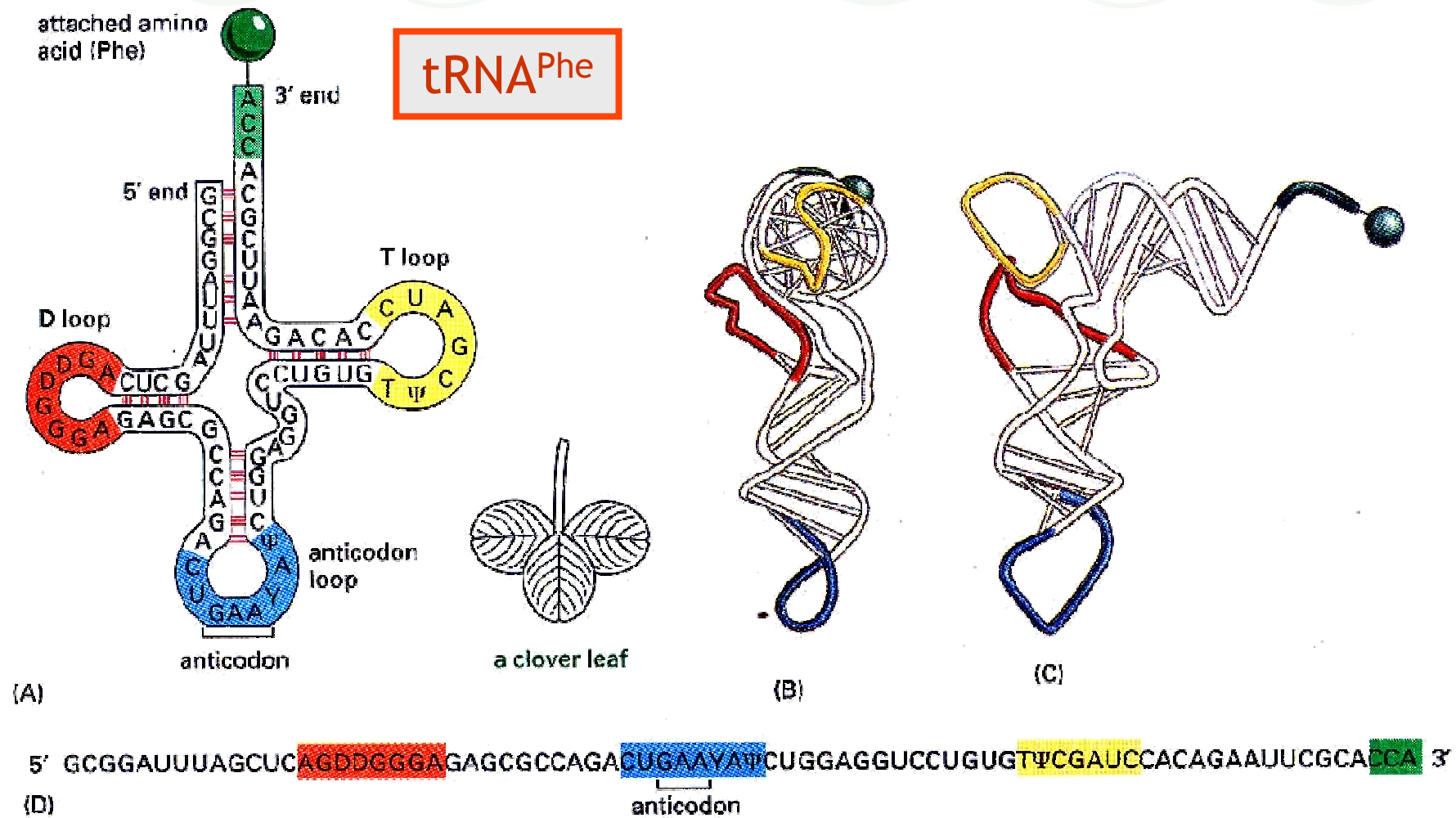


Translace - překlad genetické informace

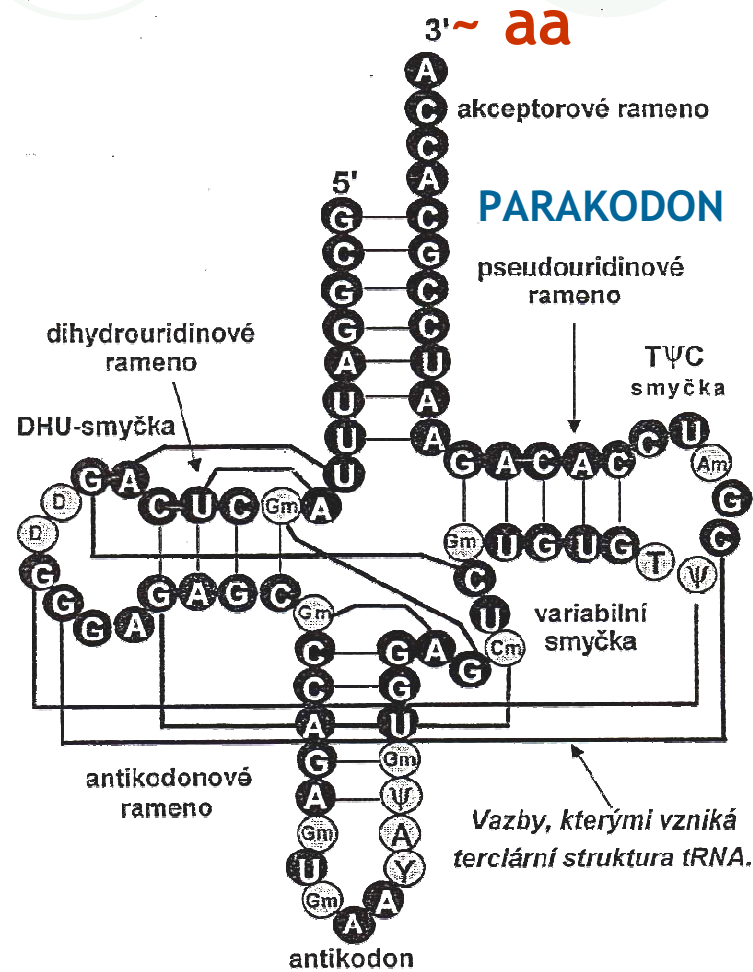
Složky translačního aparátu:

- mRNA
- 20 standardních aminokyselin (+ SeCys. Pyrrolyzin))
- molekuly tRNA
- aminoacyl-tRNA-syntetázy
- ribozomy
- translační faktory: IF, EF, RF
- ATP, GTP

Struktura molekuly tRNA



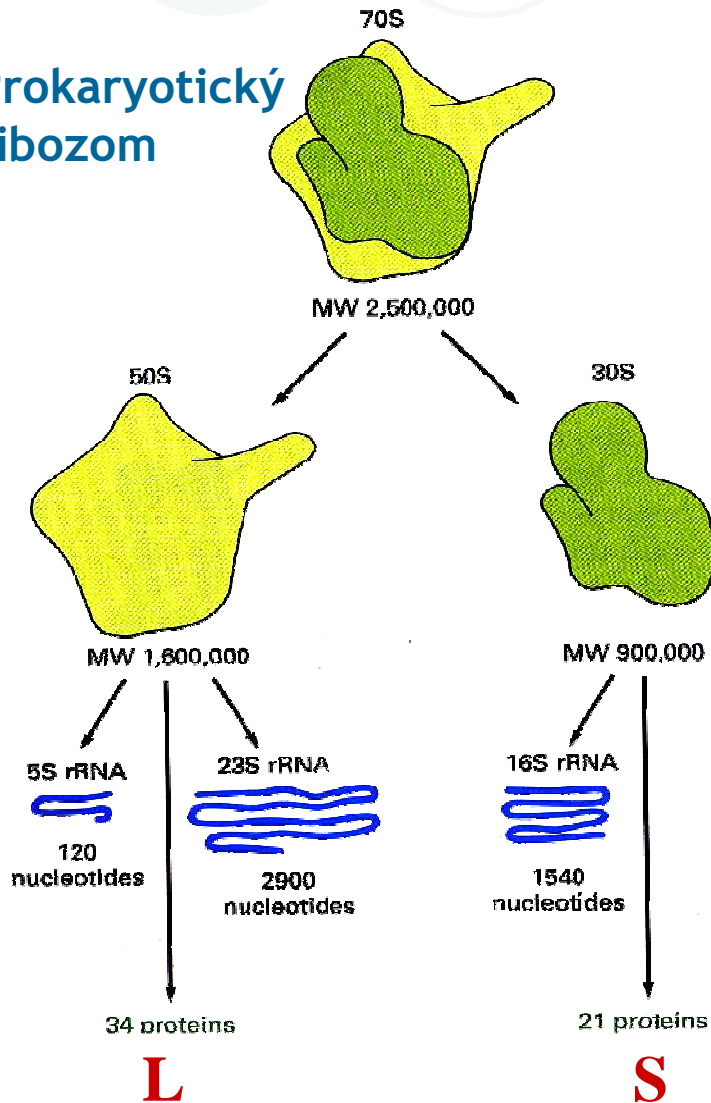
Sekundární struktura tRNA



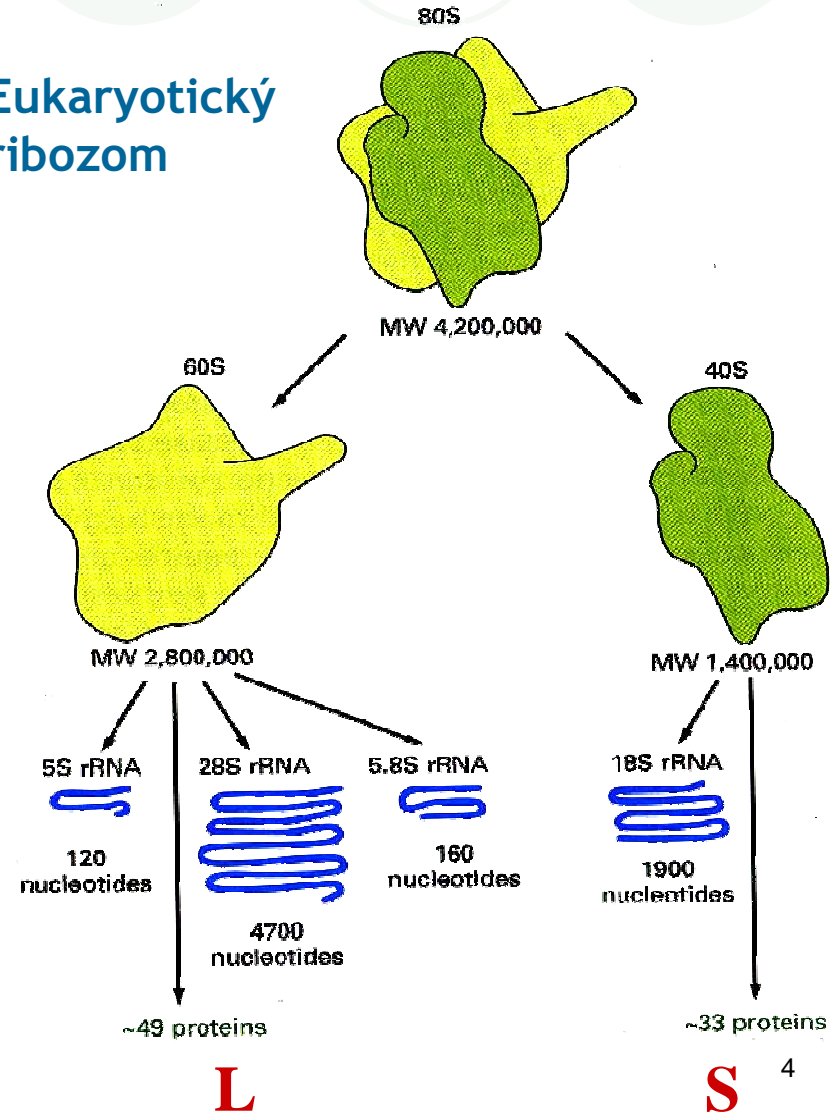
černé kroužky = standardní nukleotidy
 šedé kroužky = neobvyklé nukleotidy

Srovnání struktury prokaryotického a eukaryotického ribozomu

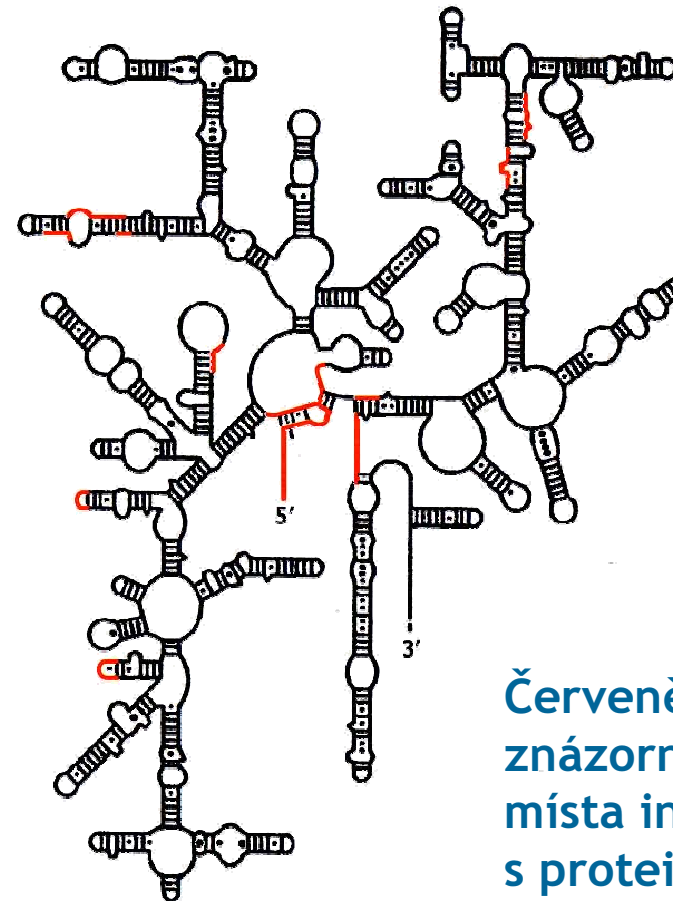
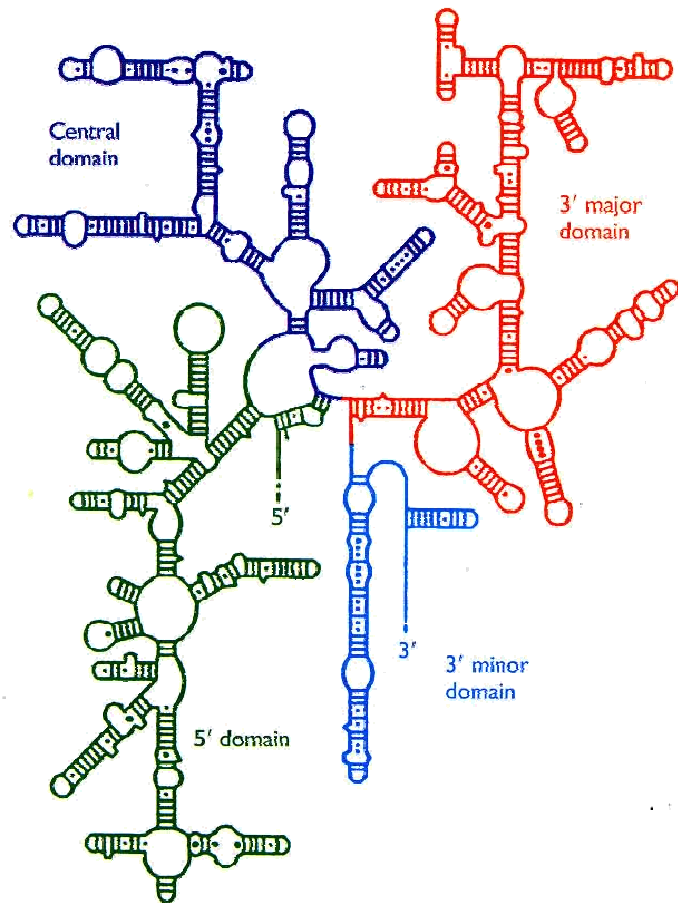
Prokaryotický ribozom



Eukaryotický ribozom

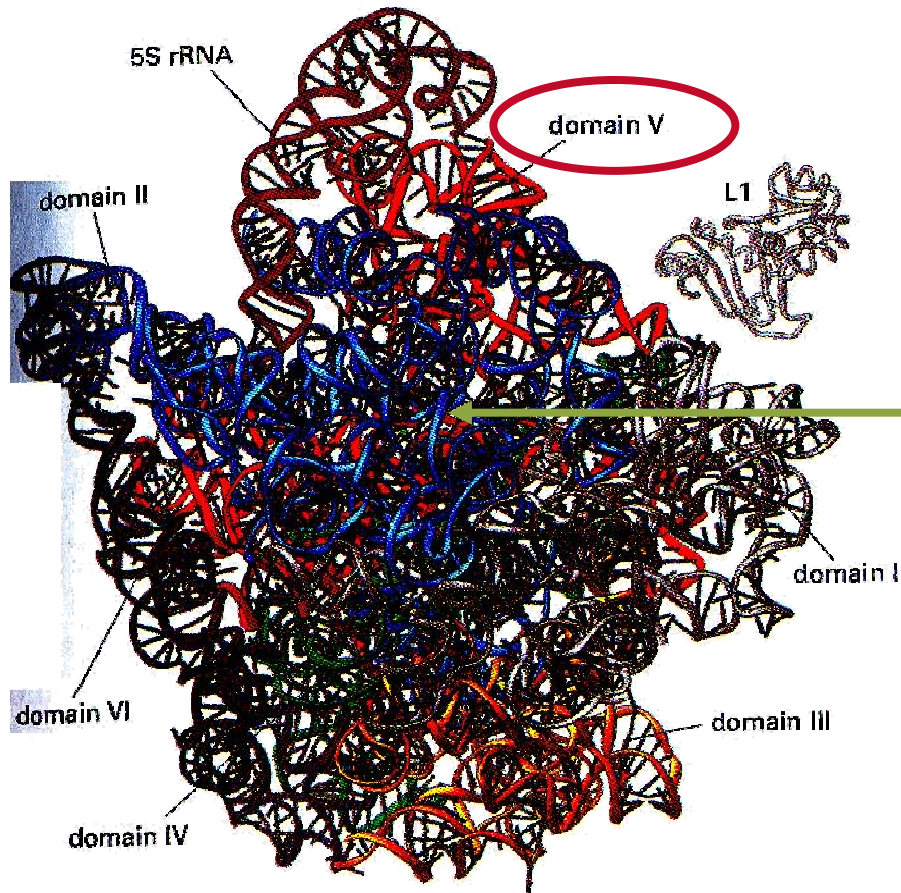


Sekundární struktura 16S rRNA *E. coli*

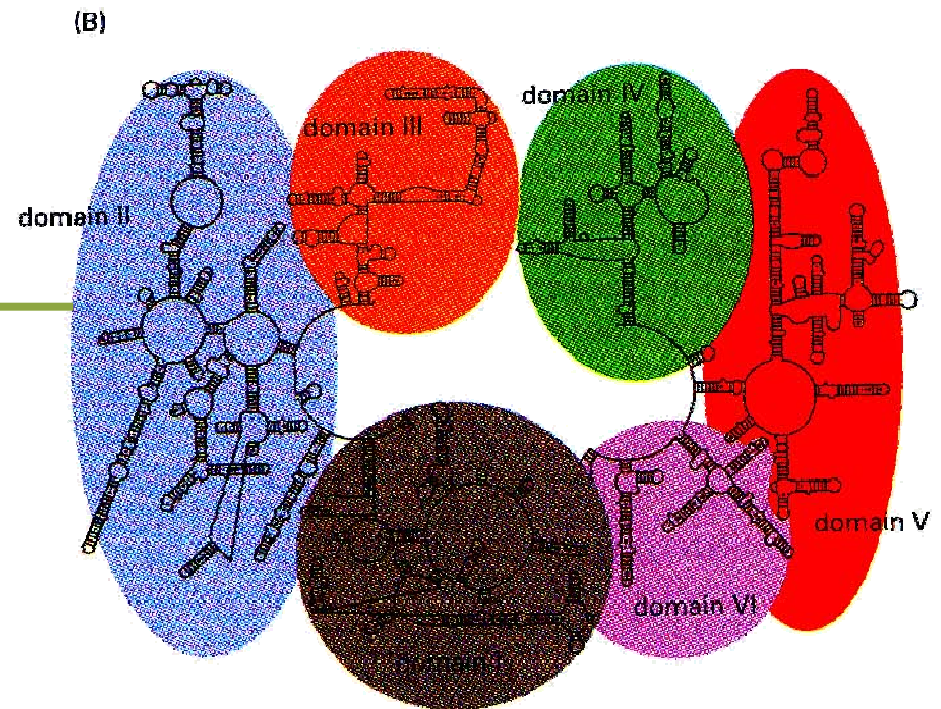


Červeně jsou
znázorněna
místa interakce
s proteinem S5

Struktura molekul rRNA (5S a 23S) ve velké ribozomové podjednotce bakterií stanovená rentgenovou krystalografií

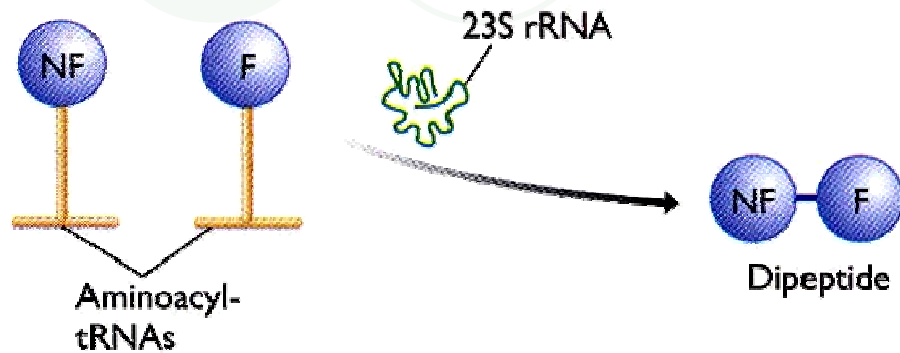


Trojrozměrná struktura rRNA a L1 proteinu v poměrné velikosti



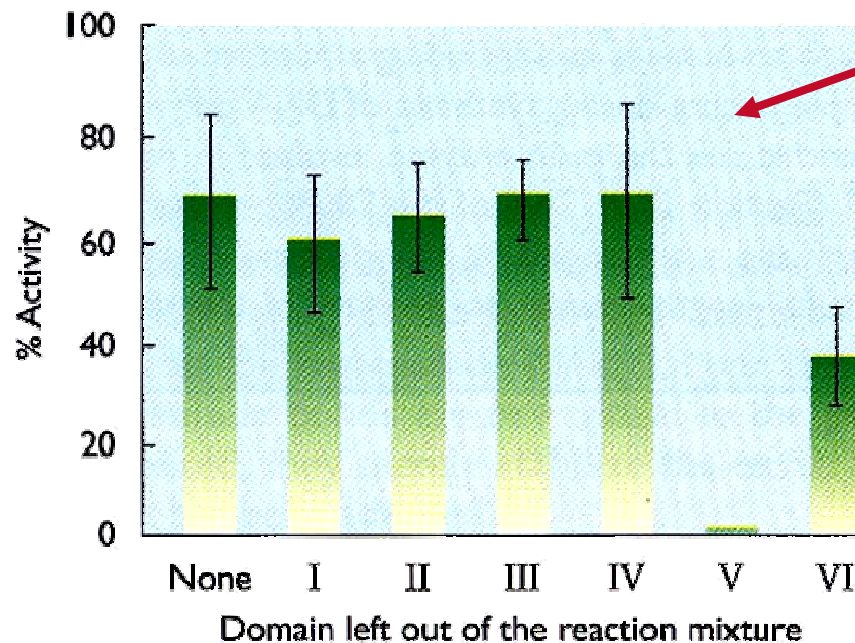
Schema sekundární struktury 23S rRNA

Peptidyltransferázová aktivita 23S rRNA - ribozymu



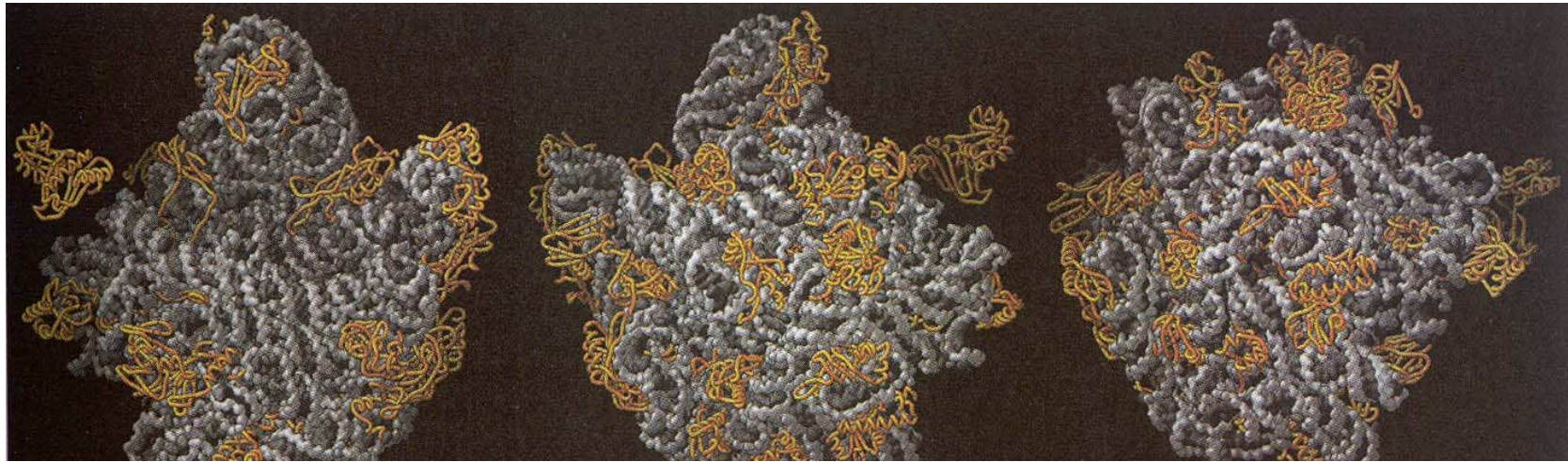
Purifikovaná 23S rRNA z *E. coli* katalyzuje vytvoření peptidové vazby mezi aminokyslečinami vázanými na tRNA za tvorby dipeptidu

Schopnost šesti domén 23S rRNA tvořit peptidovou vazbu.



Odstranění domény V vedlo k neschopnosti vytvořit peptidovou vazbu, tj. tato doména má při vytváření peptidové vazby klíčovou funkci

Struktura velké podjednotky bakteriálního ribozomu



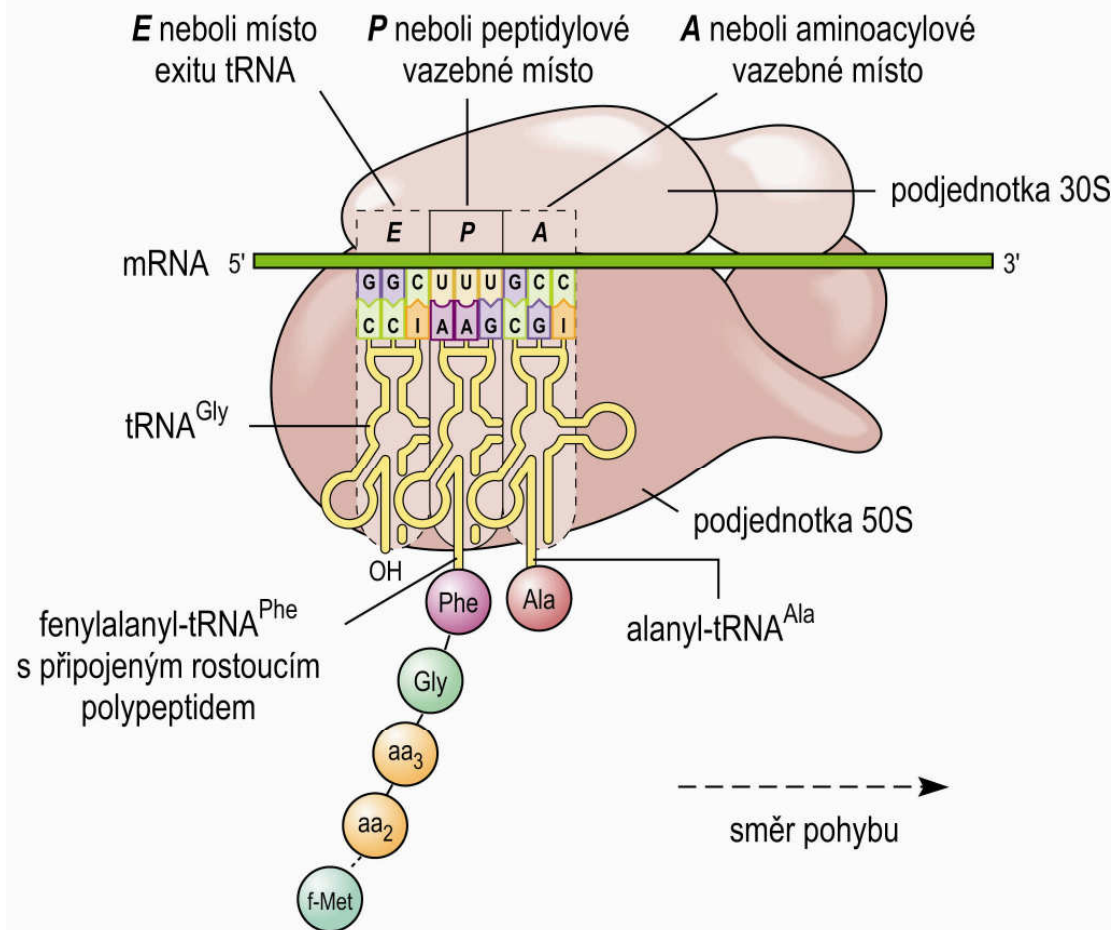
Šedě = 5S a 23S rRNA; žlutě: L proteiny

rRNA zodpovídá za:

1. Strukturu ribozomu
2. Interakci tRNA s mRNA při translaci
3. Katalýzu peptidové vazby

Struktura ribozomu *E. coli* s vyznačením funkčních míst

schéma ribozomu 70S



(a)

Standardní genetický kód

Kodony					
První nukleotid	Druhý nukleotid				Třetí nukleotid
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	N	N nebo Secys	A
	Leu	Ser	N (pyrrolyzin)	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met nebo I	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Kodonové rodiny jsou vyznačeny modře; N = nesmyslný kodon; I = iniciační kodon;

Secys = kodon pro selenocystein, UAG = pyrrolyzin

Čtení genetického kódu molekulami tRNA

20 standardních aminokyselin



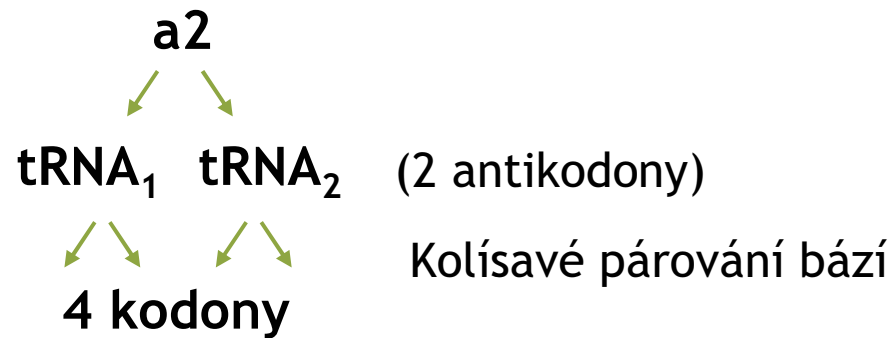
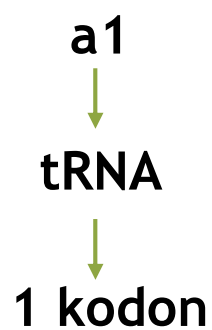
20 aa-tRNA-syntetáz



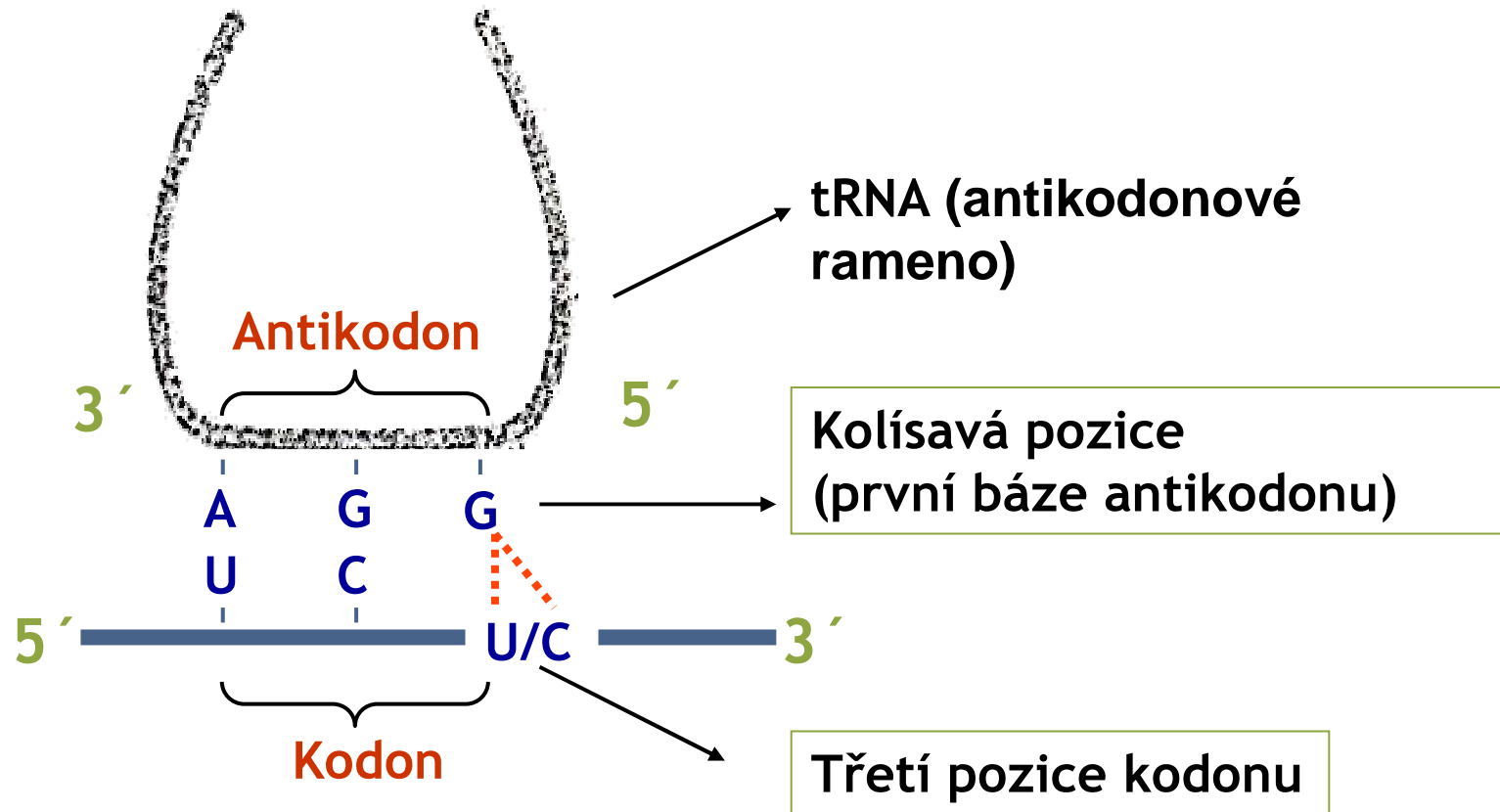
22-45 molekulárních druhů tRNA (tj. antikodonů)



61 kodonů se smyslem



Kolísavé párování bazí na 5' antikodonu tRNA



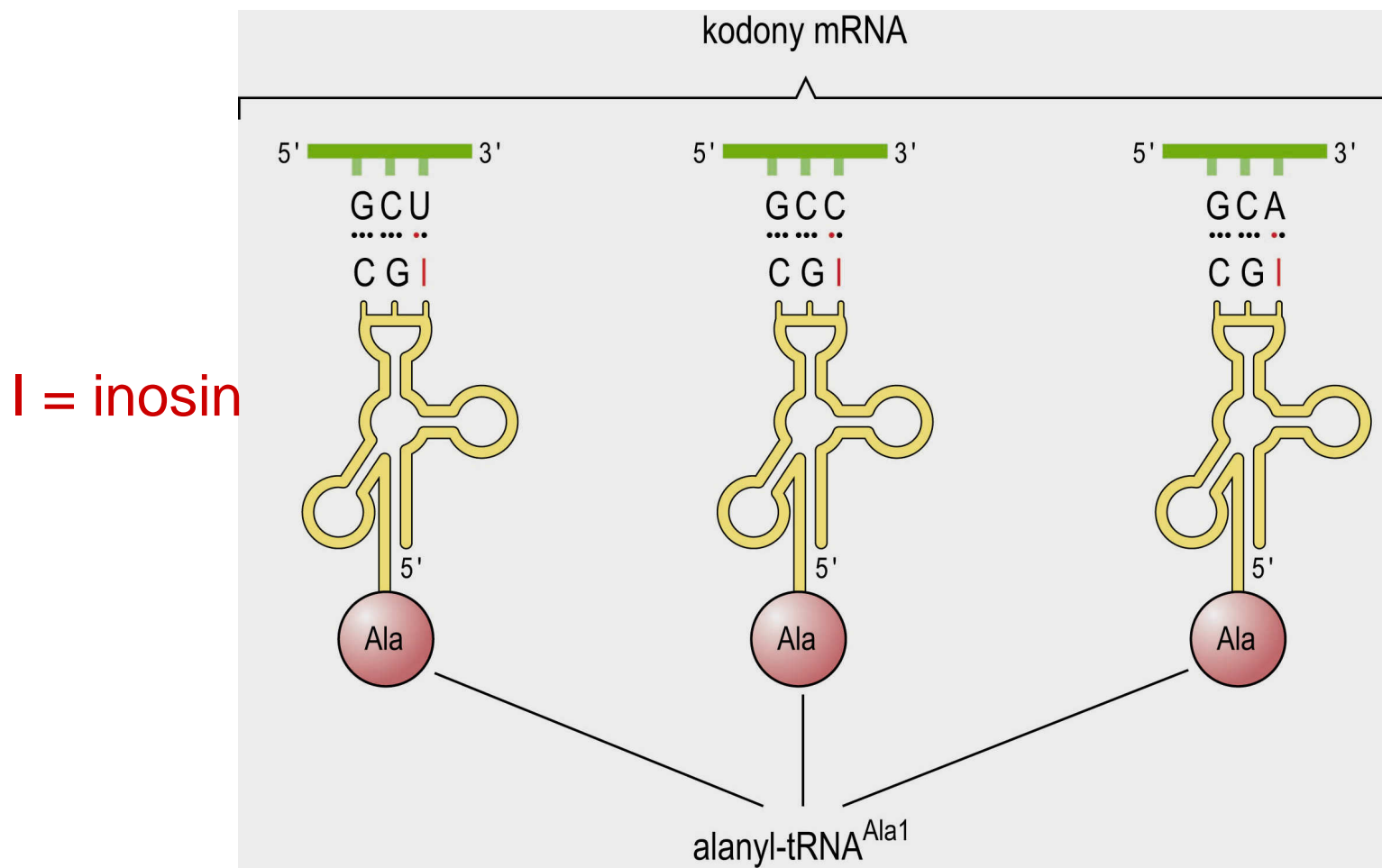
Jedna tRNA: AGG (antikodon)
Dva kodony: UCU UCC

Možnosti čtení třetího nukleotidu kodonu podle pravidel kolísavého párování bází

První nukleotid antikodonu	Třetí nukleotid kodonu	Možnost čtení	Organizmy
U	UCAG	Kodonové rodiny	Mitochondrie, Mycoplasma, chloroplasty
o ⁵ U	UAG	Kodonové rodiny (Ser UCN, Val, Thr, Ala)	Eubakterie
mem ⁵ U	AG	Dvoukodonové sady	Mitochondrie, bakterie, eukaryota
m ⁵ s ² U	A(G)	Dvoukodonové sady	Eubakterie, eukaryota
G	UC	Dvoukodonové sady	Všechny
G	UC	Kodonové rodiny	Bakterie
Q	UC	Dvoukodonové sady	Eubakterie, eukaryota
Hyp	UCA	Arg CGN	Eubakterie
Hyp	UCA	Kodonové rodiny kromě Gly GGN	Eukaryota
A	U	Thr ACU, Arg	Mycoplasma, mitochondrie kvasinek
C	G	Všude	Všechny

Hyp = hypoxantin; Q = queozin O⁵U = uracil-5-oxoctová kyselina; m⁵S²U = 5-metyl-2-tiouracil; mem⁵U = 5-metylkarbonylmetyl-2-tiouracil;

Kolísavé párování bází mezi antikodonem **CGI** v tRNA a třemi odlišnými (synonymními) kodony



Čtení kodonů pro serin molekulami tRNA

Kodon	tRNA	Antikodon
UCU	tRNA ^{Ser₁}	AGG + kolísání
UCC		
UCA	tRNA ^{Ser₂}	AGU + kolísání
UCG		
AGU	tRNA ^{Ser₃}	UCG + kolísání
AGC		

Izoakceptorové tRNA jsou tRNA o různých antikodonech vázající tutéž aminokyselinu

Srovnání využívání kodonů silně a slabě exprimovaných genů u E. coli

		U	C	A	G				
		silně/slabě		silně/slabě		silně/slabě			
U	Phe	39 151 113 102	Ser	93 36 87 49	Tyr	34 96 98 65	Cys	13 34 23 39	U C A G
	Leu	12 71 16 64		6 37 12 62		ochre amber		opal Trp	
C	Leu	26 73 33 69 → 3 22 345 294	Pro	21 29 2 46 26 45 162 101	His	19 95 75 59 38 90 169 166	Arg	223 99 101 133 → 3 27 → 1 42	U C A G
		A		Ile		67 156 262 118 → 2 27		Thr	
G	Met		140 130		Ala	173 87 48 178 119 107 129 149	Lys		116 183 204 106 333 210 106 98
		Val	192 108 41 66 119 48 83 123	Glu		Gly		226 124 174 140 → 4 42 → 14 66	

Silně exprimované geny představuje 24 druhů mRNA s celkovým počtem 5253 kodonů. Mezi tyto geny patří gen pro RNA-polymerázu, geny pro dvanáct ribozomických proteinů, několik proteinů vnější membrány a geny pro elongační translační faktory.

Slabě exprimované geny představuje 18 druhů mRNA s 5231 kodony. Patří sem několik represorových genů, gen pro transponázu a B-laktamázu.

Kodony, které jsou čteny jen jedinou tRNA a jejichž výběr je závislý na povaze a síle interakcí mezi kodonem a antikodonem, jsou v rámečku. Šipkami jsou označeny kodony, které jsou používány jen zřídka a mohou se podílet na regulaci genové exprese.

Klasifikace aminoacyl-tRNA-syntetáz

První třída (acylace na C2')		Druhá třída (acylace na C3')	
Specificita pro aminokyselinu	Počet podjednotek	Specificita pro aminokyselinu	Počet podjednotek
Arg	monomerní	Ala	tetramerní
Cys	monomerní	Asn	dimerní
Gln	monomerní	Asp	dimerní
Glu	monomerní	Gly	tetramerní($\alpha_2\beta_2$)
Ile	monomerní	His	dimerní
Leu	monomerní	Lys	dimerní
Met	dimerní	Phe	tetramerní($\alpha_2\beta_2$)
Trp	dimerní	Pro	dimerní
Tyr	dimerní	Ser	dimerní
Val	monomerní	Thr	dimerní

Např: tryptofanyl-tRNA-syntetáza

Bez ohledu na společnou funkci jsou syntetázy strukturně odlišné



Translace probíhá ve dvou etapách:

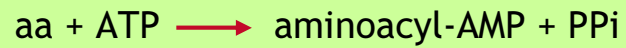
1. mimoribozomové (připojení aminokyseliny k její tRNA pomocí aminoacyl-tRNA-syntetázy)
2. ribozomové (na ribozomech jsou přiřazovány aminokyseliny podle sledu kodonů)

Ribozomová etapa má tři fáze:

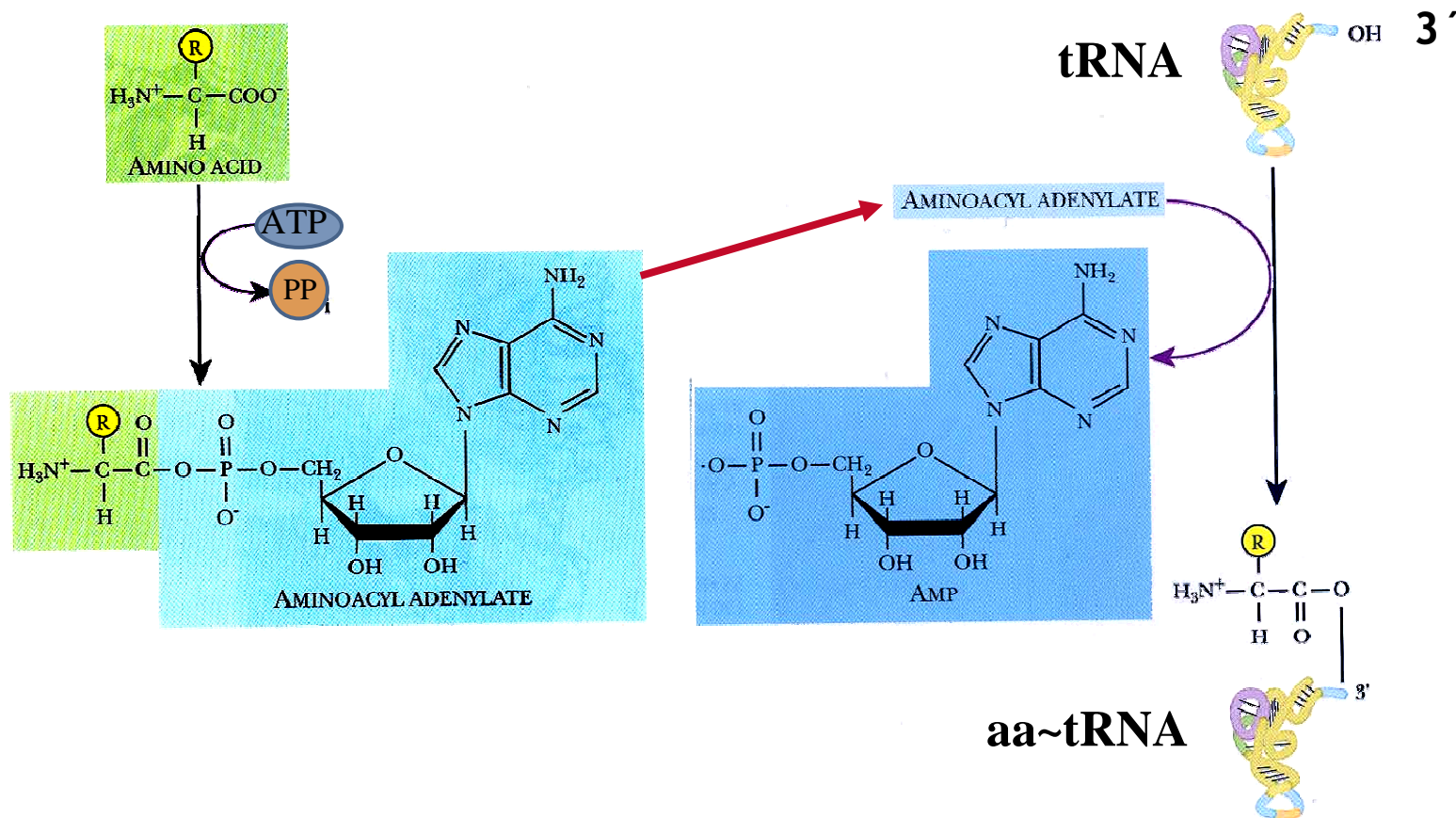
1. Iniclace translace
2. Elongace polypeptidového řetězce
3. Terminace translace

1. Mimoribozómová etapa: Nabíjení tRNA aminokyselinou

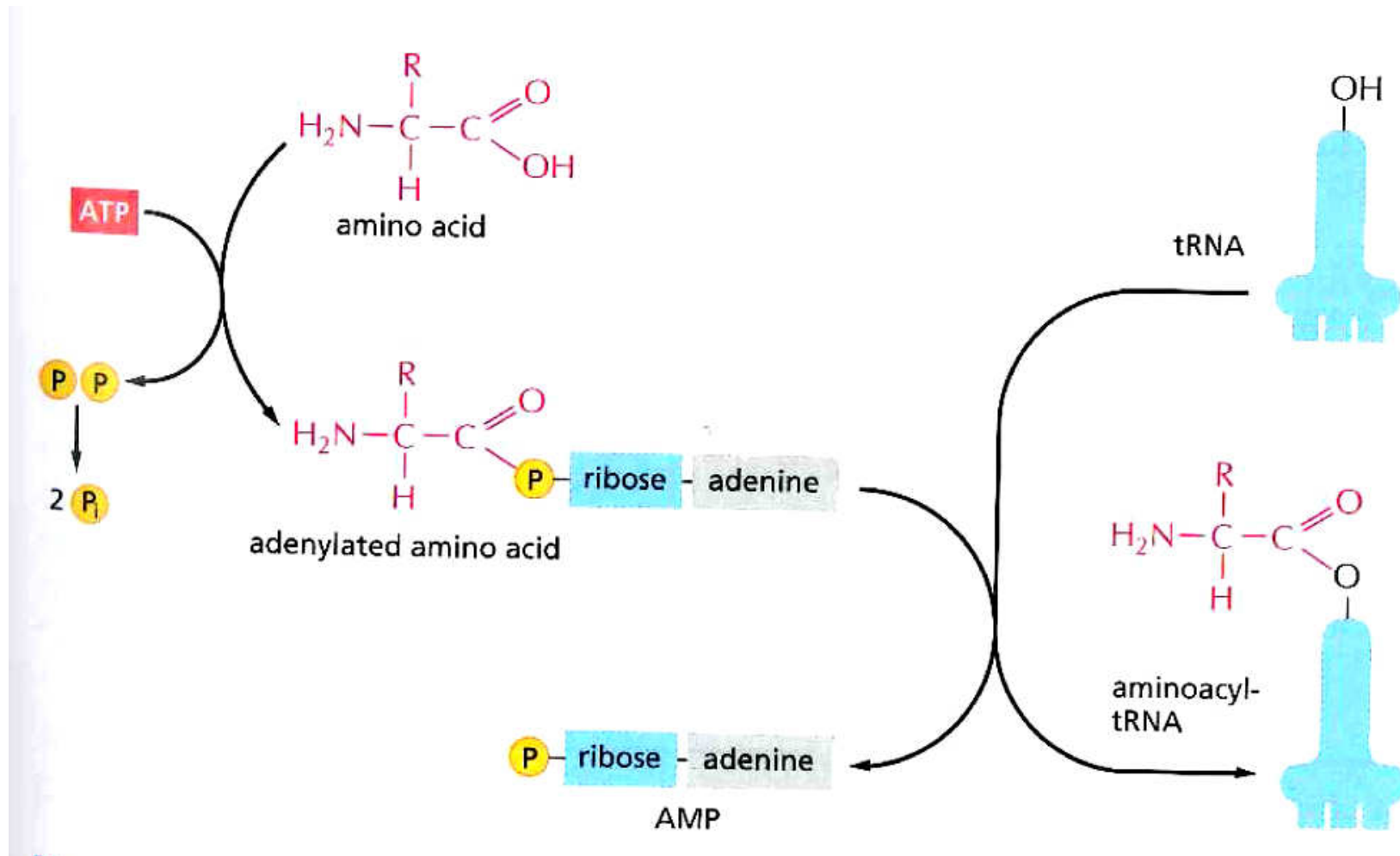
1. Vytvoření aminoacyladenylátu



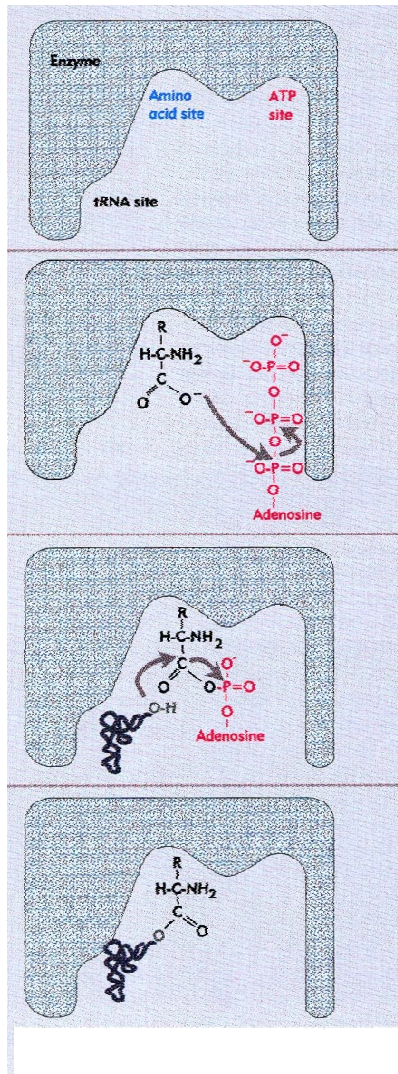
2. Přenos aminokyseliny na tRNA



Aktivace aminokyseliny aminoacyl-tRNA-syntetázou



Vznik aminoacyl-tRNA působením aminoacyl-tRNA-syntetázy



3 vazebná místa na aa-tRNA-syntetáze

1. pro aa
2. pro tRNA
3. pro ATP

1. aa + ATP --- aa-AMP + PP
Vznik aminoacyladenylátu

2. aa-AMP + tRNA
vznik aa~tRNA

tRNA s nabitou aminokyselinou

Vazba správné tRNA je stabilizována konformační změnou enzymu, která umožní rychlou aminoacylaci. Pokud je navázána chybná tRNA, ke konformační změně nedojde. Výsledkem je pomalejší reakce a disociace tRNA.

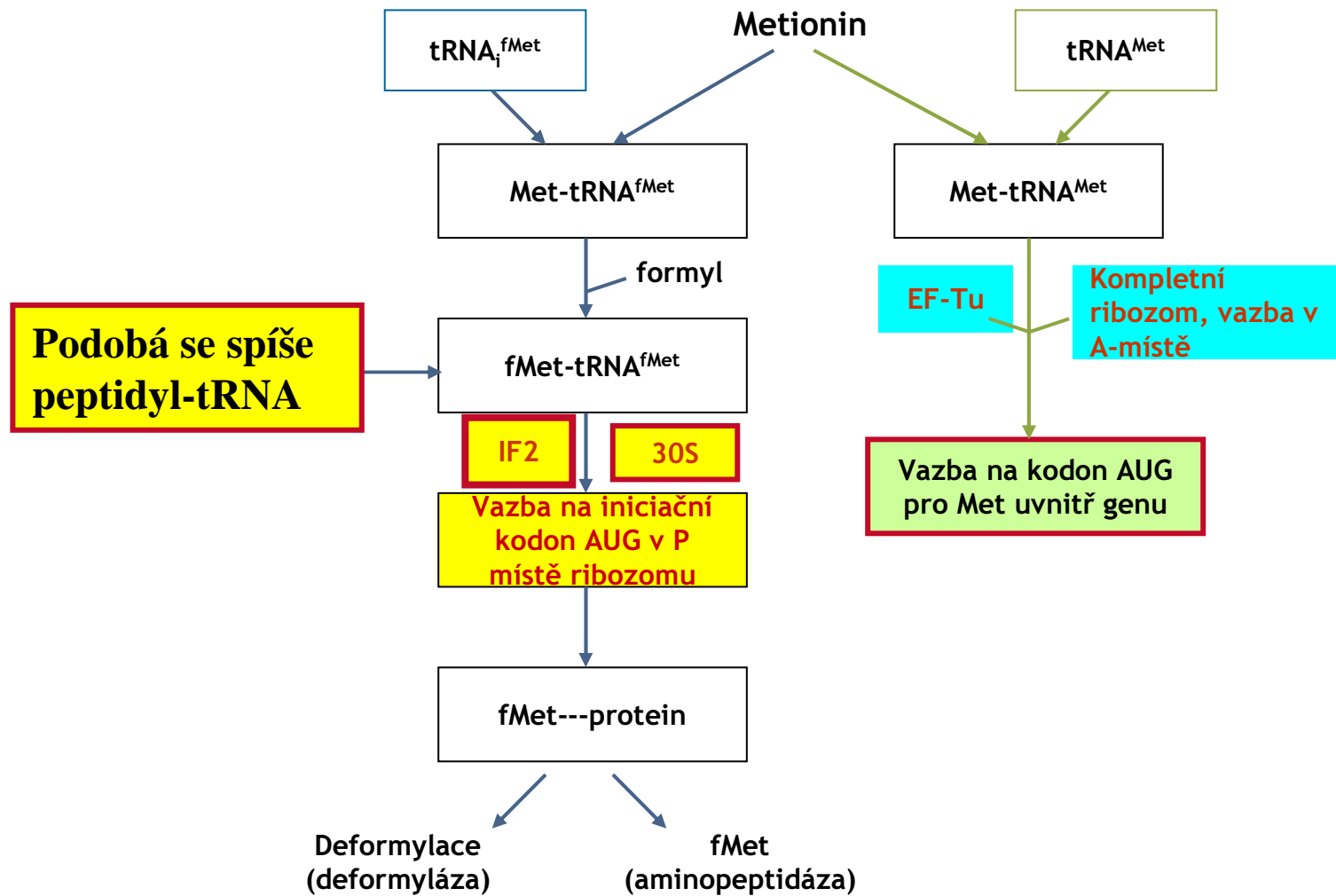
Přenos na ribozom



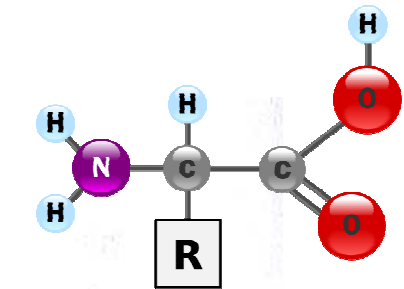
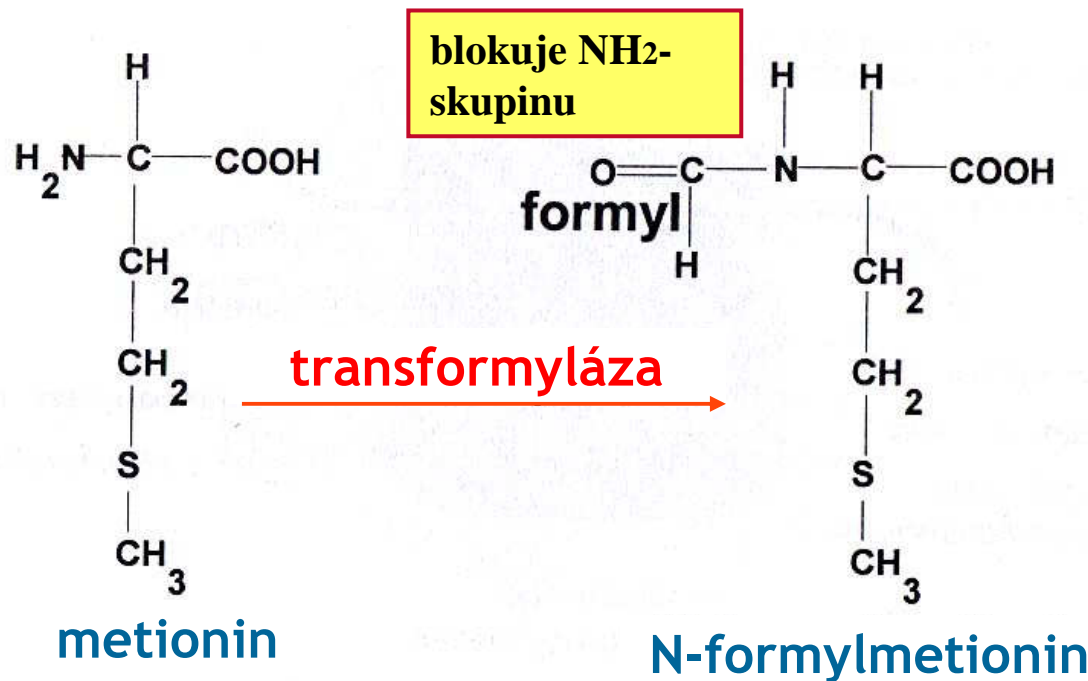
Ribozomová etapa translace - 3 fáze

- 1. Iniclace translace – vazba mRNA a první aa~tRNA na ribozom**
- 2. Elongace polypeptidového řetězce – průběžné přiřazování aminokyselin do rostoucího polypeptidového řetězce podle kodonů na mRNA**
- 3. Terminace translace – zakončení syntézy polypeptidového řetězce, odpoutání mRNA z ribozomu a jeho rozpad na podjednotky**

Zařazování metioninu do polypeptidu během iniciace translace a během její elongace u prokaryot - odlišné vlastnosti tRNA vázajících Met



Metionin je po vazbě na fmet-tRNAi formylován na formylmetionin, který je po začlenění do polypeptidu deformylován na metionin, který může být následně z N-konce polypeptidu odstraněn

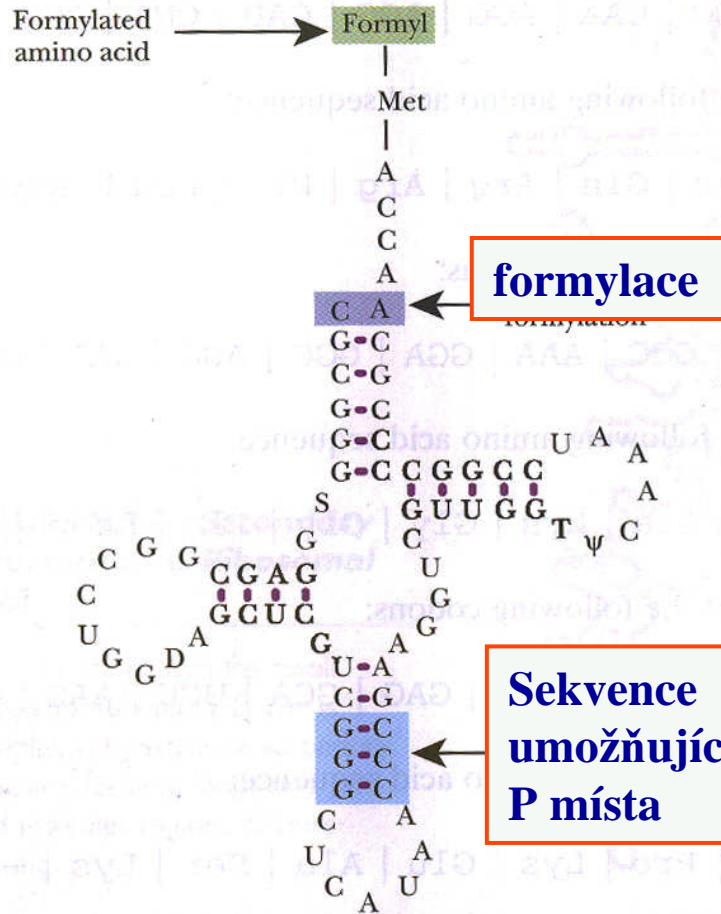


deformyláza
aminopeptidáza

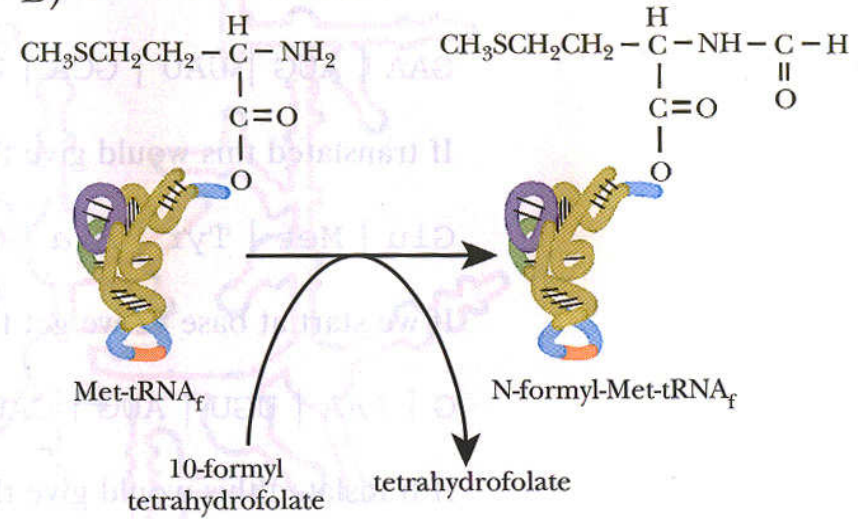
K formylaci metioninu dochází také u mitochondrií a chloroplastů

Formylace metioninu na iniciátorové tRNA

A) Struktura iniciátorové tRNA



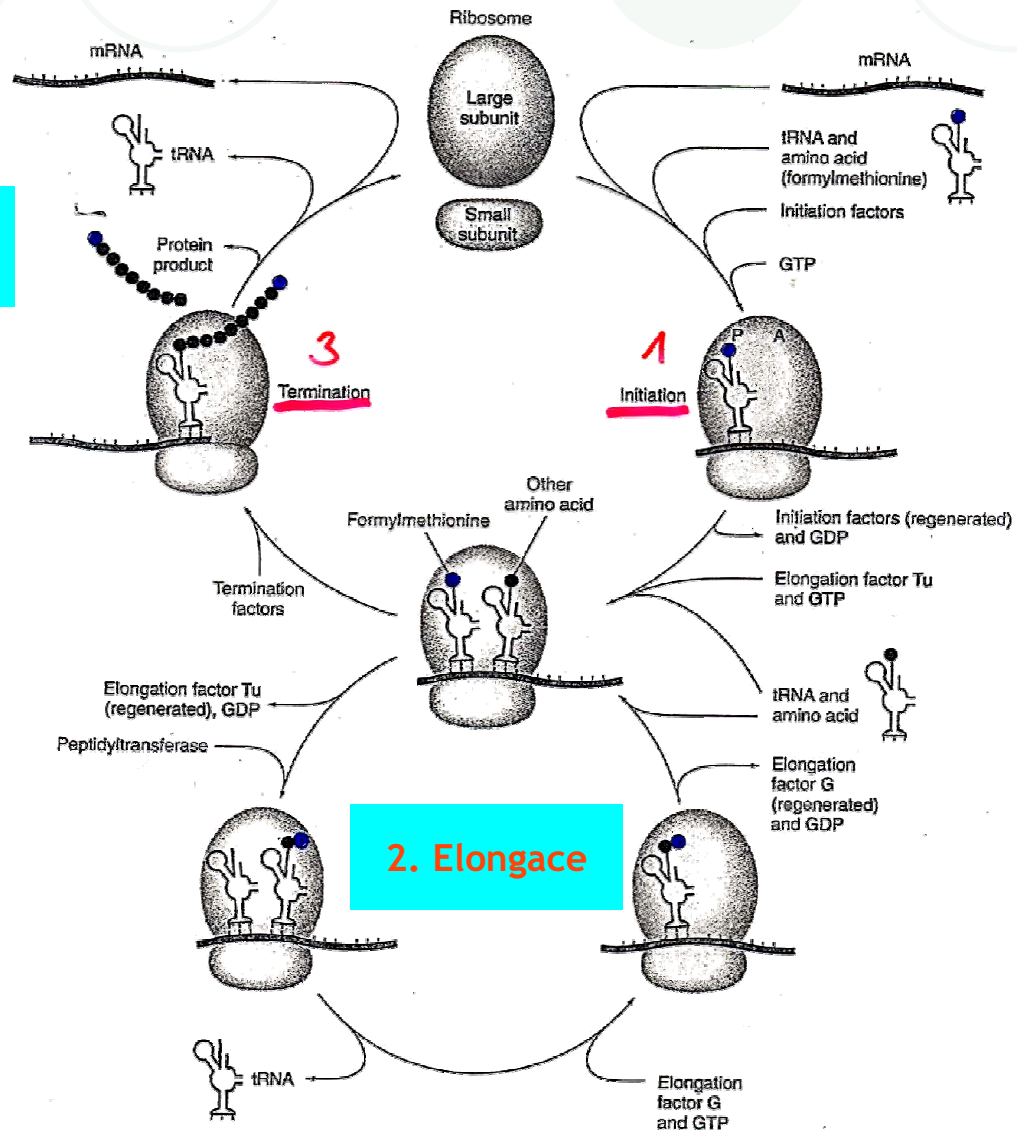
B)



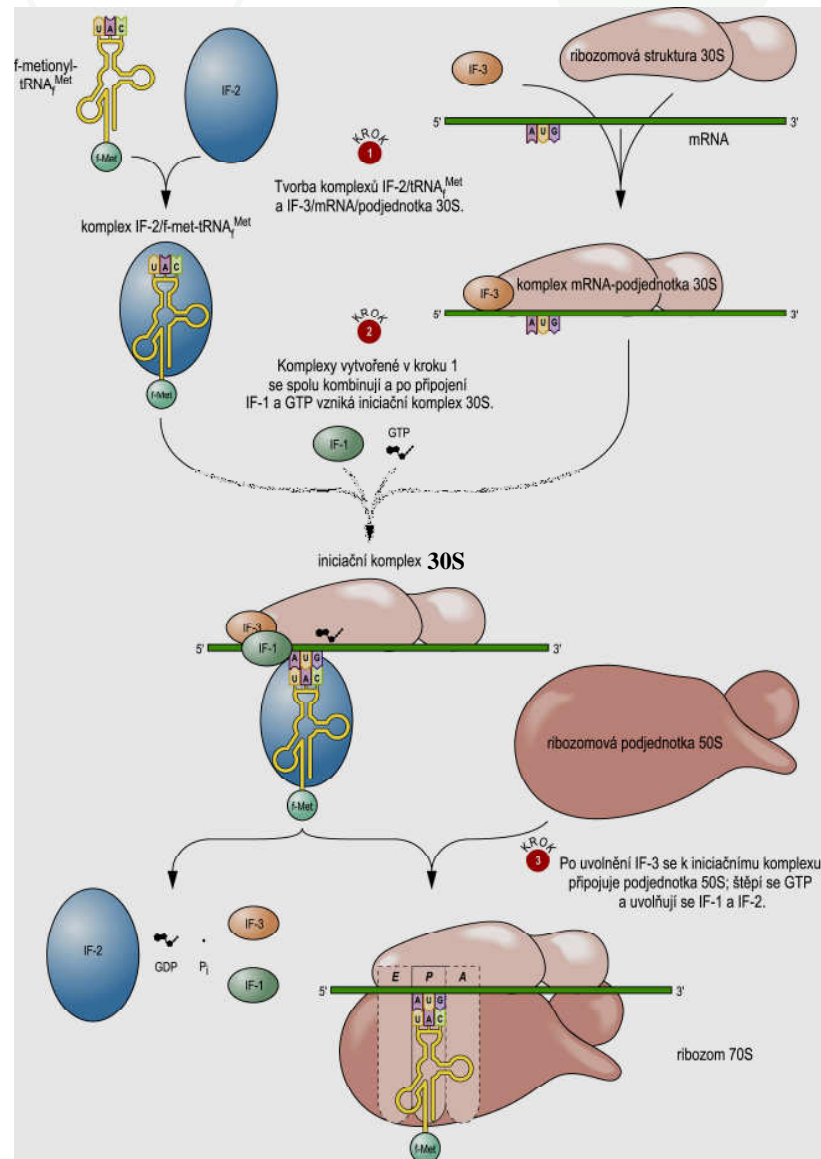
Tři fáze translace u prokaryot

3. Terminace

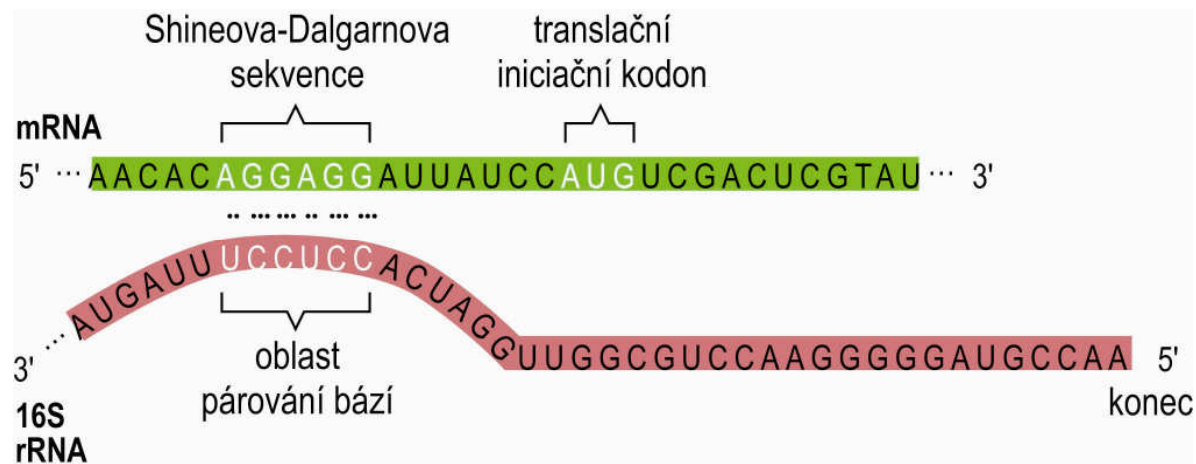
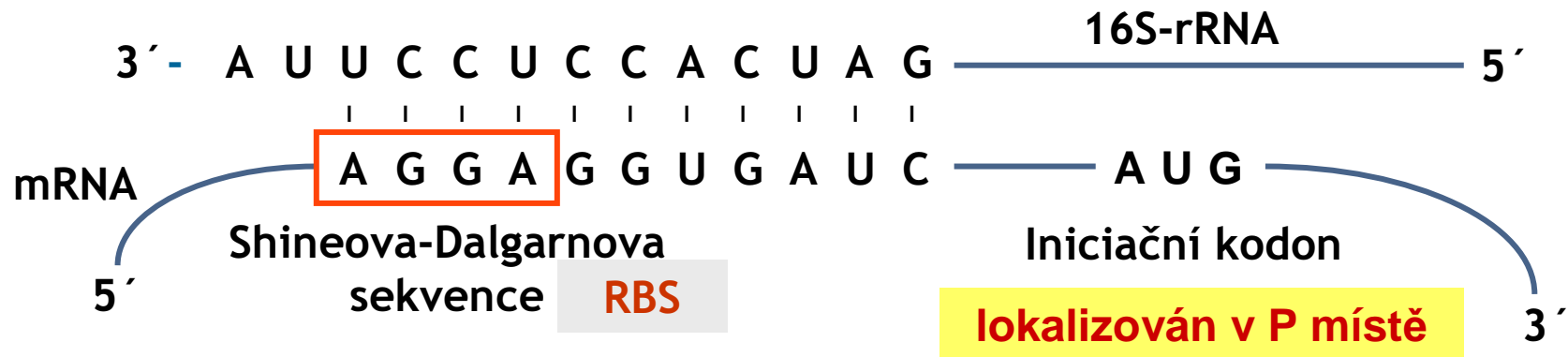
1. Inicicace



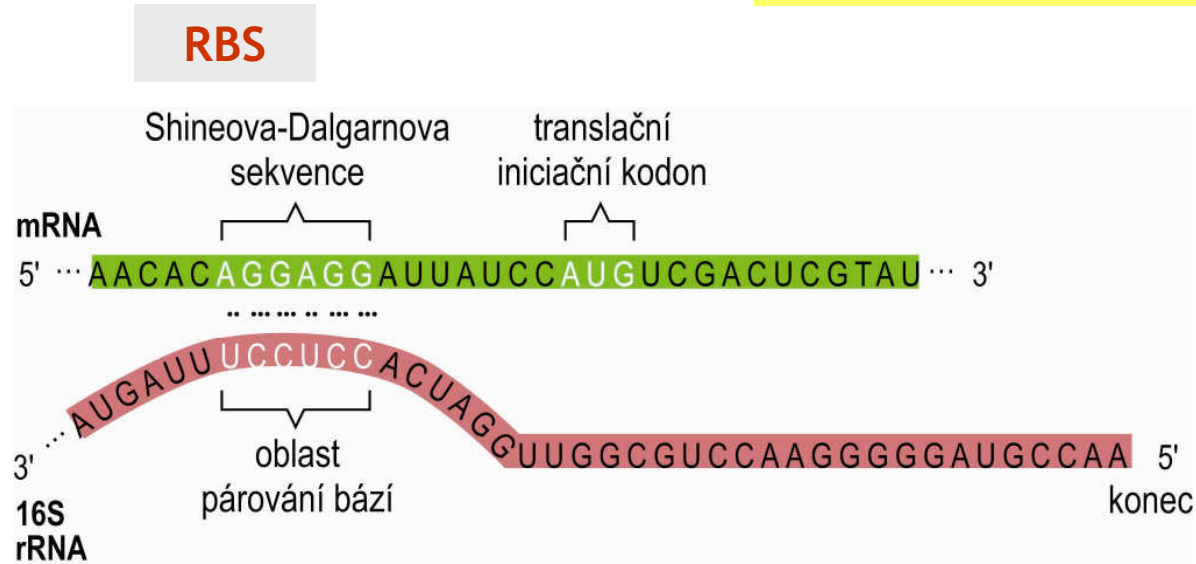
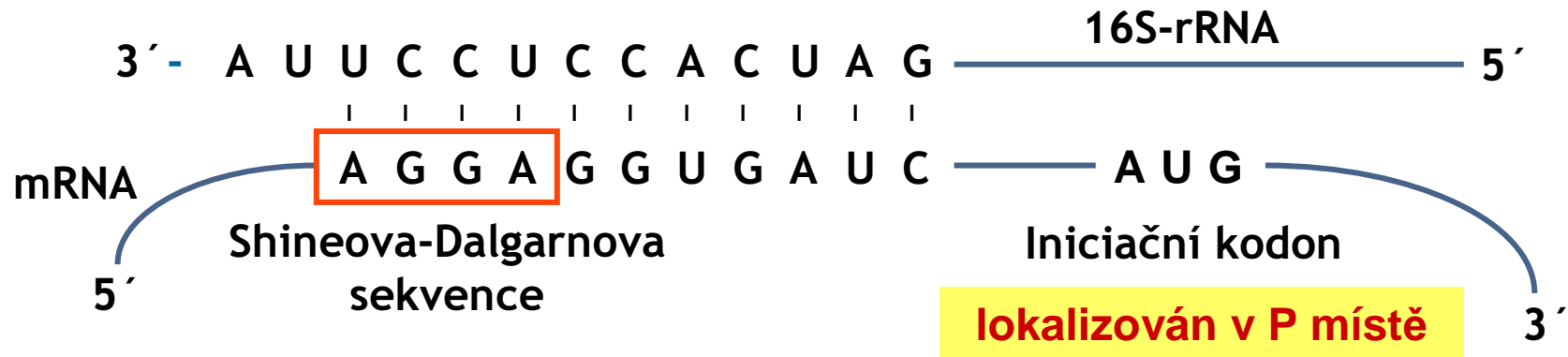
Iniciace translace u prokaryot (*E. coli*)



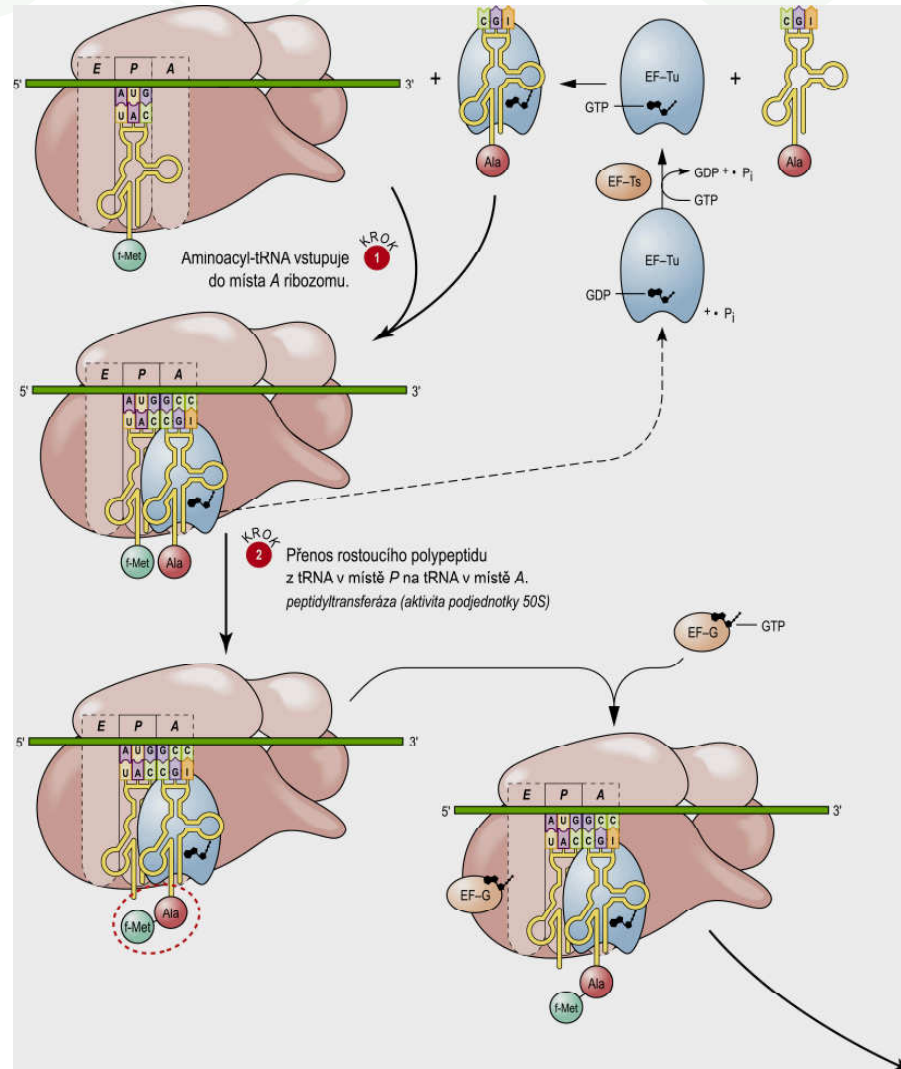
Vazba mRNA na 16S-rRNA (u bakterií)



Vazba mRNA na 16S-rRNA



Elongace polypeptidového řetězce (1)

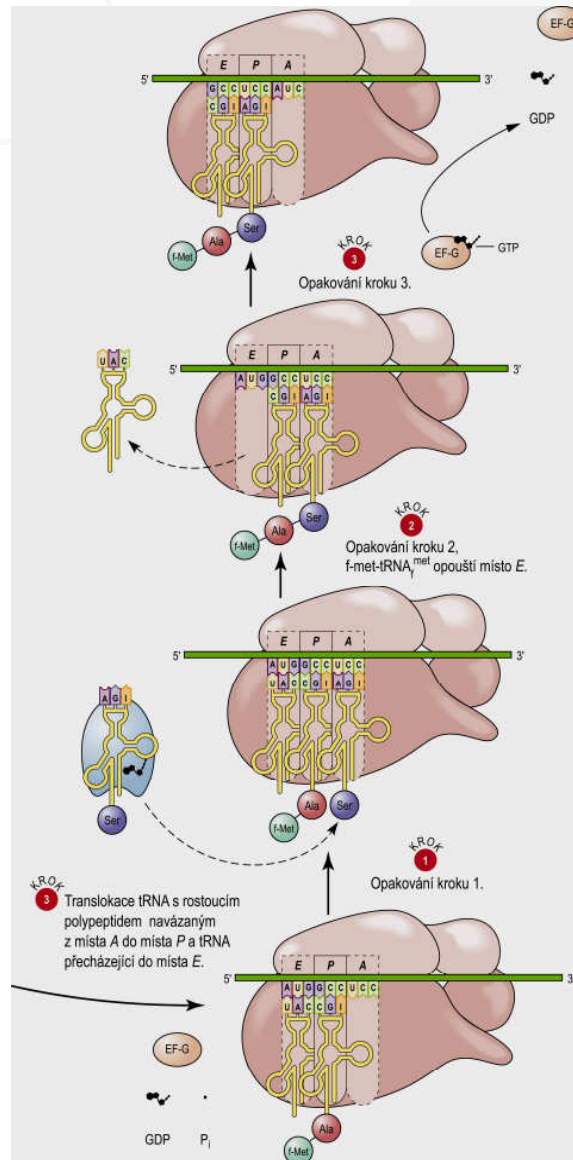


EF-Tu-GTP: vnáší aa-tRNA do místa A, při tvorbě peptidové vazby je GTP hydrolyzován na GDP

EF-G-GTP: zajišťuje translokaci ribozomu o jeden kodon

Elongace (2)

poř. předchozího
obrázku

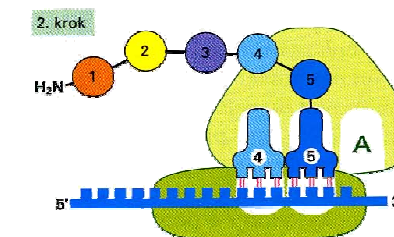
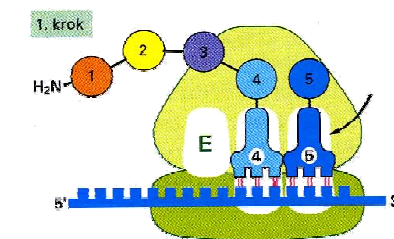
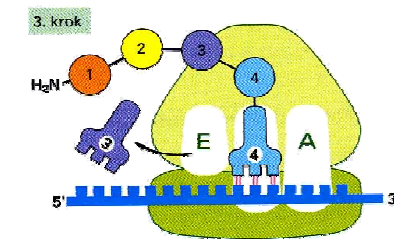
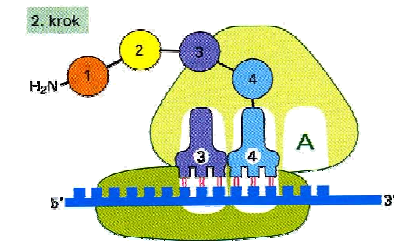
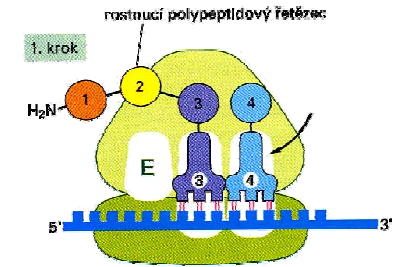


Opakování
kroků 1-3

Translokace
ribozomu o jeden
kodon

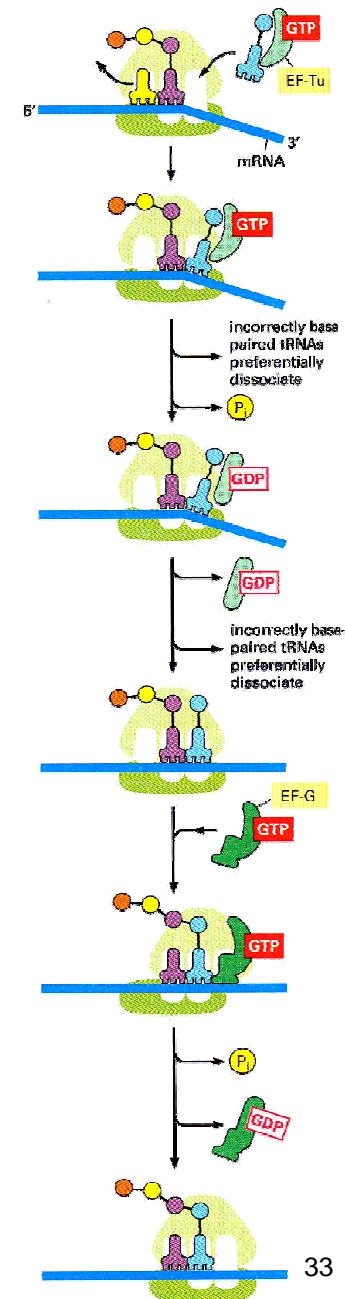
Elongační fáze translace

1. aa-tRNA (druhá a všechny další) vstupuje do místa A a váže se svým antikodonem na kodon mRNA v A místě
2. Vytváří se peptidová vazba mezi poslední aminokyselinou rostoucího polypeptidu a aminokyselinou vázanou na tRNA, která se posouvá do místa P. Začíná translokace ribozomu.
3. Ribozom se posouvá na mRNA o jeden kodon, prázdná tRNA se uvolní z místa E
4. Do místa A vstupuje další aa-tRNA



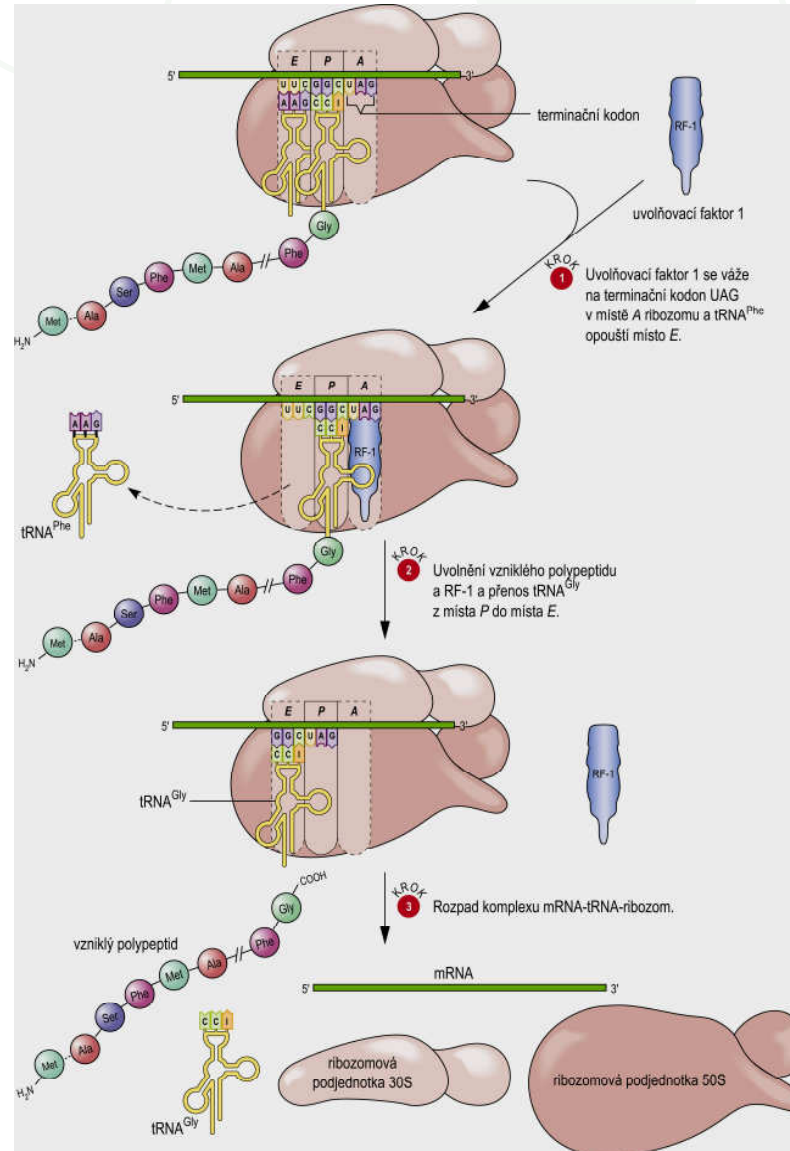
Účast translačních faktorů při zajištění přesnosti translace

1. aa-tRNA pevně vázaná na EF-Tu se přechodně váže s kodonem v A-místě 30S.
2. aa-tRNA se nachází v hybridním místě, párování kodon-antikodon vede k hydrolýze GTP navozené EF-Tu. Chybné zařazení tRNA zpomaluje hydrolýzu a aa-tRNA tak může opustit ribozom ještě před vytvořením peptidové vazby.
Časový prostoje mezi vazbou aa-tRNA na kodon a její dostupností pro elongaci zvyšuje přesnost translace
3. V případě zařazení správné aa-tRNA dochází k disociaci EF-Tu a aa-tRNA se tak dostává do místa A a může se účastnit elongace peptidového řetězce.
4. Na ribozom do (nebo poblíž) místa A na 50S se váže EF-G + (GTP) a urychluje pohyb tRNA do hybridních míst A/P a P/E.
5. Kontakt EF-G s ribozomem stimuluje GTP-ázovou aktivitu EF-G - dochází ke konformační změně EF-G, pomocí níž je tRNA přesunuta z hybridního místa A/P do místa P a proces translace tak posune o jeden kodon = **translokace ribozomu**.



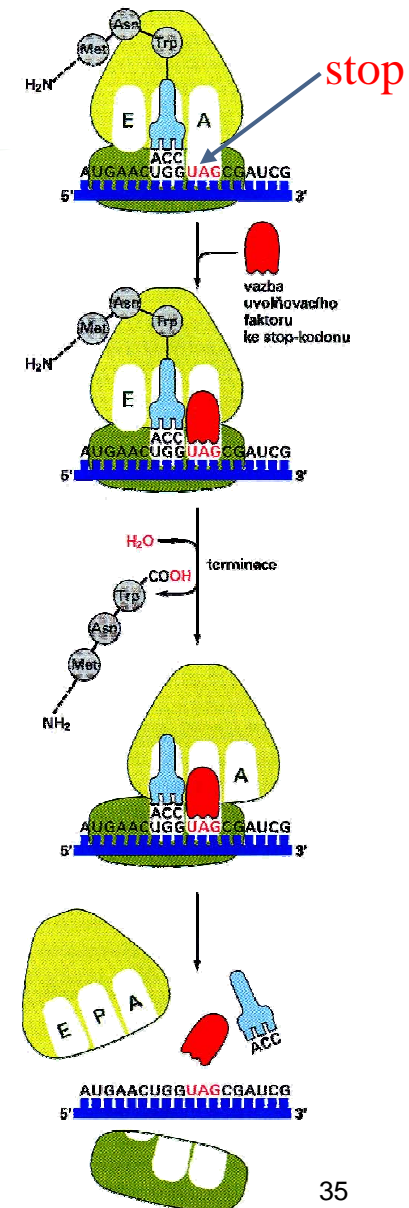
Rychlost syntézy: 2-20 aminokyselin/sec

Terminace syntézy polypeptidového řetězce



Terminace translace

1. Do místa A se dostává terminační kodon na mRNA
2. V místě A se na terminační kodon váže terminační (uvolňovací) faktor (RF1, RF2 n. RF3)
3. Změna aktivity peptidyltransferázy vede k uvolnění karboxylového konce peptidového řetězce z P místa, volná tRNA se přesouvá do E místa a opouští ribozom
4. Ribozom disociuje na podjednotky, které se mohou účastnit dalšího cyklu translace



Struktura lidského terminačního faktoru eRF1 a jeho podobnost s molekulou tRNA

eRF1

tRNA



terminační faktory = molekulární mimikry

Zakončení translace molekulou tmRNA

tmRNA (transfer/messenger RNA)

mRNA s neúplnou délkou
– chybí STOP kodon

„krátká zpráva“

Short message
(~10aa)

Stop
codon

mRNA

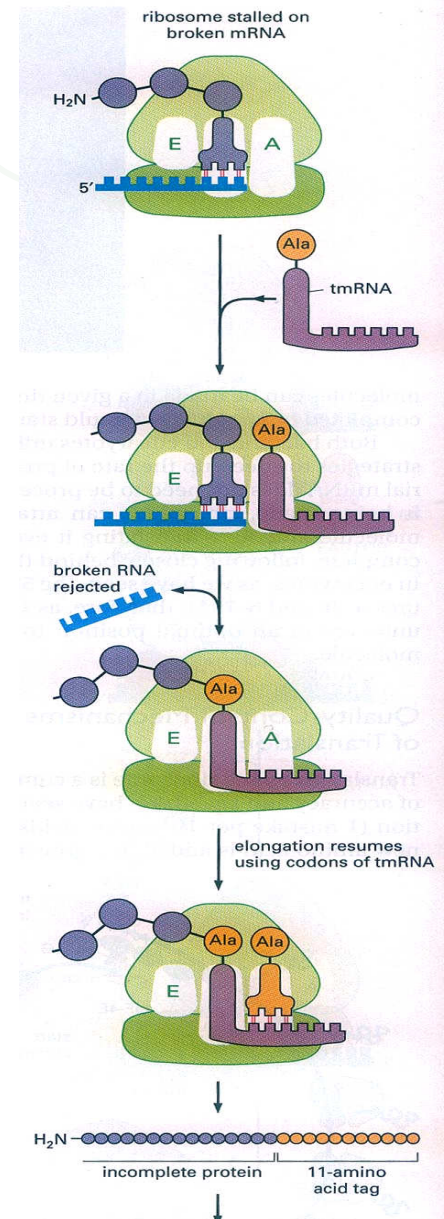
tmRNA

Alanine

Polypeptide chain

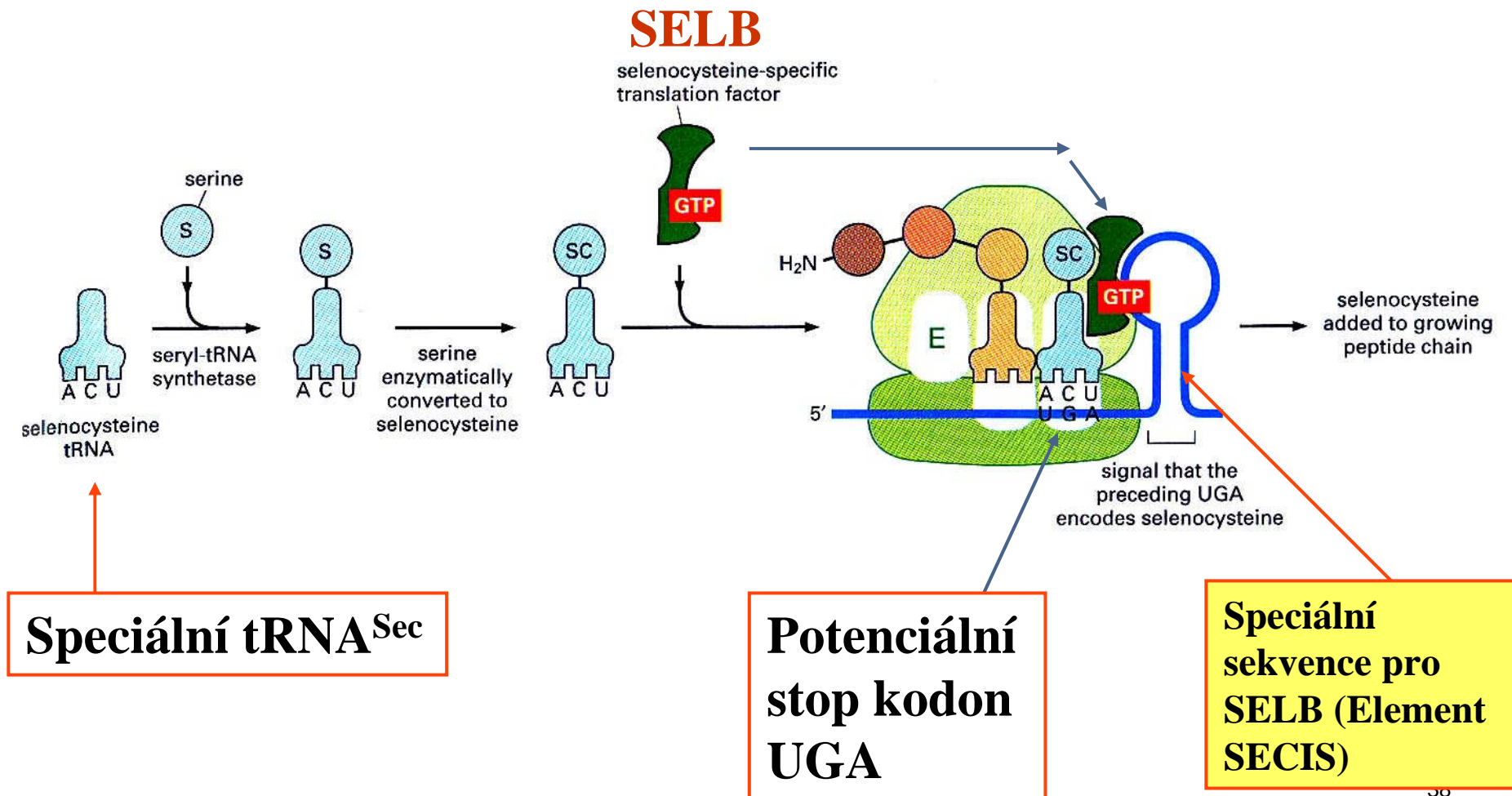
Pozastavený
ribosom na
mRNA

tmRNA nesoucí alanin
(~ alanyl-tRNA)
navázaná v A místě



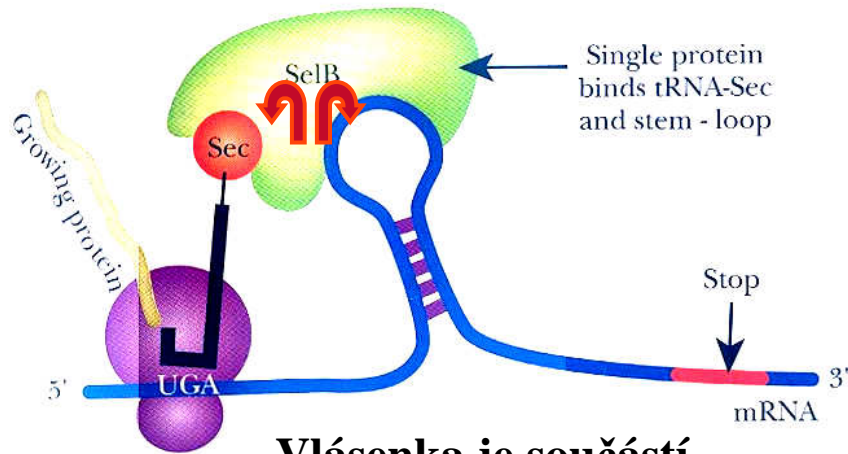
Degradace peptidu specifickou
tag-proteázou

Inkorporace selenocysteinu do polypeptidového řetězce – čtení bifunkčního kodonu UGA



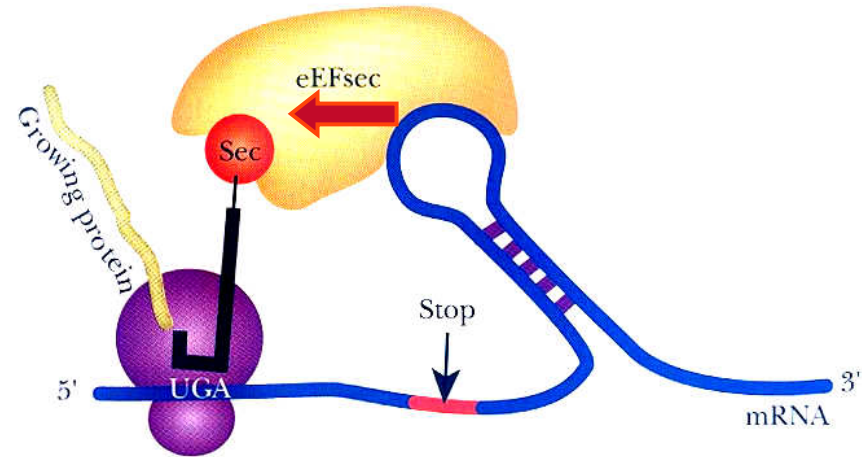
Vnášení tRNA-sec na vnitřní stop kodon UGA

a) U bakterií

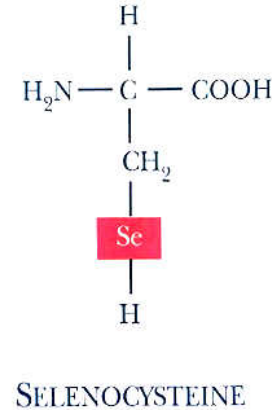
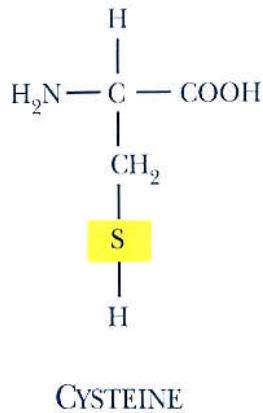
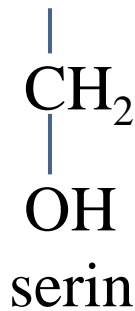


Vlásenka je součástí kódující sekvence mRNA

b) U savců

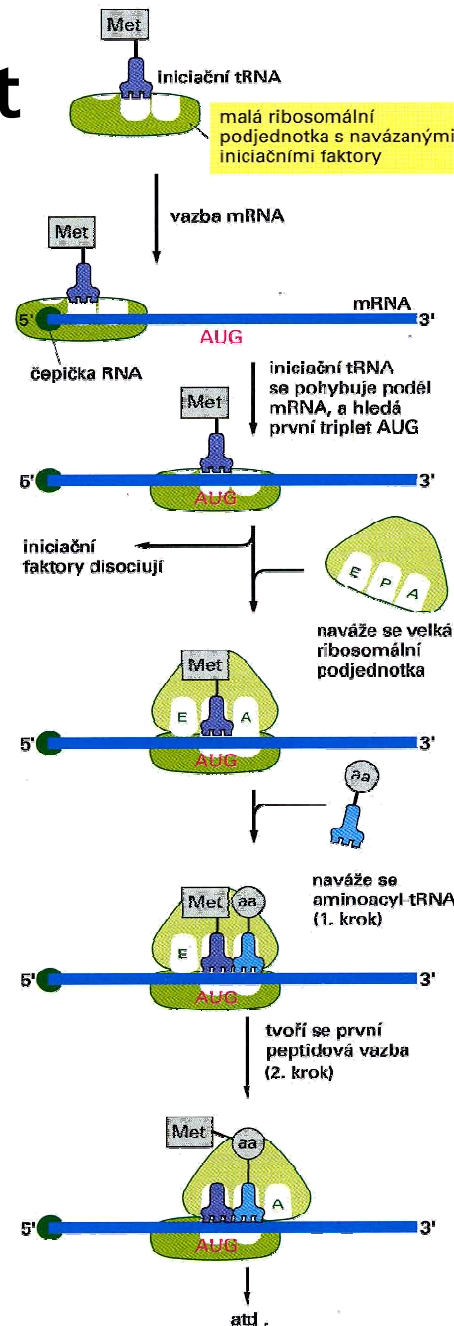


Vlásenka je součástí 3' netranslatované mRNA



Translace u eukaryot

1. na čepičku na mRNA se postupně navážou eIF-4F, eIF-4A, a eIF-4B (dohromady tvořící CBP-protein)
2. Je vyhledán iniciační kodon a Met-tRNA^{met} je umístěna proti němu (v P místě)
3. Uvolní se iniciační faktory a připojí se podjednotka 60S
4. Začíná fáze elongace EF-1 a EF-2 (analogy EF-Tu, Ts)



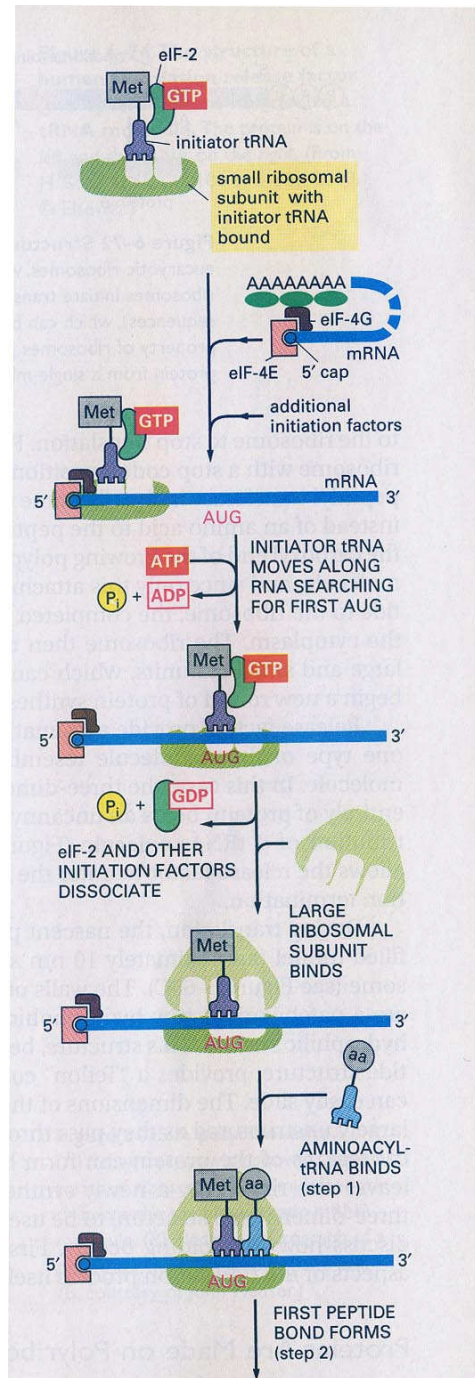
eIF4A a B se podílejí na rozmotání sekundární struktury mRNA

eIF6 udržuje ribozom v disociovaném stavu

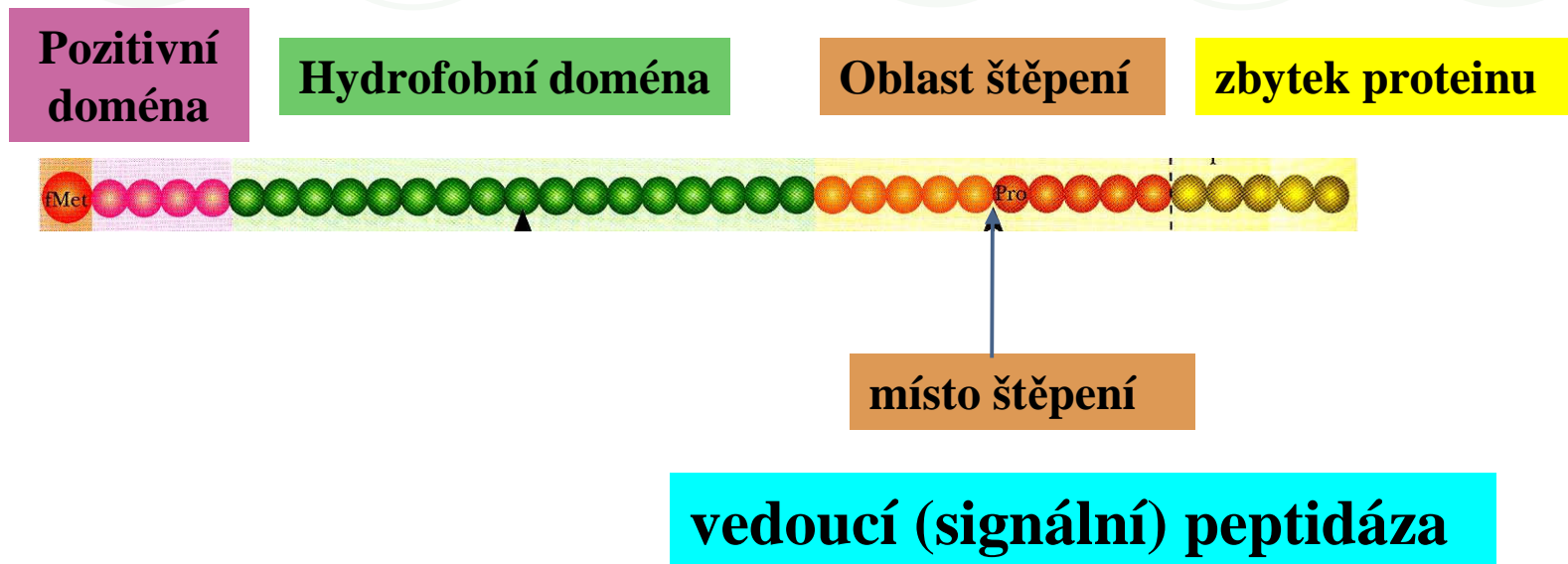
1. u bakterií se iniciační komplex tvoří přímo na sekvencích ohraničujících AUG
2. u eukaryot nejdříve 40S rozpozná 5' konec mRNA a pak se pohybuje k iniciačnímu místu, kde se spojuje s 60S

Iniciace translace u eukaryot

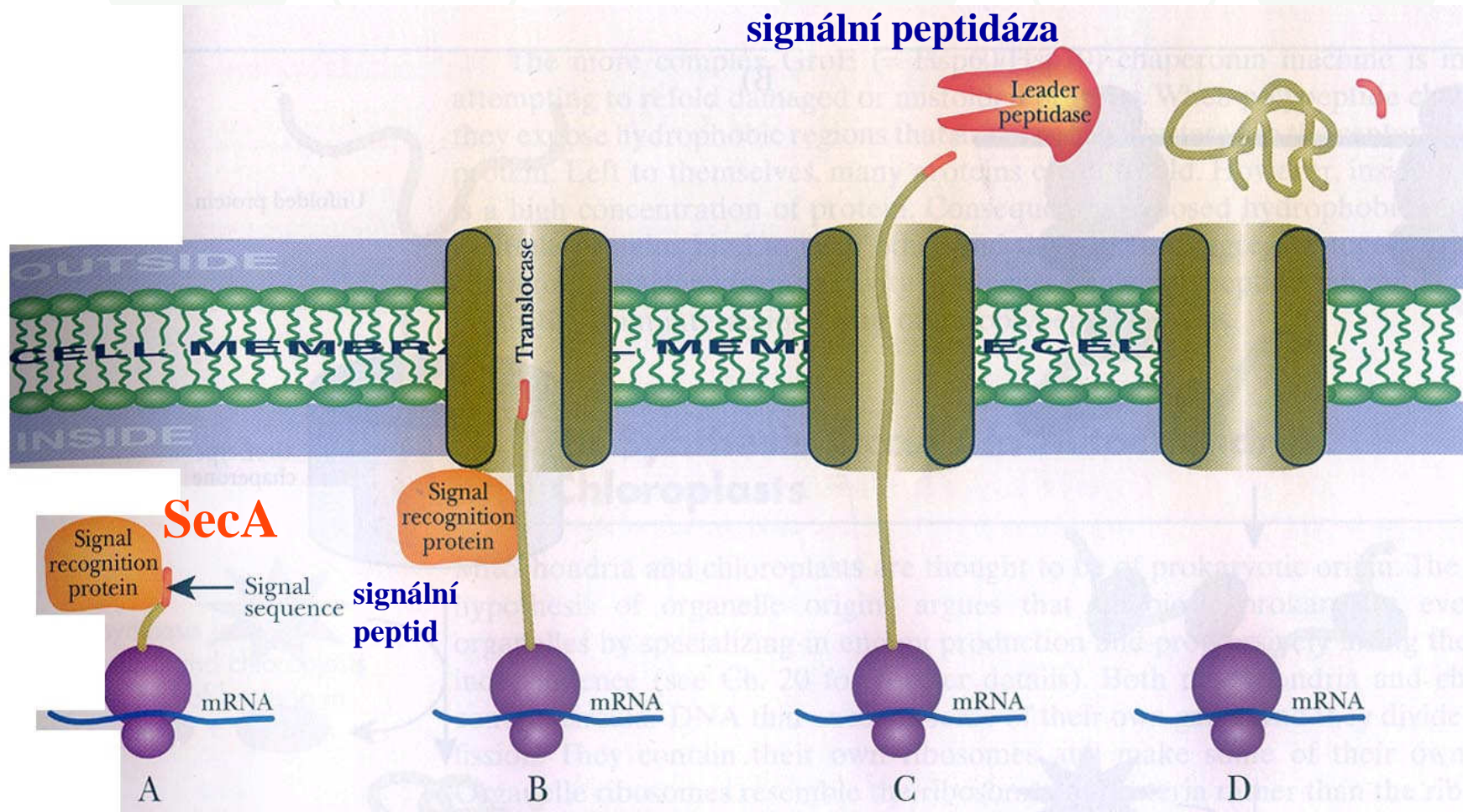
eIF-4G je vázán na polyA-konec RNA
a na eIF-4E vázaný na čepičku =
překládány budou jen mRNA s
úplnou délkou



Standardní **signální sekvence** exportovaných proteinů

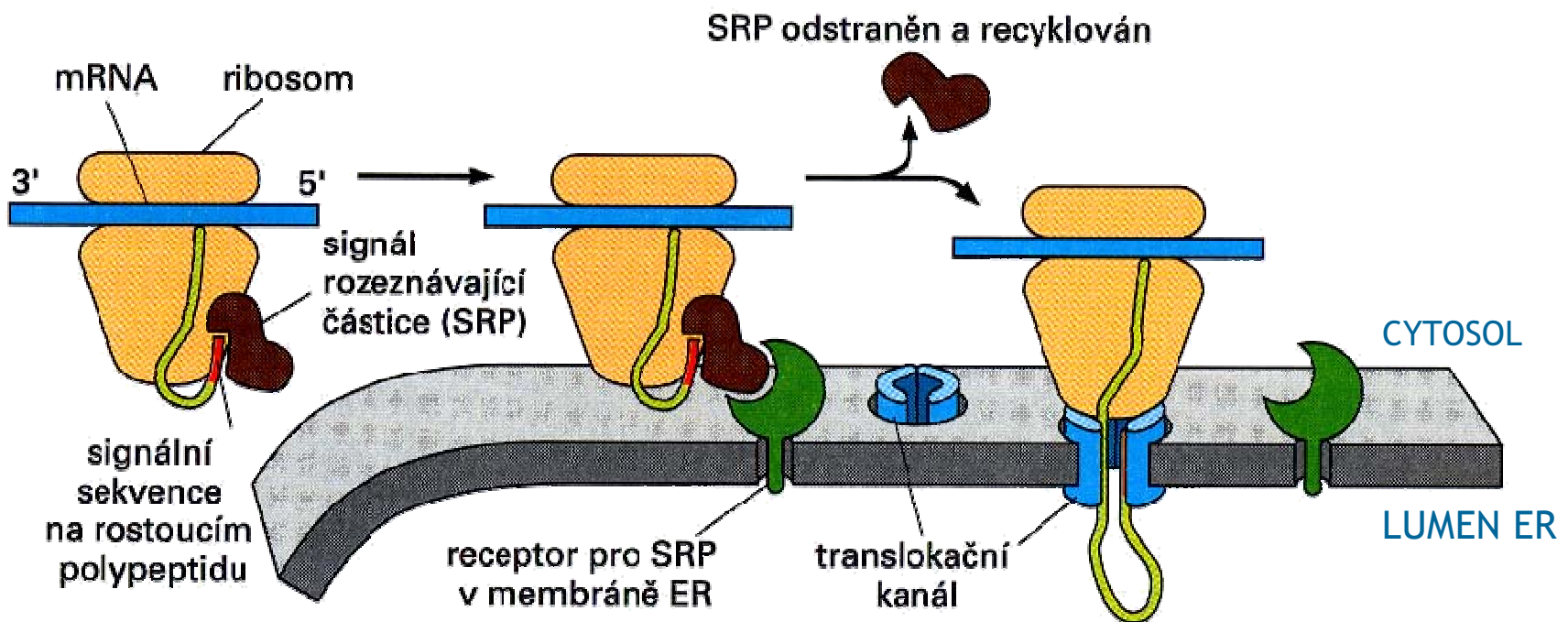


Kotranslační export proteinů u bakterií

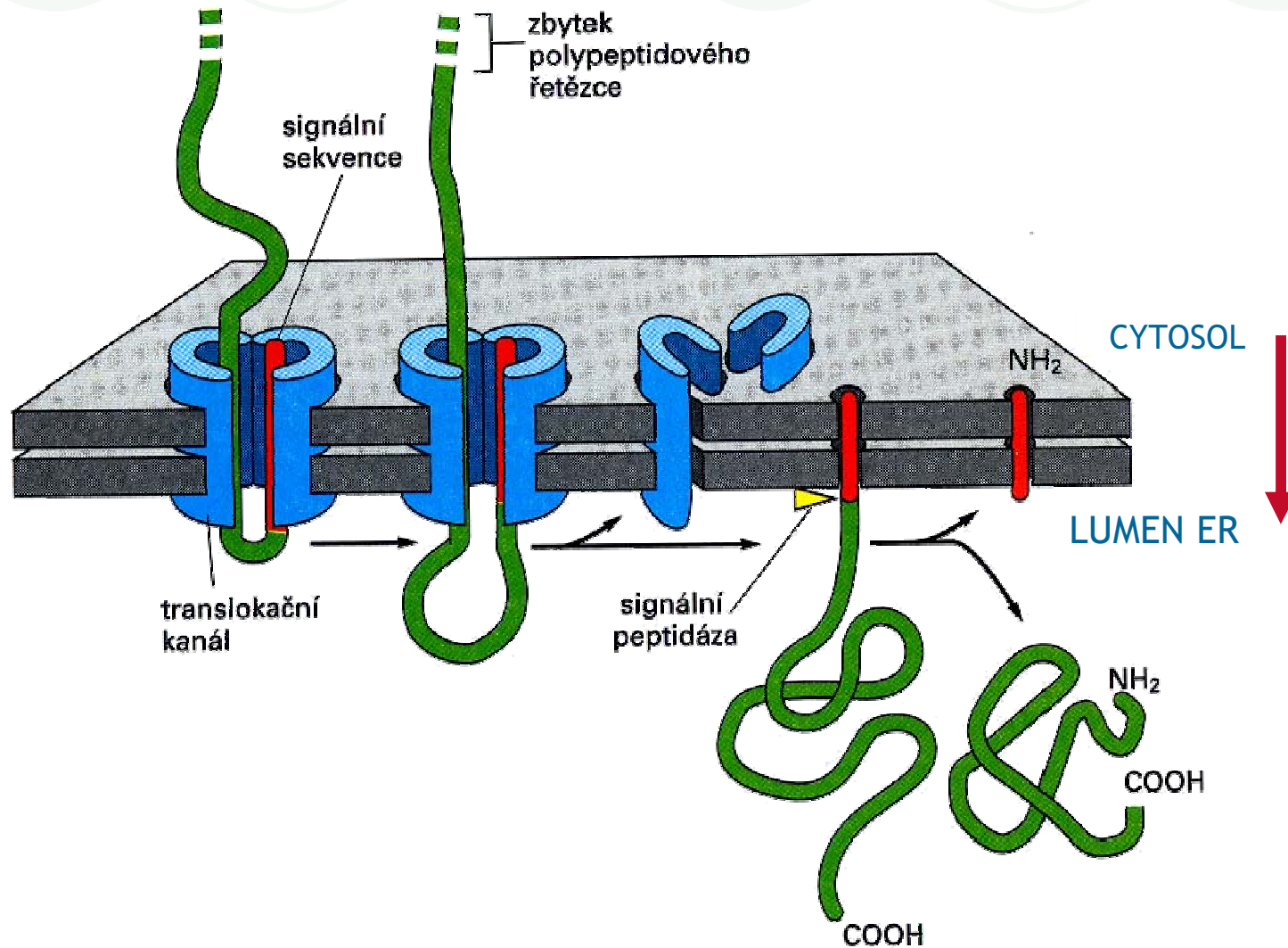


Syntéza extracelulárních a membránových proteinů

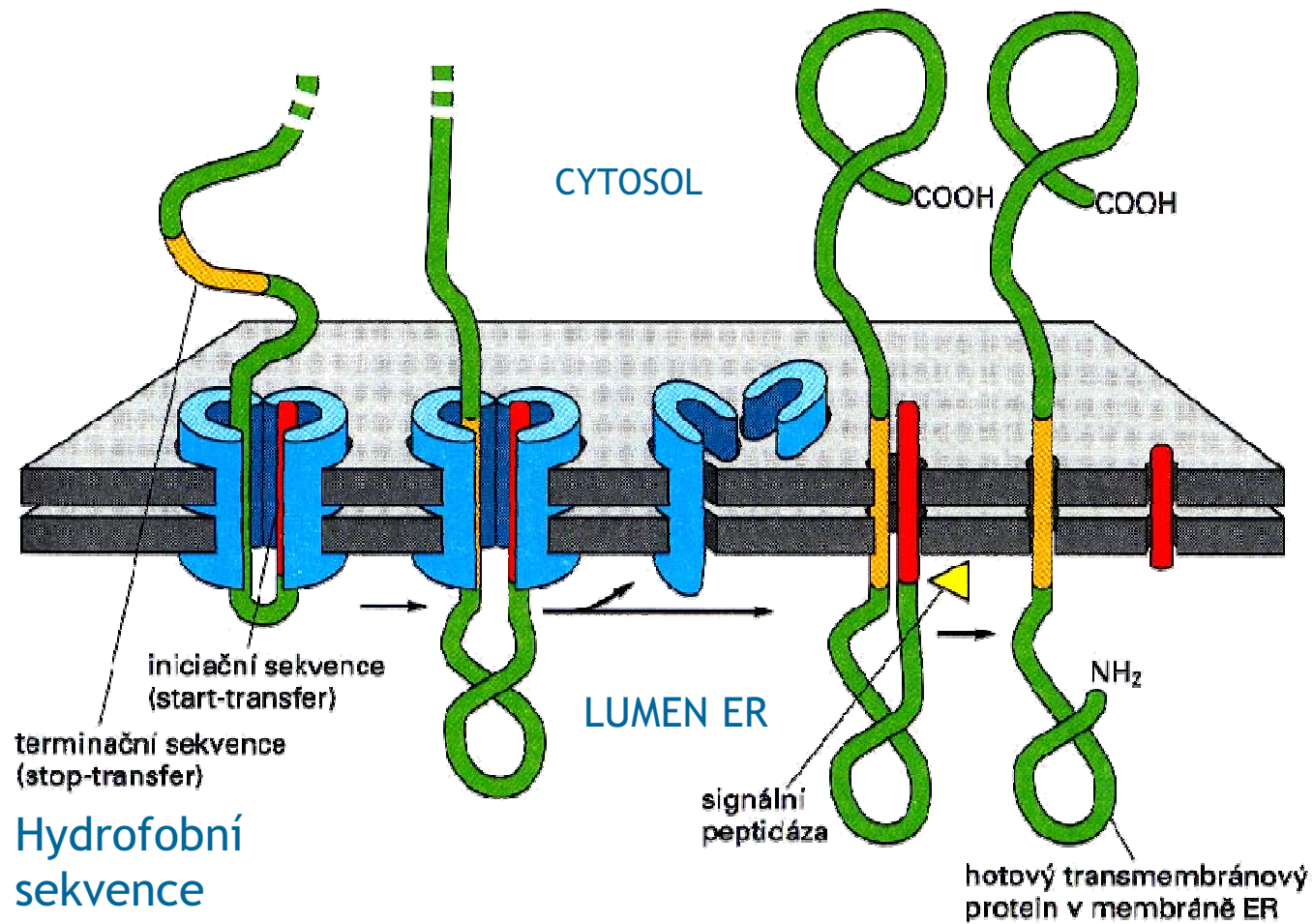
preprotein = polypeptid se signálním peptidem na N-konci



Translokace proteinu membránou do vnitřního prostoru endoplazmatického retikula



Začlenění transmembránového proteinu do membrány ER



Posttranslační procesy

1. Kotranslační úpravy

- * deformylace
- * odštěpení aminokyselin z N-konce aminopeptidázou
- * chemické modifikace aminokyselin (hydroxylace, fosforylace, acetylace, aj).
- * tvorba disulfidových můstků - vznik terciární struktury
- * připojení cukerných zbytků (oligosacharidů) - glykozylace, vznik glykoproteinů
- * vznik sekundární a terciární struktury

2. Posttranslační úpravy

- * vyštěpení peptidů (proinzulin > inzulin)
- * tvorba kvarterní struktury (spojování protomerů do aktivních oligomerů)
- * přidání prostetických skupin, koenzymů apod. (hemoglobin)
- * posttranslační štěpení polyproteinů (polypeptidový prekursor > peptid , např. ACTH)
- * proteinový sestřih (vyštěpení IVPS - intervening protein sequence), vytvoření nové peptidové vazby

3. Sestavování oligomerních proteinů a nadmolekulárních struktur

(nekovalentní interakce mezi rozpoznávacími místy polypeptidových řetězců)

- * tvorba organel (membrány aj)
- účast chaperonů a chaperoninů při sestavování struktur

4. Samosestavování (spontánní seskupení proteinových podjednotek)

- * ribozomy
- * morfogeneze virů (sestavení virových kapsidů)

Modifikace aminokyselin

Dekódováním mRNA při translaci je možno do bílkoviny vybrat jen asi 20 aa - z bílkovin lze však vyizolovat až 100 různých modifikovaných forem aminokyselin:

- a) hydroxylovaný prolin a lyzin
- b) fosforylovaný serin, treonin, tyrozin
- c) karboxylovaná kys. glutamová
- d) acetylovaný lyzin
- e) metylovaný lyzin a prolin
- f) adenylovaný tyrozin
- g) glykozylované zbytky
- h) modifikace lipidickými zbytky

* zbytky nenasycených mastných karbonových kyselin (acylace: 12C - laurylace, 14C - myristylace, 16C - palmitylace)

* zbytky polyizoprenového charakteru (iso/prenylace: 15C - farnesylace, 20C - geranylgeranylace)

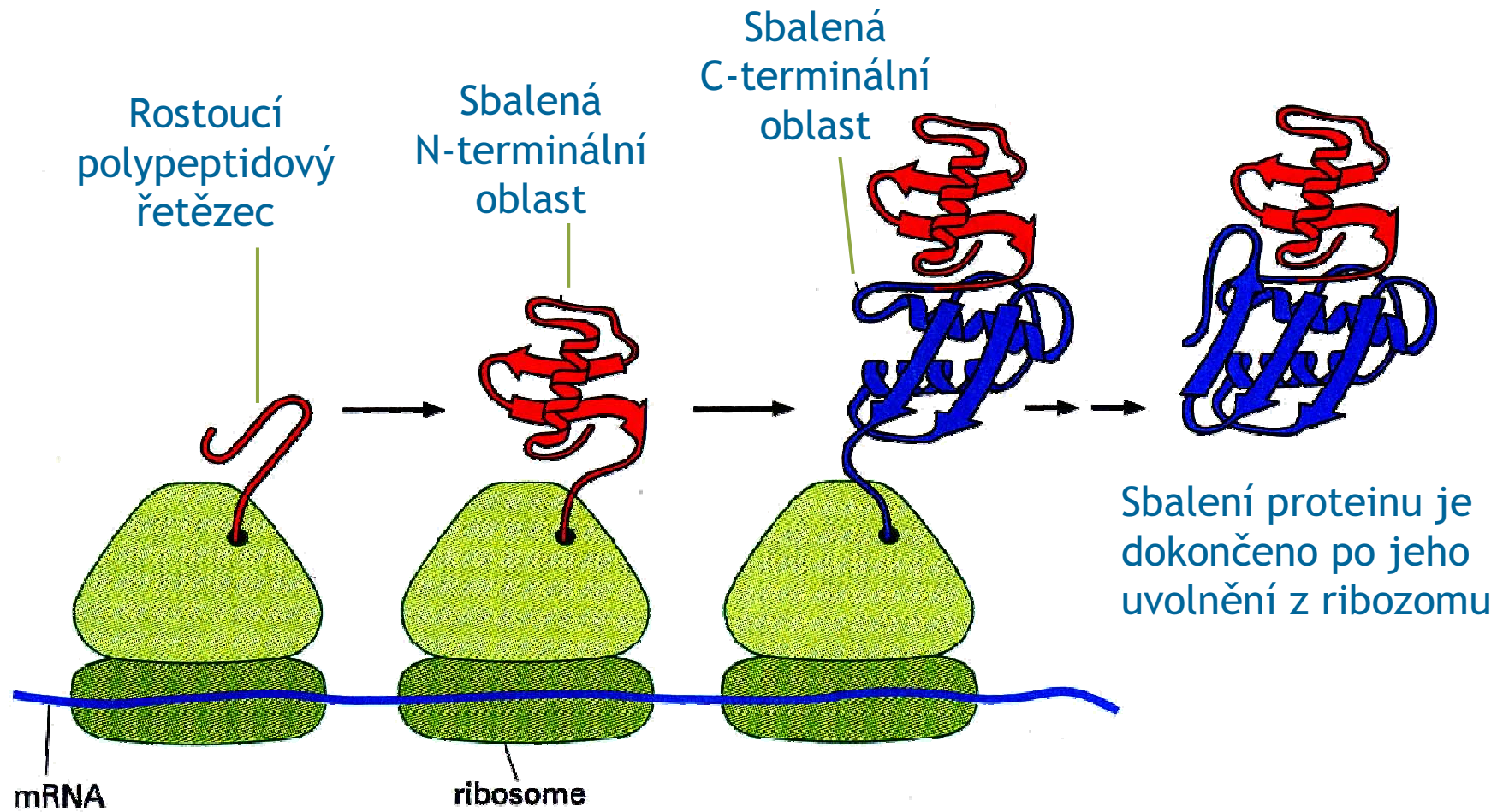
Mnohé modifikační enzymy se nacházejí v ER a Golgiho aparátu, někdy však dochází ke změnám až mimo buňku.

**Mikrozomální
frakce**

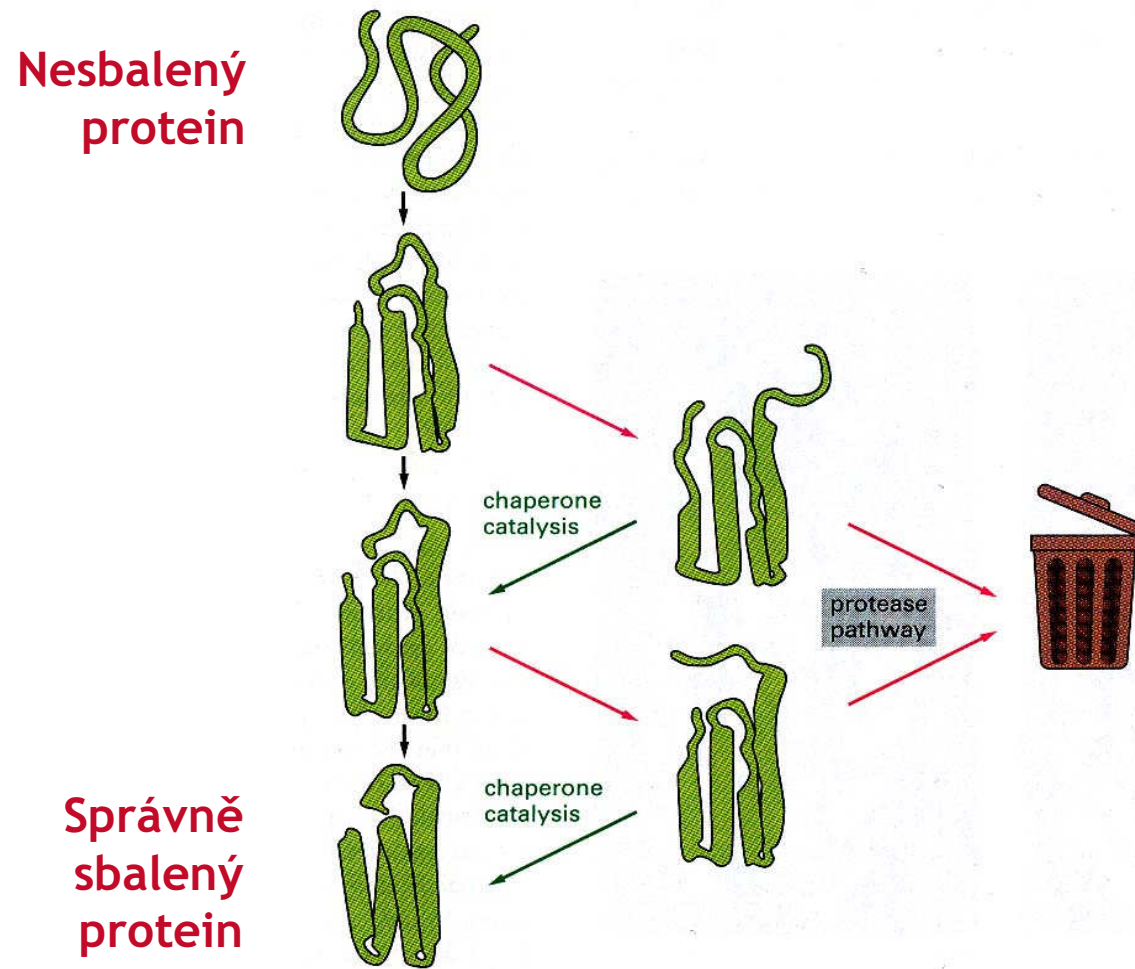
Průběh vzniku funkčního proteinu



Kotranslační sbalování proteinu

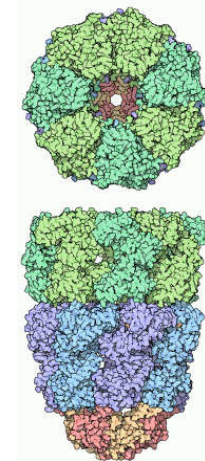


Sbalování proteinů za účasti chaperonů

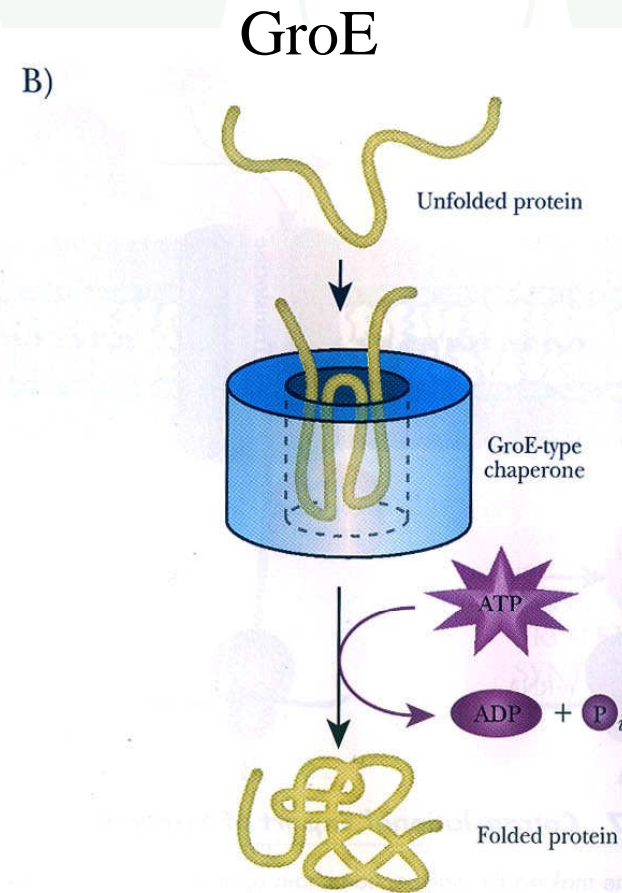
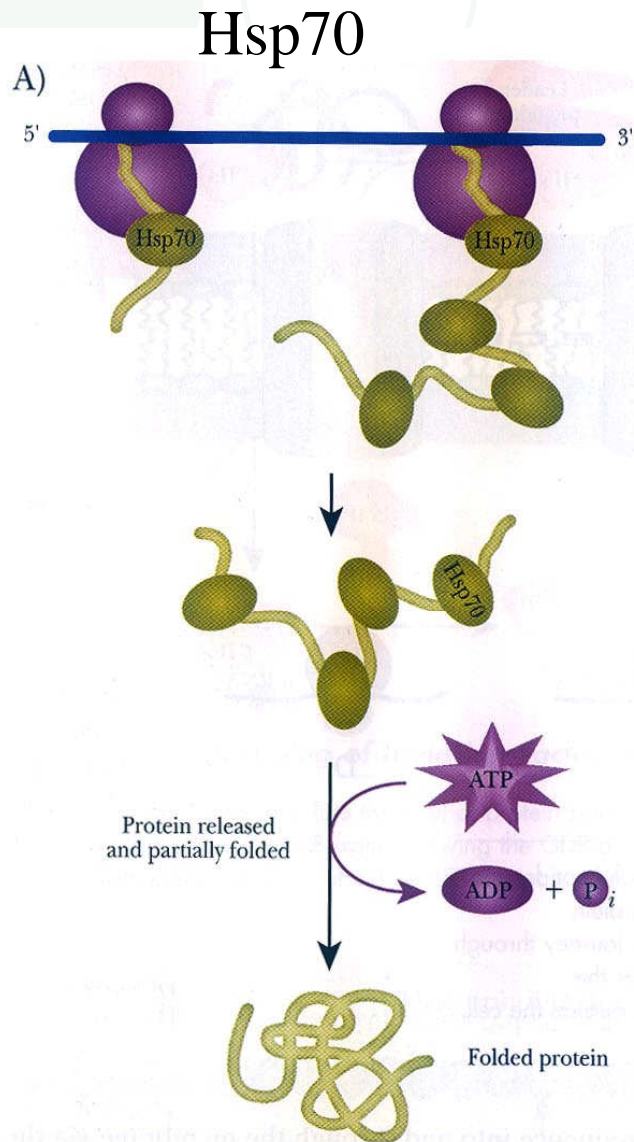


Molekulární chaperony/chaperoniny

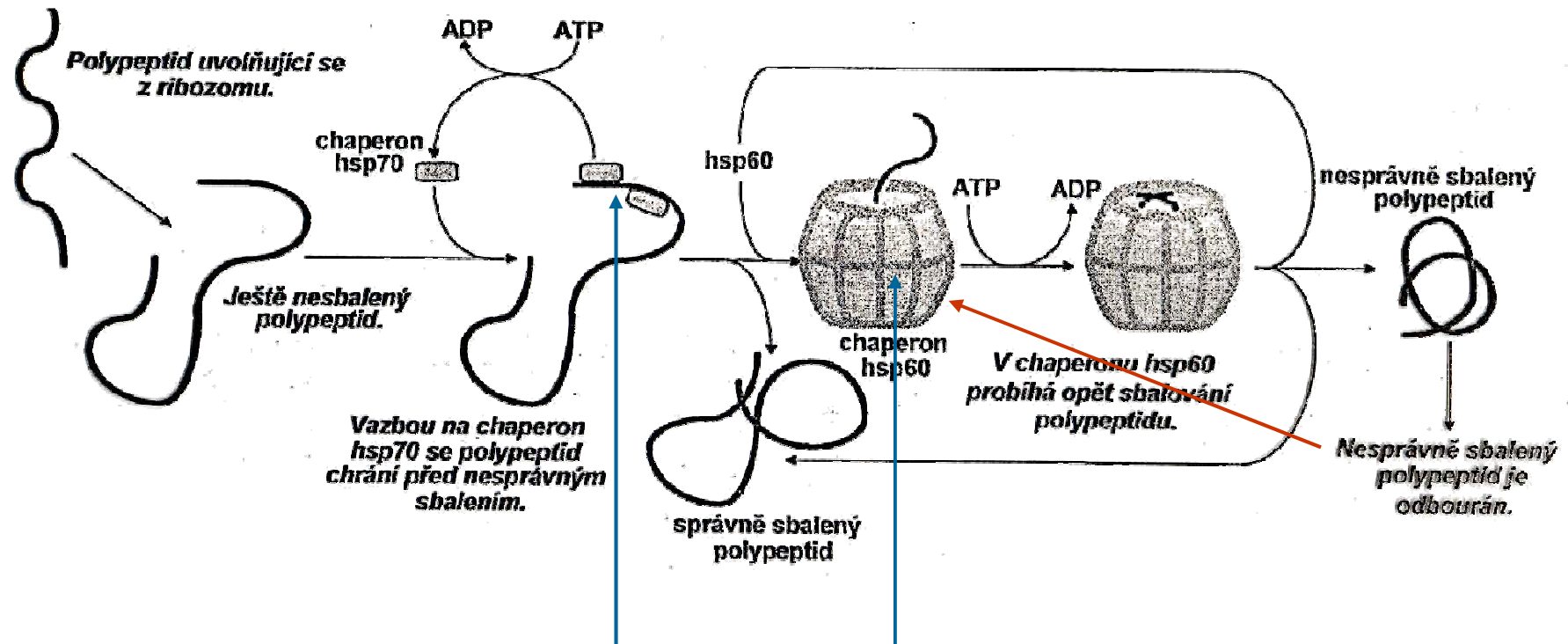
- speciální skupina proteinů podílejících se na sbalování polypeptidů (**zabraňují chybnému sbalování**)
- **hlavní rodiny chaperonů:** proteiny hsp60 a hsp70
 - **hsp70:** rozpoznávají krátké úseky polypeptidu tvořené hydrofobními aminokyselinami **během jeho syntézy na ribozomu**
 - **Hsp60 (GroE; Hsp60/Hsp10):** vytvářejí soudkovité struktury, v nichž se **upravují kompletně nasyntetizované proteiny**



Dva obecné mechanismy působení chaperoninů



Účast chaperonů na procesu sbalování proteinů



Hsp70 se váže na hydrofobní oblasti proteinu a zabraňuje jeho agregaci.

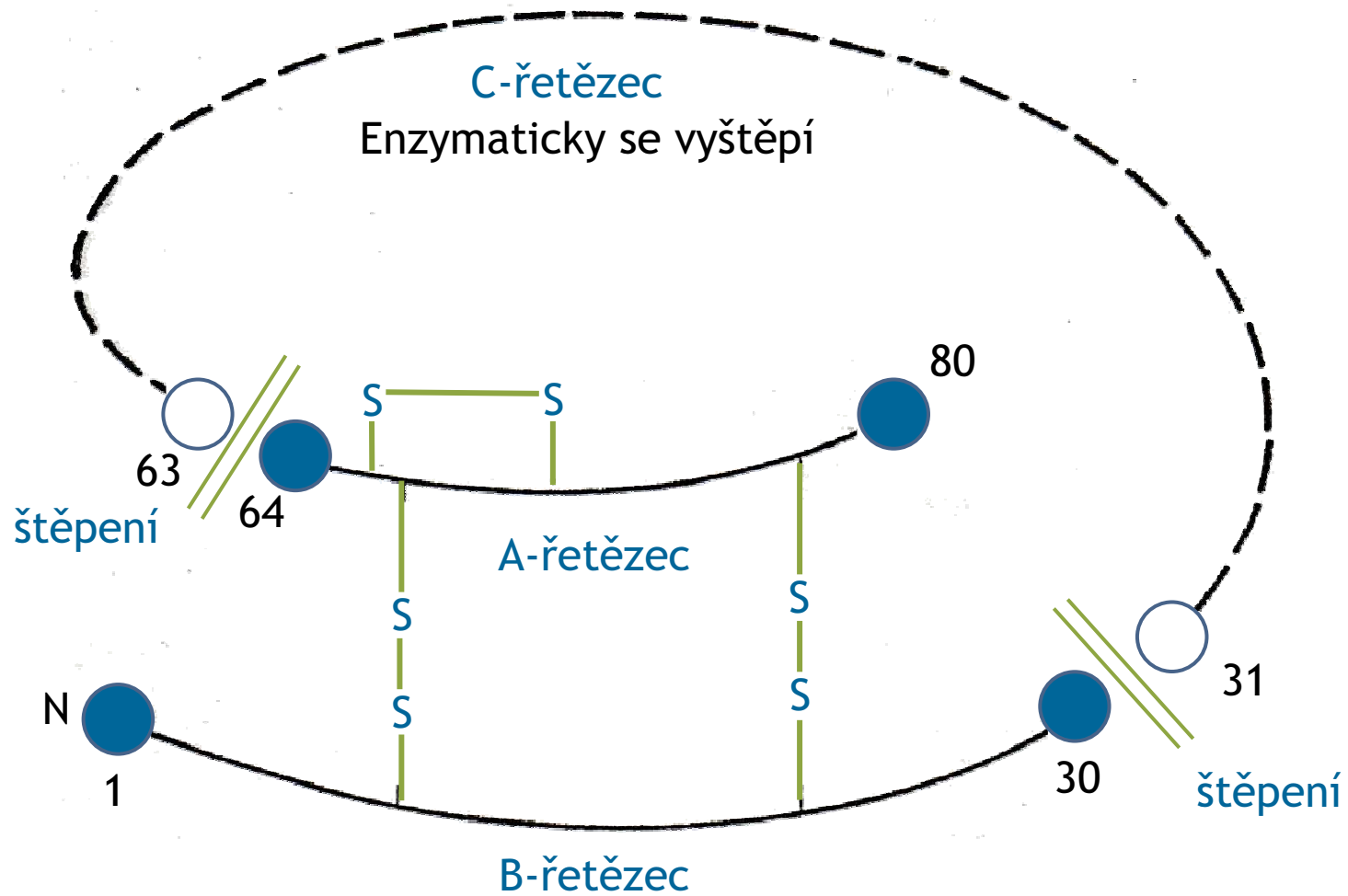
Další úlohy:

- transport
- disagregace denaturovaných proteinů (např. Hsp60)

(GroEL, GroES)

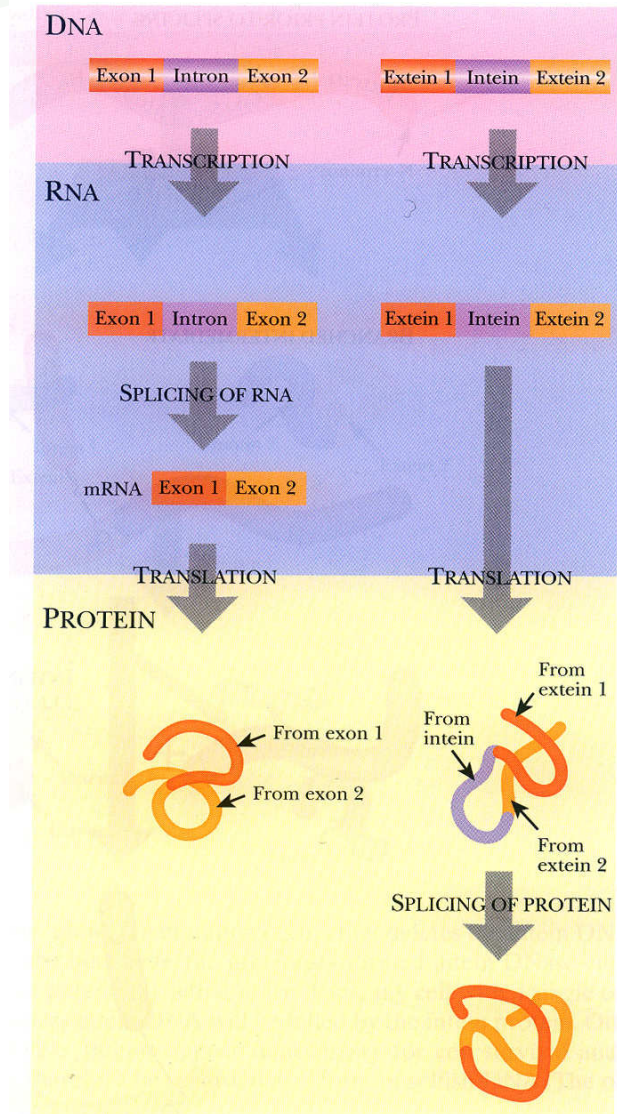
hsp = heat shock protein

Posttranslační úprava proinzulínu



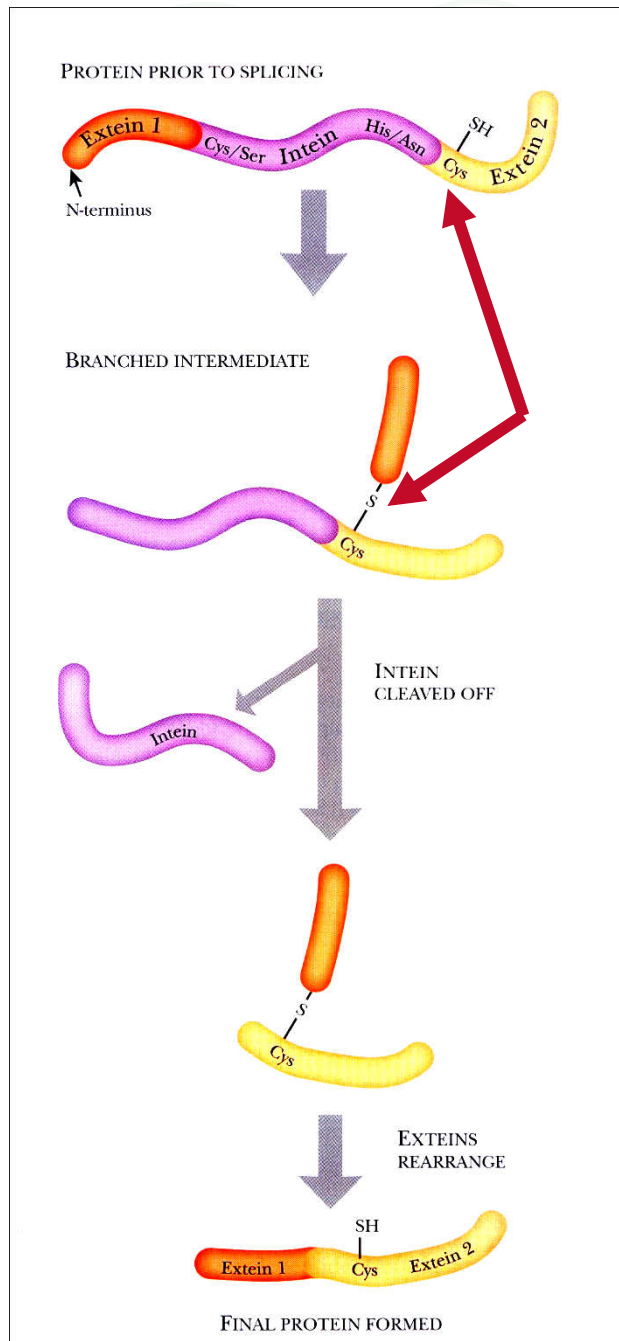
Proteinový sestřih

srovnání způsobů odstraňování intronů a inteinů



Inteiny byly zjištěny u kvasinek, řas, bakterií a archeí – obvykle je přítomen jen jeden inteín, výjimečně dva

Intein katalyzuje své vlastní vyštěpení

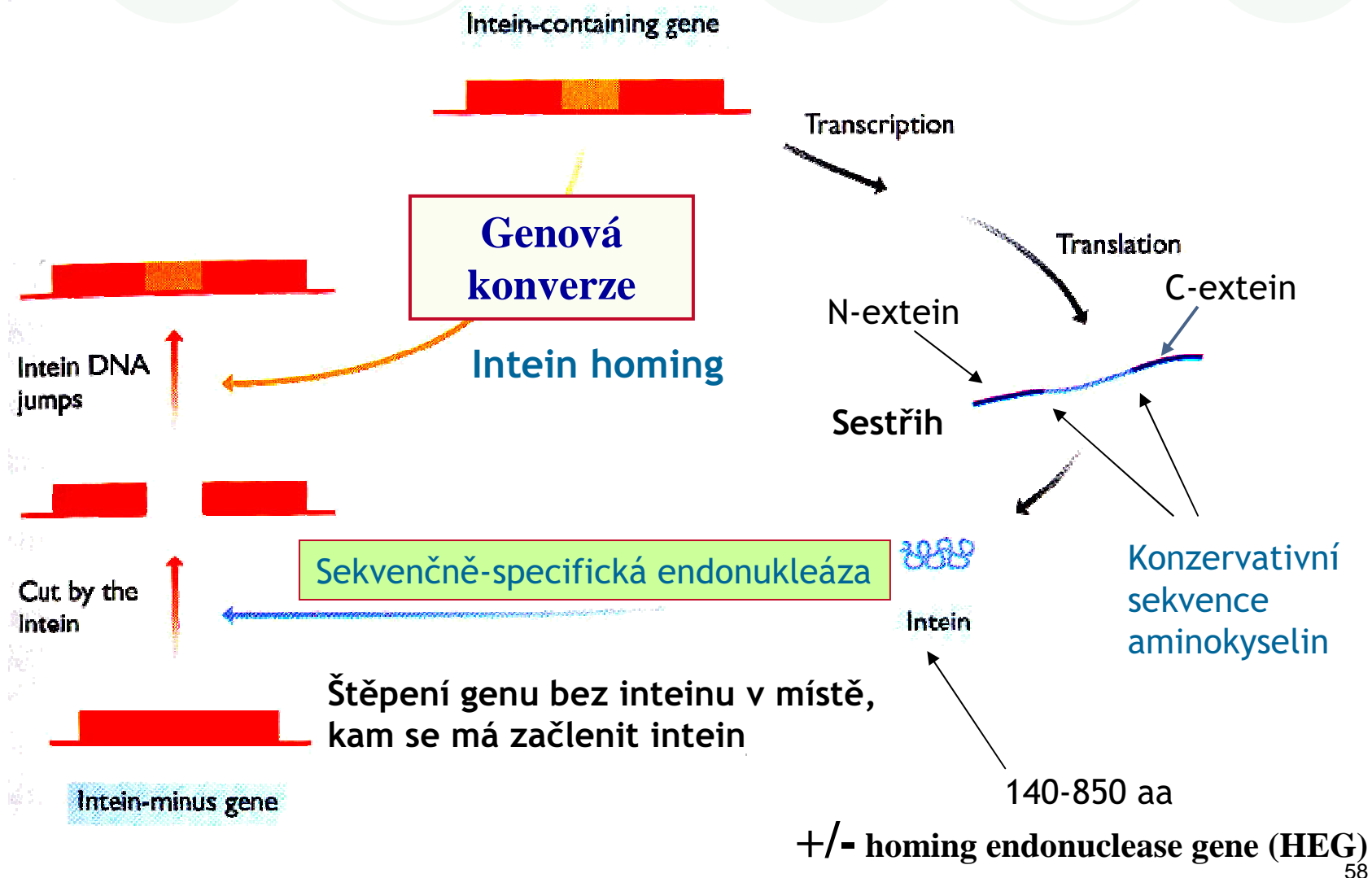


Průběh sestřihu inteinu

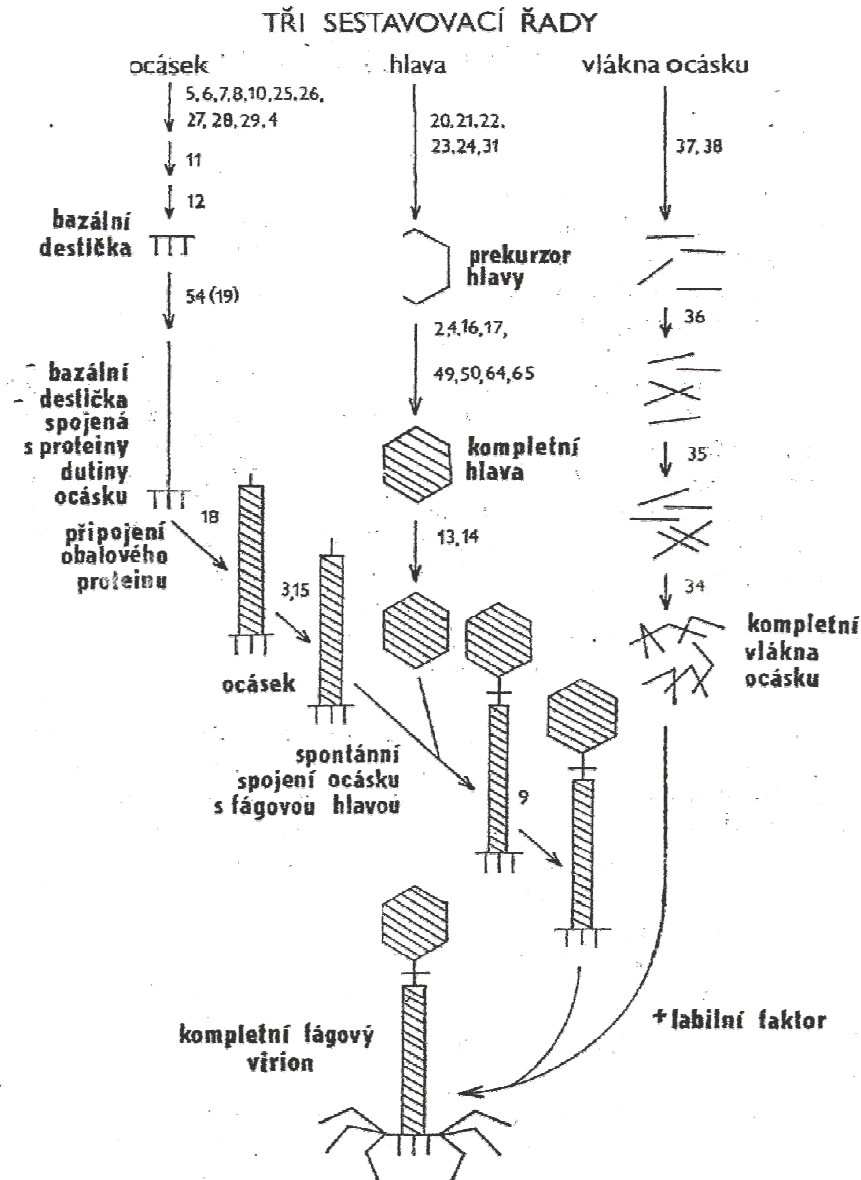
- probíhá **autokatalycky** ve dvou krocích
1. Extein 1 je uvolněn a připojen k cysteinu exteinu 2 – vzniká větvený intermediát
 2. Inteín je vyštěpen a oba exteiny se spojí peptidovou vazbou do zralého proteinu

Inteins are currently known in more than 200 types of proteins with diverse in functions. These proteins include metabolic enzymes, DNA and RNA polymerases, proteases, ribonucleotide reductases, and vacuolar-type ATPases.

Sestřih inteinu (proteinový sestřih)



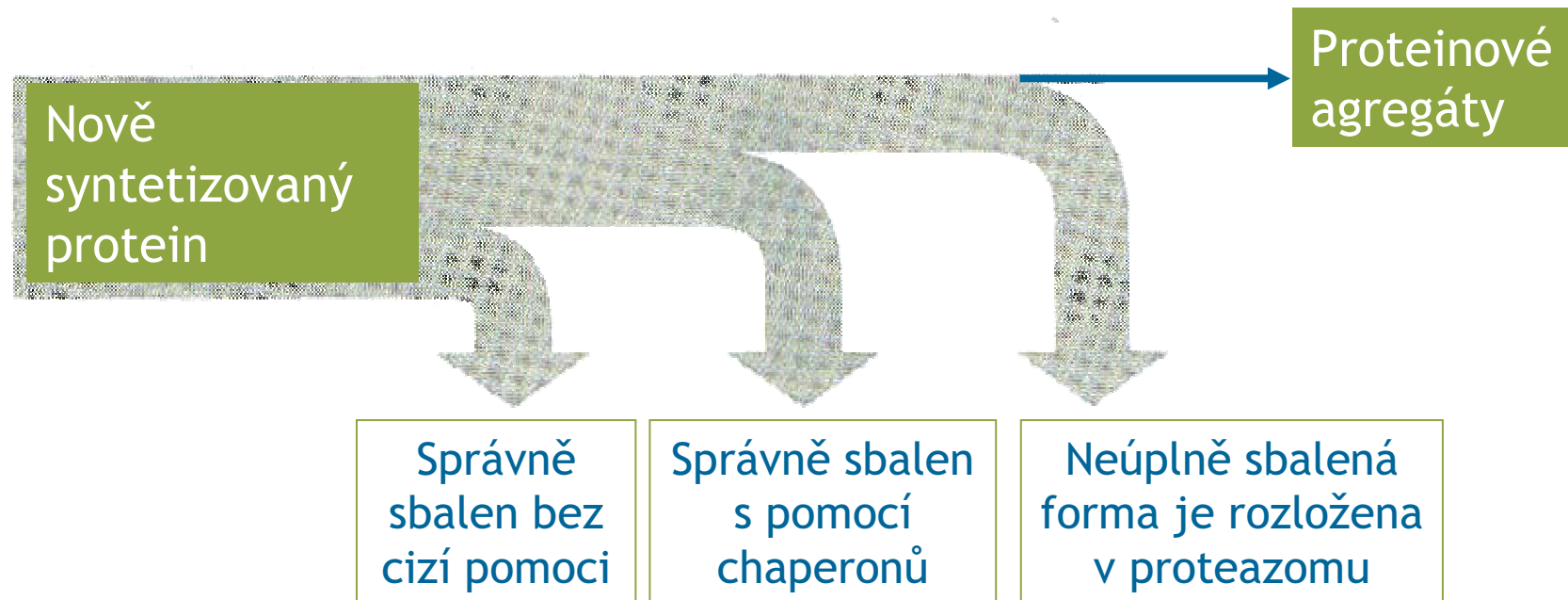
Samosestavování (self-assembly)



Vytváření nadmolekulárních struktur, spojování proteinů nekovalentními vazbami

Čísly jsou označeny strukturální geny, kterými jsou kódovány proteiny fága

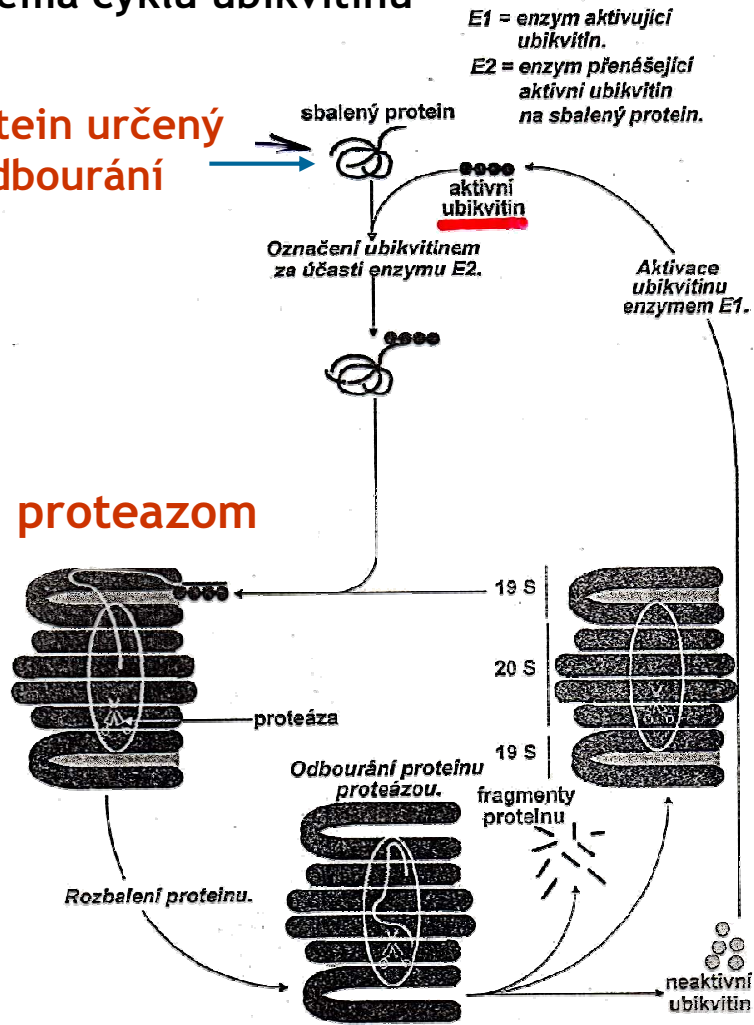
Buněčné mechanismy monitorující kvalitu proteinů po translaci



Odbourávání proteinů v proteazomech (eukaryota)

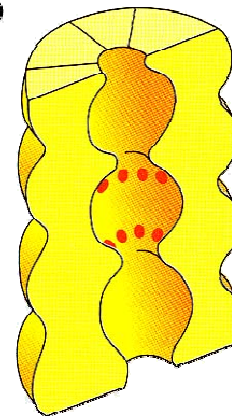
Schéma cyklu ubikvitinu

Protein určený k odbourání



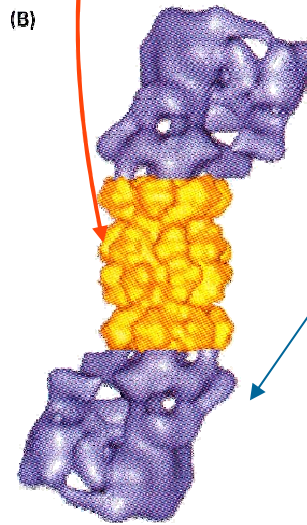
E1 = enzym aktivující ubikvitin.
 E2 = enzym přenášející aktivní ubikvitin na sbalený protein.

(A)



centrální cylindr
 aktivní místa proteáz

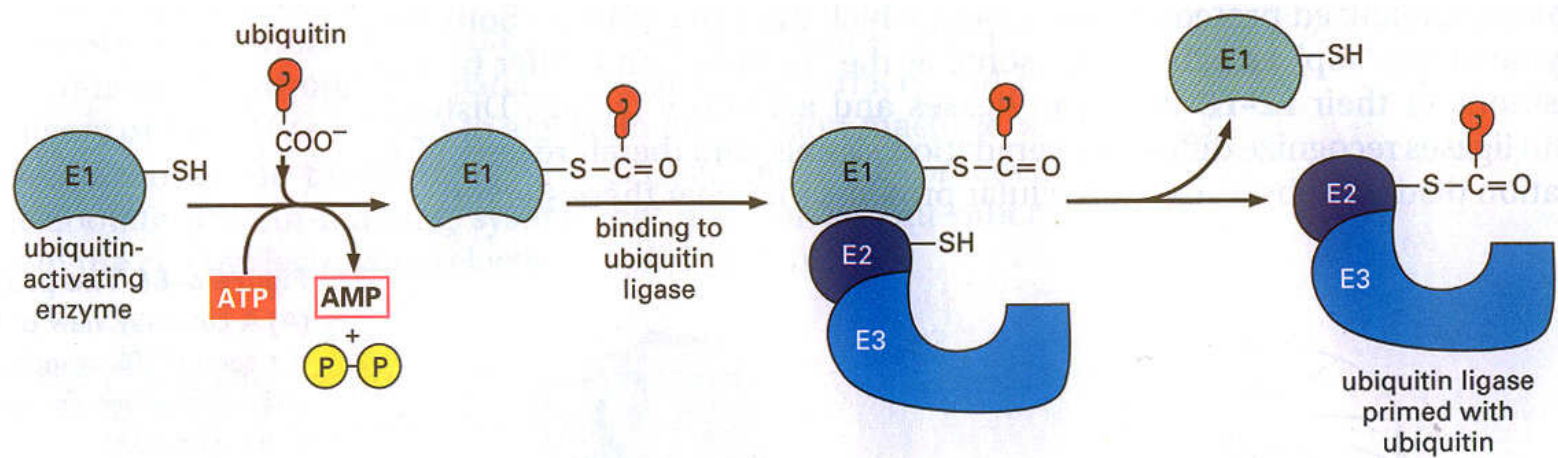
(B)



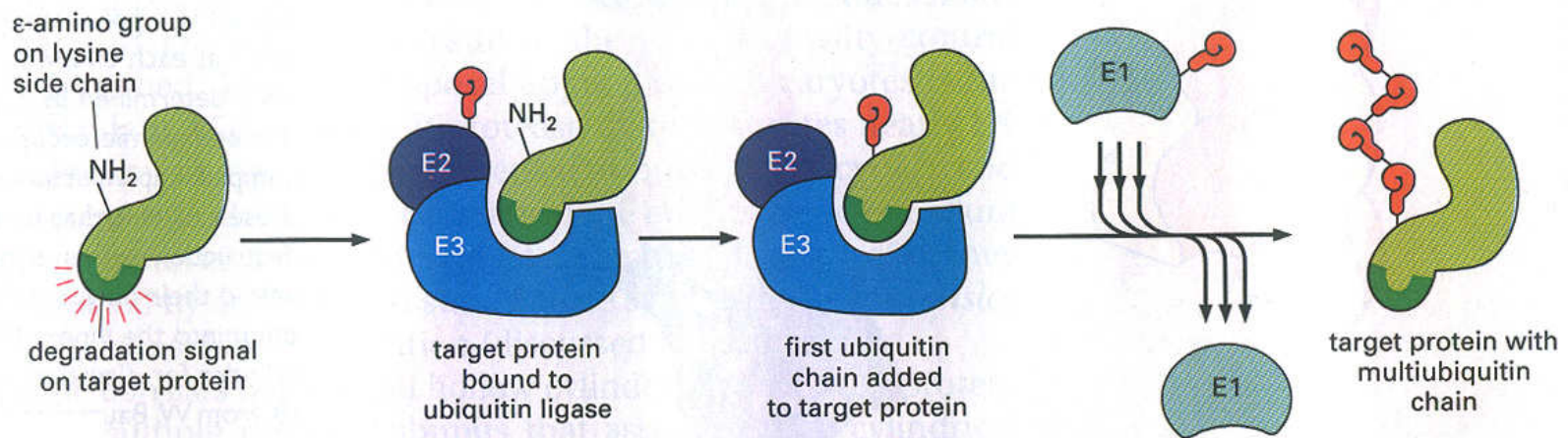
19S „cap“
 - váže označené proteiny

Označování proteinů ubiquitinem

A. Aktivace ubiquitinu prostřednictvím enzymů E1, E2 a E3



B. Připojení ubiquitinu na cílový protein



Ubiquitin či ubikvitin (z lat. ubiquae, všude) je malý globulární protein o délce 76 aminokyselin, přítomný ve všech eukaryotických buňkách, který reguluje rozklad jiných proteinů v proteazomu, lyzozomu či ve vakuole. V určitých případech však také stimuluje endocytózu, vnitrobuněčný transport a podílí se na udržování struktury chromatinu (ubikvitin se váže se na histony).

Ubiquitin se zpravidla připojí na protein, který má být rozložen (degradován), tento proces navázání ubiquitinu se označuje jako ubiquitinace. Váže se glycinem (na svém C-terminálním konci) k lysinu na proteinu určeném k degradaci.

Po připojení ubikvitinu je označený protein degradován proteasomem 26S. Tato degradace je specifická a přesně cílená, je tedy často využívána pro specifické odstranění proteinů signálních drah. Proteiny degradované proto, aby jejich aminokyseliny, případně peptidy mohly být použity jako stavební kameny, bývají degradovány spíše nespecificky proteázami.

Mechanismus připojení

Na cílový protein, určený k degradaci, se ubikvitin váže pomocí tří enzymů, aktivačního E1, konjugačního E2 a ligačního E3. Ligační enzym se spojí s cílovým proteinem. Aktivační enzym nejprve ubikvitin aktivuje na účet ATP a poté ho předá konjugačnímu enzymu, který se spojí s komplexem, tvořeným ligačním enzymem spojeným s cílovým proteinem určeným k degradaci. V tomto komplexu tvořeným E2, E3, ubikvitinem a cílovým proteinem pak dojde k navázání ubikvitinu na cílový protein. E2 a E3 se recykluje.

