duševní cvičení pomáhá, léčba neexistuje



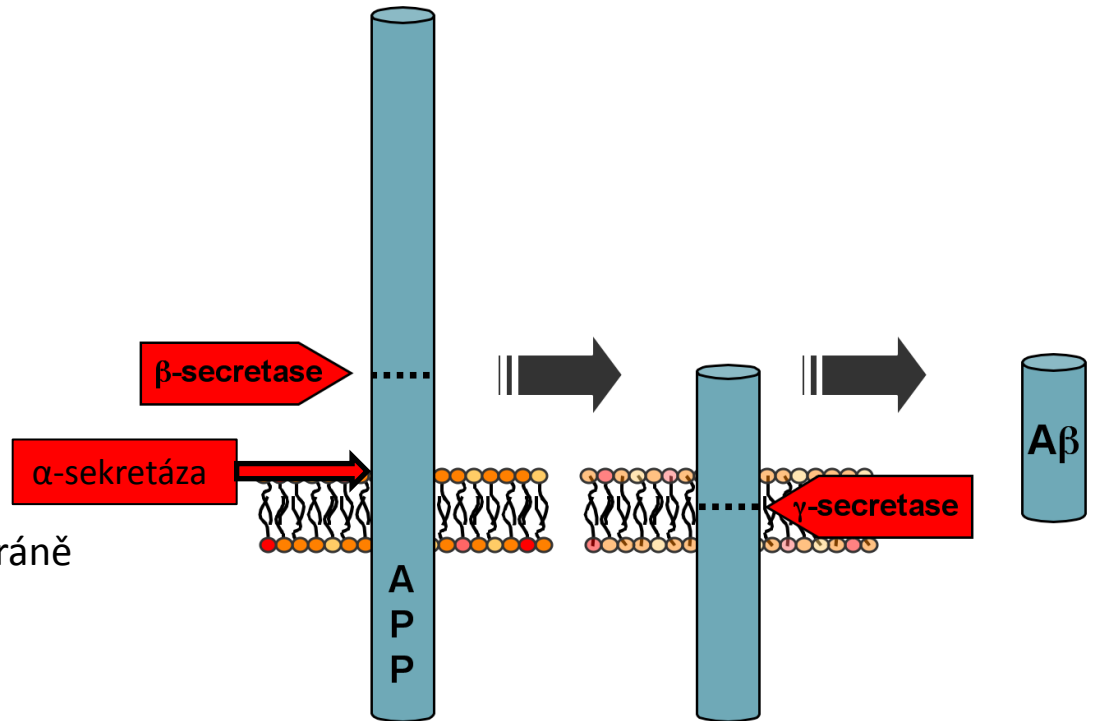
Molekulární podstata AD

Amyloid prekursorový protein (APP)

- membránový protein
- koncentrován v synapsích neuronů
- regulátor tvorby synapsí, neurální plasticity a exportu železa
- je prekurzorem molekuly **beta amyloidu (A β)** - polypeptidu 37-49 AA
- oligomery A β způsobují **amyloidní plaky na mozku pacientů s AD**

Sekretáza

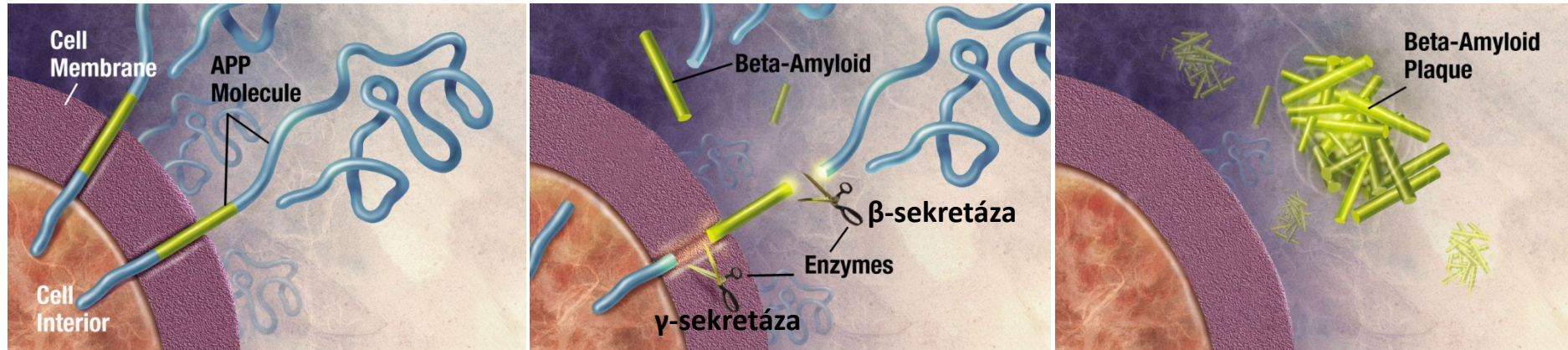
- enzym, který štěpí APP
- 3 formy:
 1. α -sekretáza (hodná)
 2. β -sekretáza (zlá)
 3. γ -sekretáza (neutrální)
- pokud štěpí nejprve β -sekretáza a pak γ -sekretáza \rightarrow vzniká A β
- α -sekretáza štěpí blíže buněčné membráně a po štěpení γ -sekretázou nevzniká A β



Molekulární podstata AD

Progresivní akumulace toxických A β oligomerů vede k:

1. disbalanci mezi hladinou produkce, agregace a odstraňování A β
2. poškození synapsí - tvorba membránových pórů
3. změny signálních drah účastnících se neurogenese a správné tvorby synapsí (GSK3b, CDK5)



Pro podporu teorie akumulace A β oligomerů v AD hovoří výskyt nemoci (kolem věku 40 let) u Downova syndromu (trizomie 21 páru, kde se nachází gen pro APP)

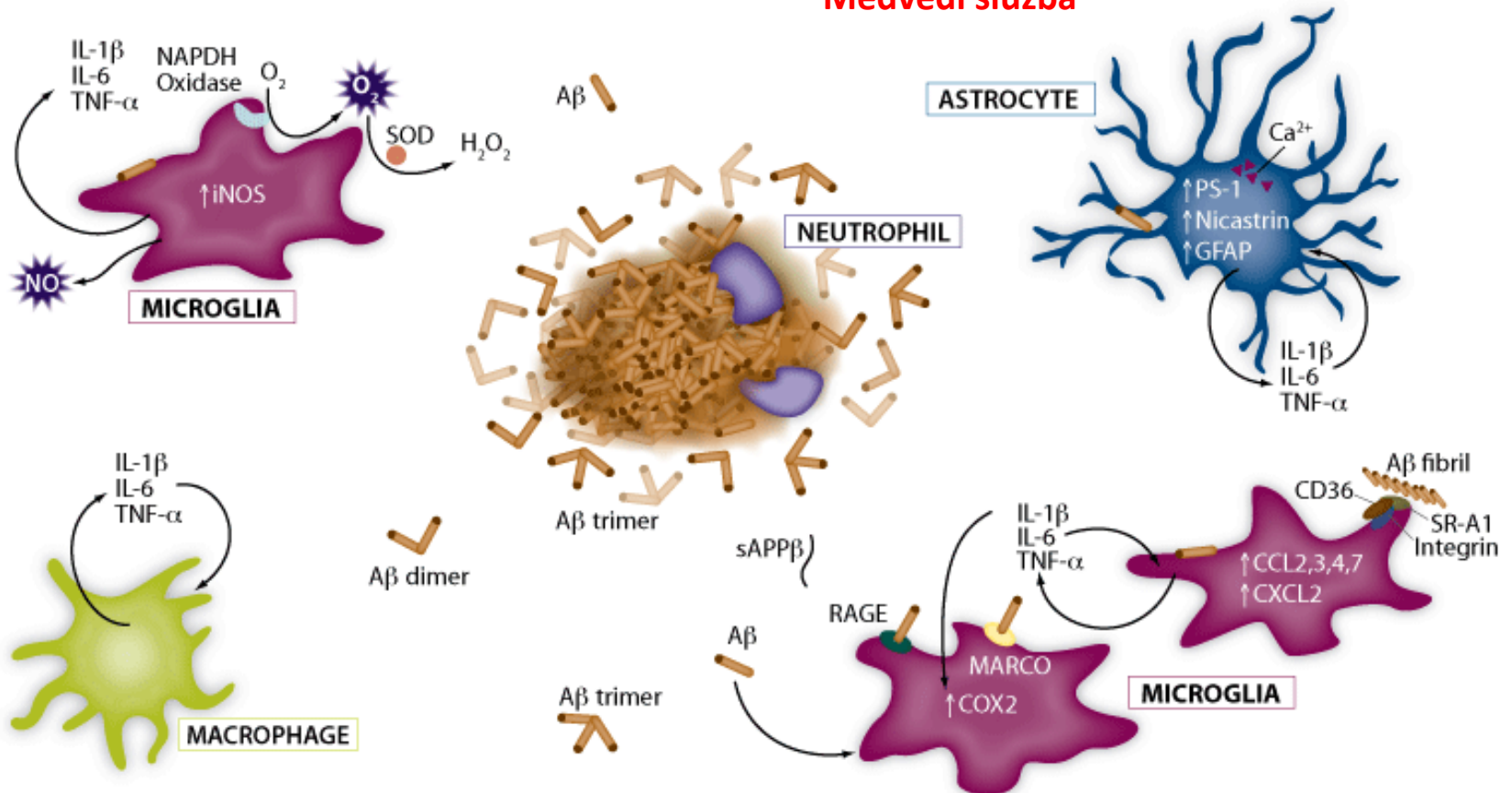
pozn. Existuje také "Tau hypotéza", která přisuzuje vznik AD špatně fungujícímu Tau proteinu, který má za úkol stabilizovat mikrotubuly v neuronálních synapsích

Molekulární podstata AD

4. aktivaci imunitního systému

- shluky A β oligomerů, tvořící amyloidní plaky, stimulují vyplavování chemoaktraktantů poškozenými neurony, makrofágy, mikroglii (druh makrofágu v mozku) a astrocyty (výživové, strukturní a imunitní buňky)
- cytokiny jako IL-1 β , IL-6 a TNF- α působí pro-zánětlivě a přivábí neutrofily
- tato imunitní reakce má bránit mozek, ale v důsledku vede ke chronickému zánětu a je jedním z hlavních faktorů rozvoje nemoci :(

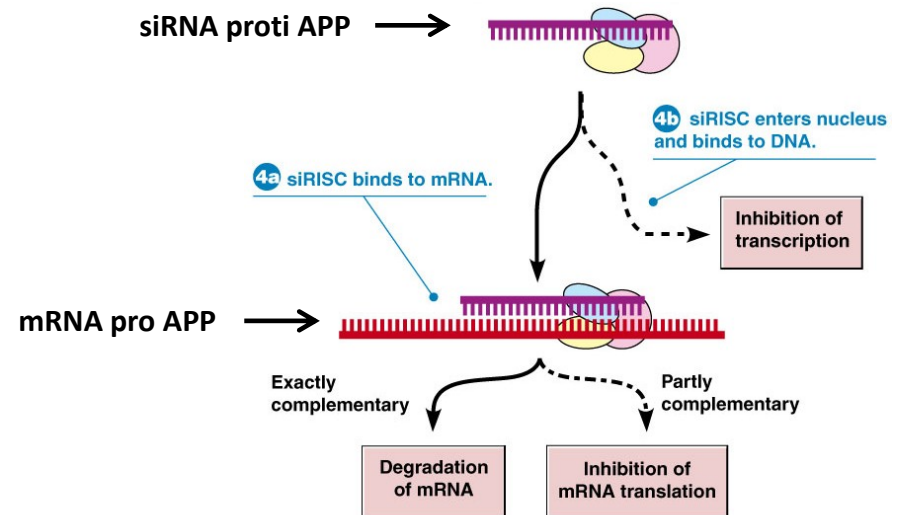
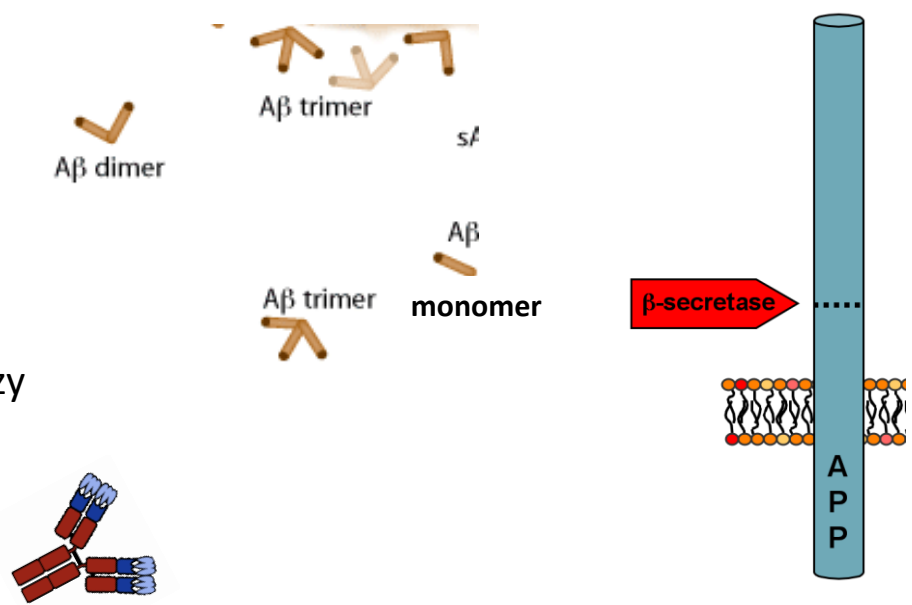
Medvědí služba



Molekulární podstata AD

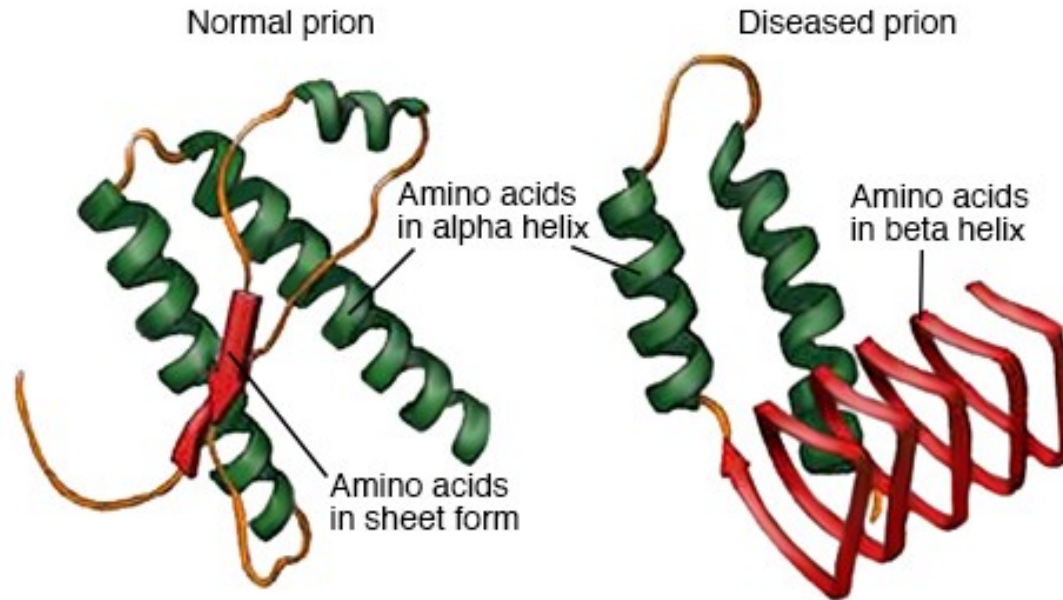
Látky pro možnou léčbu AD

- anti-agregační látky - blokují tvorbu oligomerů
- regulátory APP proteolýzy - blokace β -sekretázy
- redukce produkce APP - např. siRNA
- odstranění A β oligomerů - např. protilátkami
- blokátory hyperaktivních signálních drah a jejich receptorů, které jsou aktivovány neurotoxickými A β oligomery (Fyn kináza, GSK3b, CDK5 inhibitory)



Priony

- přirozeně se vyskytující proteiny v mozku zvířat a lidí jsou-li správně složené jsou neškodné
- špatně složené způsobují nemoci
 - BSE u dobytka (Bovinní spongiformní encefalopatie; nemoc šílených krav)
 - Creutzfeldt-Jakobova nemoc u lidí



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED