

Syntéza proteinů

©Biochemický ústav LF MU (E.T.)

2012

Syntéza proteinů - translace

Které buňky: v buňkách obsahujících DNA

Kde v buňce: ribosomy (volné nebo vázané na ER)
mitochondrie

Rozdíly mezi eukaryoty a prokaryoty:

prokaryoty: transkripce, úpravy transkriptu a translace nejsou prostorově odděleny

eukaryoty: translace probíhá až je zralá mRNA dopravena do cytoplazmy

Molekuly a další species potřebné pro syntézu proteinů

Látka	Funkce
Aminokyseliny	Substráty proteosyntézy
Řada enzymů	Katalyzátory
Bílkovinné faktory	efektory
ATP, GTP	energie
Anorganické ionty (Mg^{2+} , K^{+})	Kofaktory enzymů
tRNA	Přenos AK na ribosu
mRNA	Určuje pořadí AK v proteinu
rRNA	Strukturní role, katalyzuje vznik peptidové vazby

Genetický kód

Proteiny – 20 AK

RNA – 4 báze



Každá aminokyselina je charakterizována tripletem bází v mRNA – **kodonem**

Celkem 64 kodonů → 61 kóduje aminokyseliny

3 jsou STOP kodony (UAA, UAG, UGA)

Nierenberg (1961) – poly(U) sekvence mRNA je předlohou pro syntézu polyfenylalaninu ⇒ sekvence UUU je kódem pro fenylalanin

Genetický kód

První Báze		Druhá báze				Třetí báze
5'		U	C	A	G	3'
		Phe	Ser	Tyr	Cys	U
		Phe	Ser	Tyr	Cys	C
U		Leu	Ser	Stop	Stop	A
		Leu	Ser	Stop	Trp	G
		Leu	Pro	His	Arg	U
		Leu	Pro	His	Arg	C
C		Leu	Pro	Gln	Arg	A
		Leu	Pro	Gln	Arg	G
		Ile	Thr	Asn	Ser	U
A		Ile	Thr	Asn	Ser	C
		Ile	Thr	Lys	Arg	A
		Met	Thr	Lys	Arg	G
		Val	Ala	Asp	Gly	U
G		Val	Ala	Asp	Gly	C
		Val	Ala	Glu	Gly	A
		Val	Ala	Glu	Gly	G

Vztah mezi mRNA a proteinem

- Sekvence bází v mRNA je roztržena do kodonů
- Startovací kodon zahajuje čtení úseku
- Pořadí kodonů v mRNA určuje pořadí, ve kterém jsou aminokyseliny připojovány v rostoucím polypeptidovém řetězci – čtení je určeno čtecím rámcem

..... AUG CAC AGU GGAGUU

Zlý pes byl sám

Z lýp esb yls ám

Efekt mutací

Mutace jsou výsledkem poškození nukleotidů v DNA nebo neopravených chyb během replikace.

Mohou být přepsány do mRNA

Translací chybné báze může v proteinu vzniknout abnormální sekvence AK

Typy mutací

1. bodové \longrightarrow výměna jediné báze

a) mírné - neovlivní sekvenci AK v proteinu
např. CGA \rightarrow CGG (obě sekvence kódují Arg)

b) měnící smysl – jedna AK je zaměněna jinou
např. CGA \rightarrow CCA vyvolá záměnu Arg \rightarrow Pro

c) nesmyslné – vyvolají předčasnou terminaci řetězce
např. CGA \rightarrow UGA, kodon pro Arg \rightarrow STOP kodon

Typy mutací (pokr.)

2. inserce – vložení jednoho nebo více nukleotidů
3. delece – vypuštění jednoho nebo více nukleotidů

Porucha záleží na počtu vypuštěných nebo vložených nukleotidů

Jsou-li vypuštěny tři nukleotidy, nebo více trojic nukleotidů při zachování čtecího rámce, dojde k tvorbě polypeptidu s chybějícími AK

Je-li vypuštěn jeden nebo dva nukleotidy, dojde ke změně čtecího rámce a vznikají zkomolené sekvence AK, nesmyslné kodony atd.

Příklad bodové mutace

Bodové mutace v genech pro hemoglobin:

Je známo asi 800 strukturních variant lidského hemoglobinu

Většina je způsobena bodovou mutací a je neškodná.

Některé však vyvolávají choroby.

Methemoglobinemie – např. nahrazení jednoho histidinu tyrosinem \Rightarrow bílkovina je nepřístupná pro působení methemoglobin reductasy, zvyšuje se methemoglobin v krvi (HbM)

Srpková hemoglobinemie – nahrazení glutamátu valinem v pozici 6 β -řetězce \Rightarrow řetězec je méně rozpustný, dochází k řetězení \Rightarrow srpkovitý tvar erytrocytů (HbS)

Příklad nonsense mutace

β^0 -thalasemie

Způsobena mutací na kodonu 17 v obou allelách, která způsobuje předčasnou terminaci syntézy β -řetězce

Syntéza proteinů podle kodonů v cytoplazmě, ve vazbě na ribosomy

Aminokyseliny nemohou přímo reagovat s bázemi

„adaptérem jsou tRNA molekuly“

- každá molekula tRNA obsahuje antikodon
- antikodon je triplet bází komplementárních ke kodonu mRNA
- každá tRNA může vázat specifickou AK na svém 3'-konci

Fáze translace

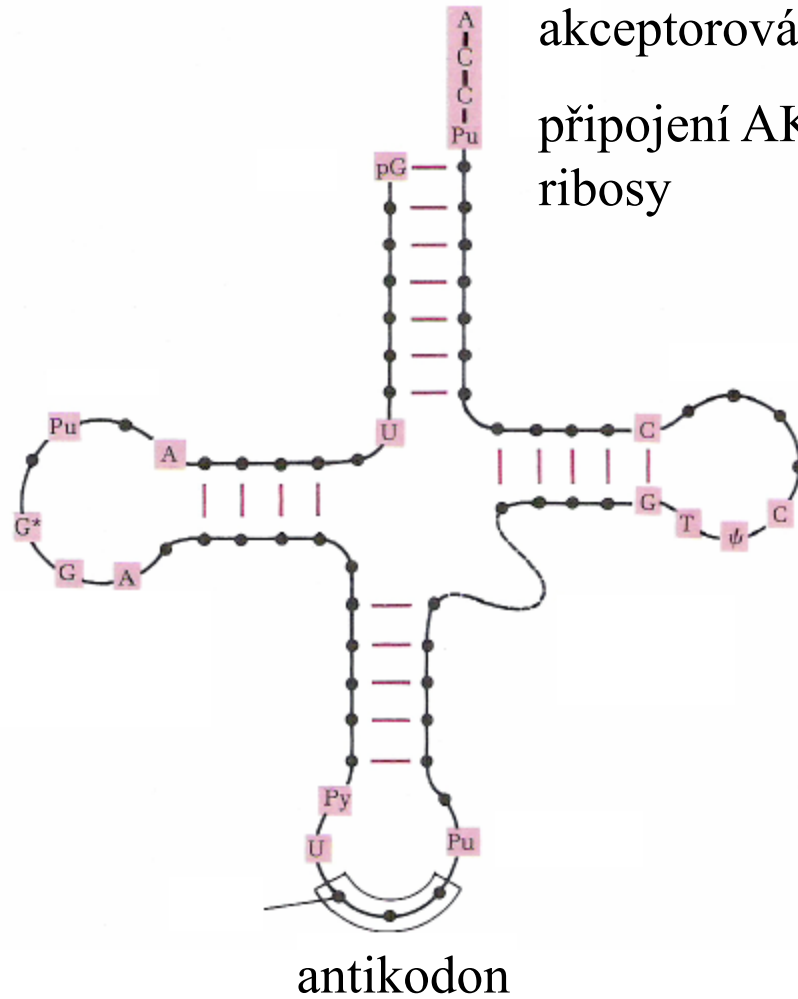
A. Inciace

B. Elongace

C. Terminace

Struktura tRNA

D-smyčka



3'-konec,

akceptorová stopka

připojení AK esterovou vazbou k 3'-OH ribosy

T-smyčka

(TΨC)

Vazba na povrch ribosomu

antikodon

Tvorba aminoacyl-tRNA

1. aminokyselina je nejprve aktivována reakcí s ATP na aminoacyl-AMP
 2. aktivovaná AK je přenášena na 2' - nebo 3' - OH skupinu ribosy na 3' konci tRNA
- reakce 2 je katalyzována specifickými enzymy (aminoacyl-tRNA synthetasy) a vyžaduje dodání energie

Aminoacyl-tRNA syntetasy

(nejméně 20 různých enzymů v buňce)

vykazují vysoký stupeň specifity pro aminokyseliny.

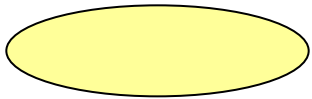
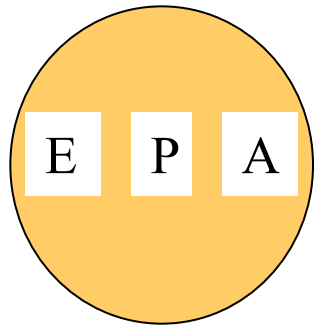
Enzym rozpoznává jak aminokyselinu, tak specifickou tRNA.

Chyba 1 : 10 000.

Tato vysoká specifita se často nazývá 2.genetický kód

Závisí na lokalizaci určitých bází v tRNA, nikoliv na antikodónu

Ribosomy



Ribonukleoproteinové částice – složené z RNA a proteinů

Tvořeny velkou a malou podjednotkou

V inaktivním stavu podjednotky odděleny, při zahájení proteosyntézy agregují.

Na větší podjednotce tři vazebná místa pro molekuly tRNA – P, A, E

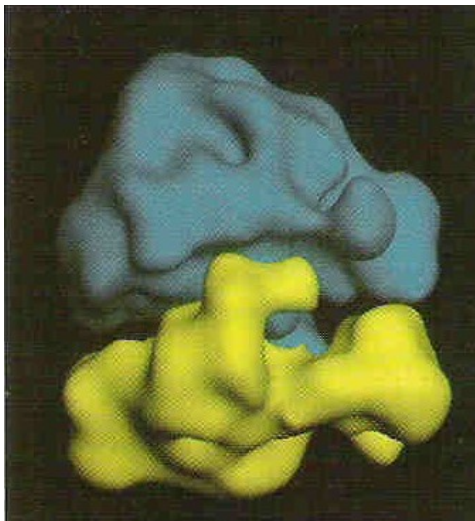
P-peptidyl-tRNA

A-aminoacyl-tRNA

E-volná tRNA (exit)

Větší podjednotka katalyzuje tvorbu peptidové vazby mezi aminokyselinami.

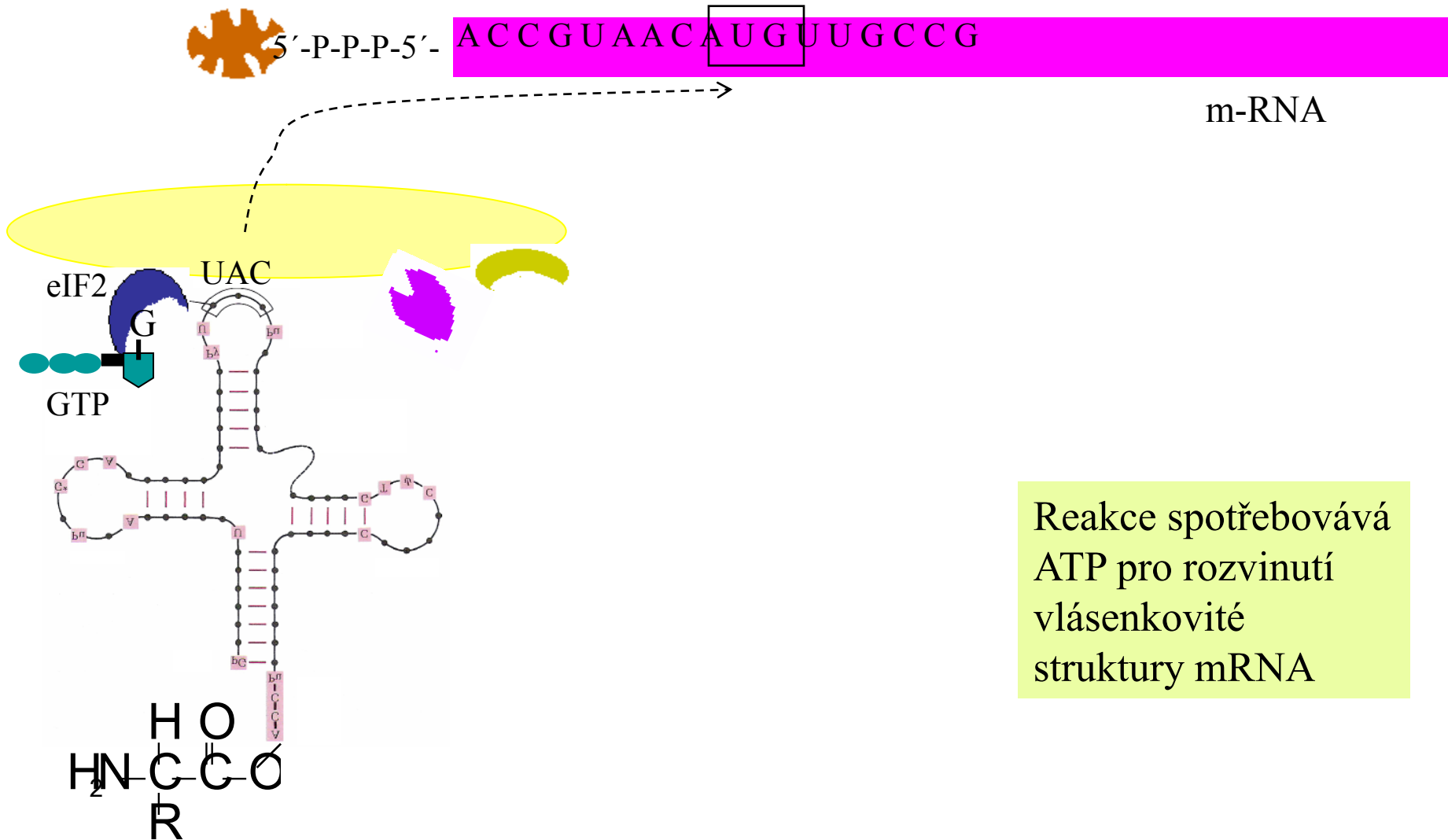
Menší podjednotka váže mRNA a kontroluje správné párování bází mezi kodonem a antikodonem



Prokaryotické x eukaryotické ribosomy

Vlastnost	Bakteriální	Lidský
Sedimentační konstanty:		
kompletní ribosom	70S	80S
Menší podjednotka	30S	40S
Větší podjednotka	50S	60S
Obsah RNA	65 %	50 %
RNA-menší podjednotka	16S	18S
RNA-větší podjednotka	5S 23S	5S 5,8S 28S
Umístění v buňce	Volně v cytoplazmě nebo vázané na plazmatickou membránu	Volně v cytoplazmě nebo vázané na membrány ER

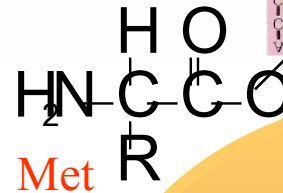
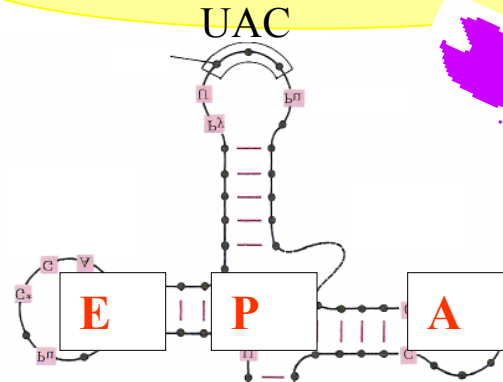
Vazba m-RNA k preiniciačnímu komplexu



Reakce spotřebovává ATP pro rozvinutí vlásenkovité struktury mRNA

Komplex skenuje mRNA od 5' konce, dokud nenarazí na sekvenci AUG¹⁷

Iničiační komplex 80S



- GTP je hydrolyzováno
- eIF se oddělí

•připojí se větší ribosomální podjednotka

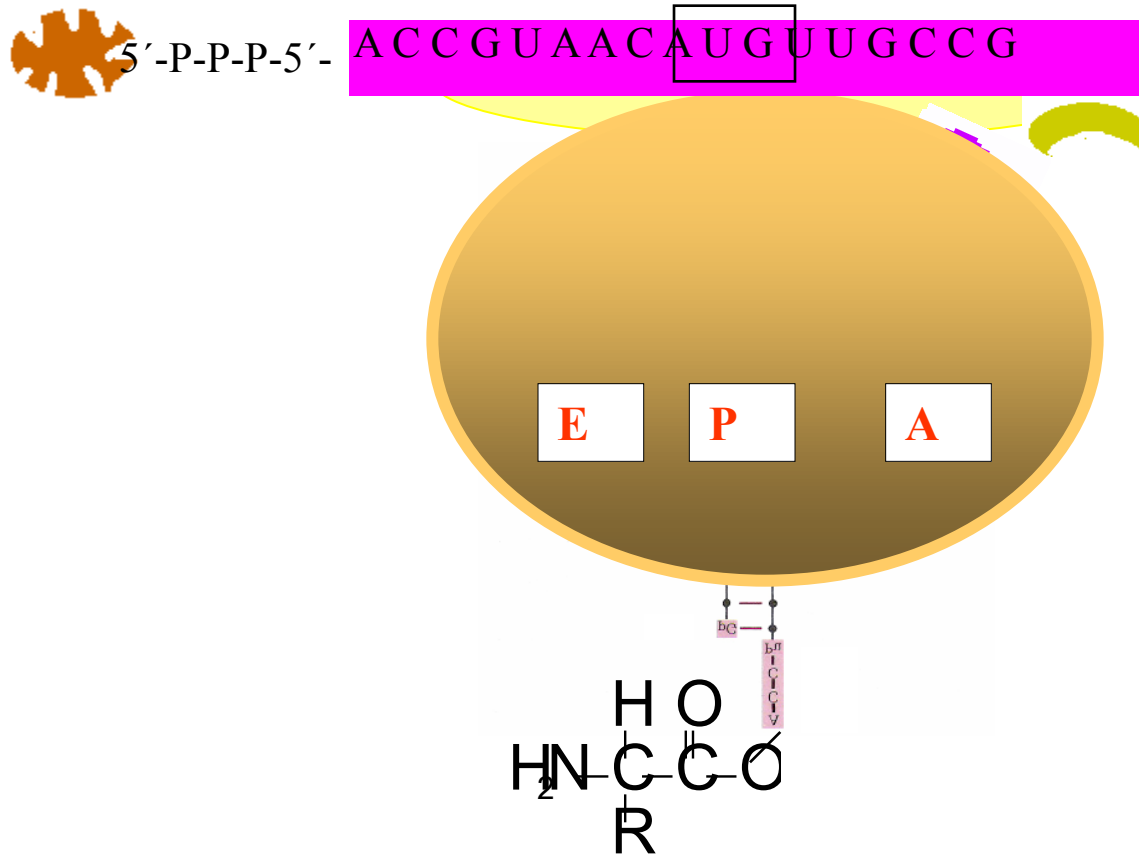
•Met-tRNA se váže v P-místě větší podjednotky ribosomu

Elongace peptidového řetězce

- tvorba další aminoacyl-tRNA
- vazba aminoacyl-tRNA do místa A ribosomu
- tvorba peptidové vazby
- translokace peptidyl-tRNA do místa P

Která další AK bude připojena?

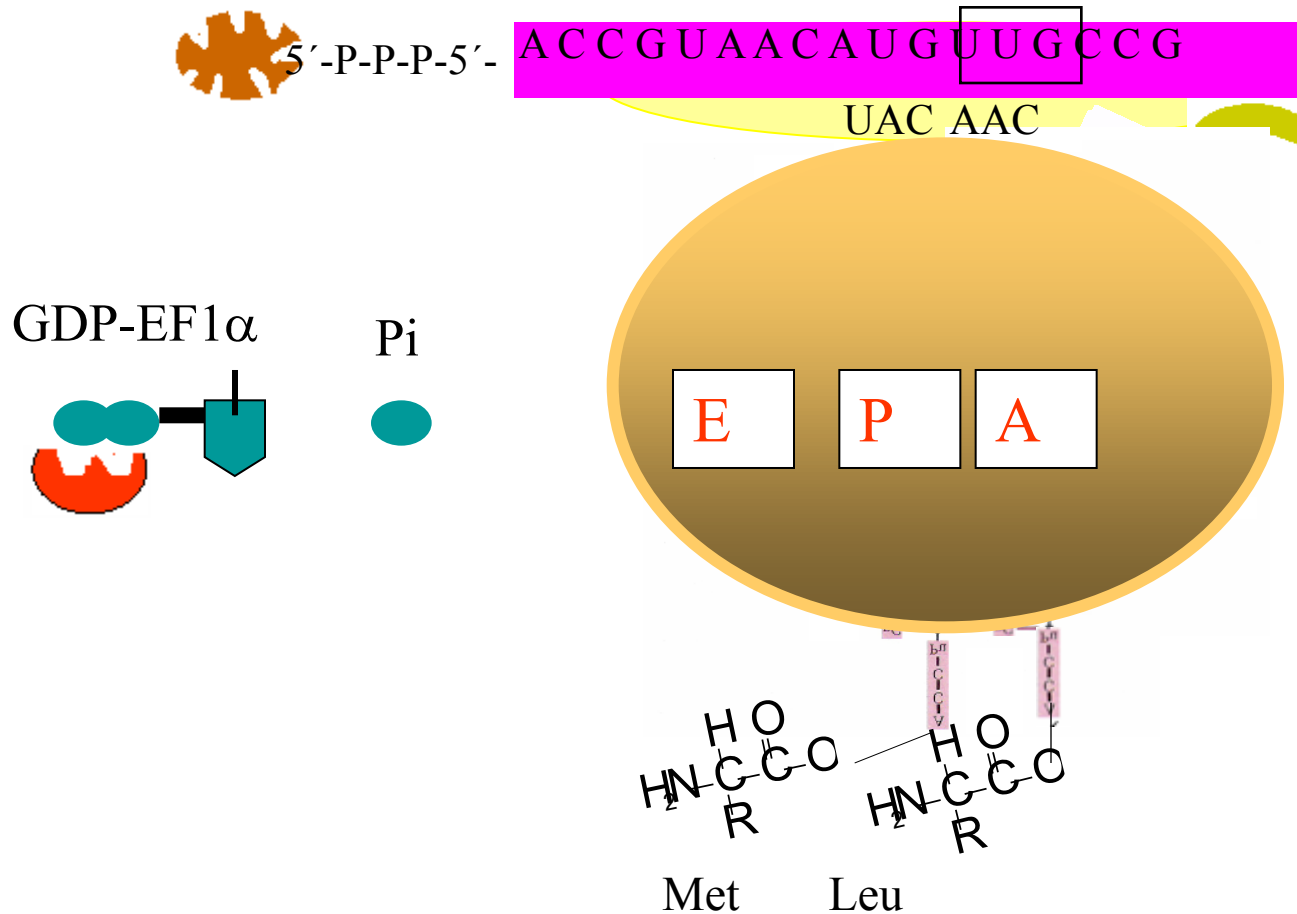
Další kodon je UUG



Antikodon je AAC

Aminokyselinou je leucin

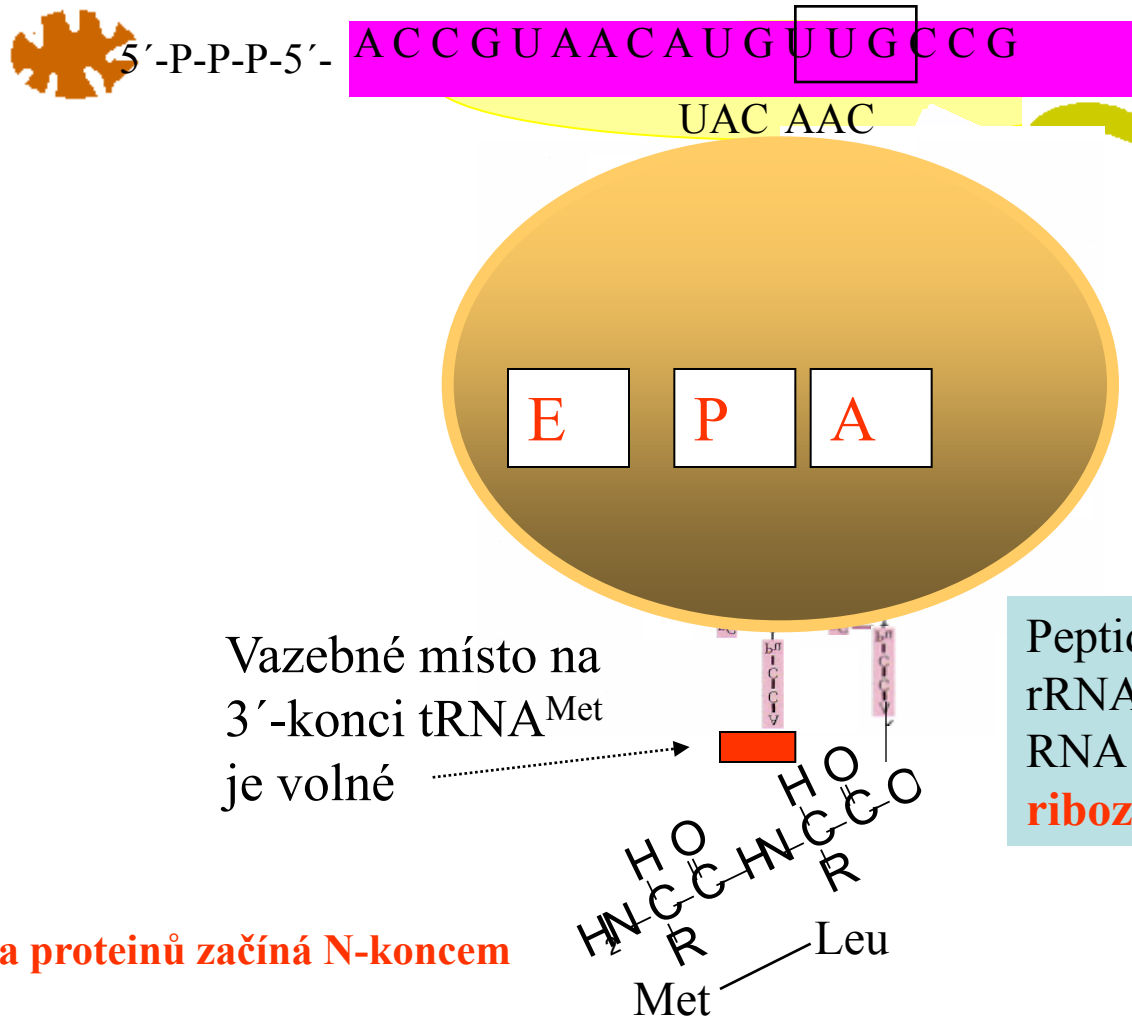
Leu-tRNA se váže do místa A



GTP je hydrolyzováno na GDP + Pi, komplex GDP-EF1 α se uvolní

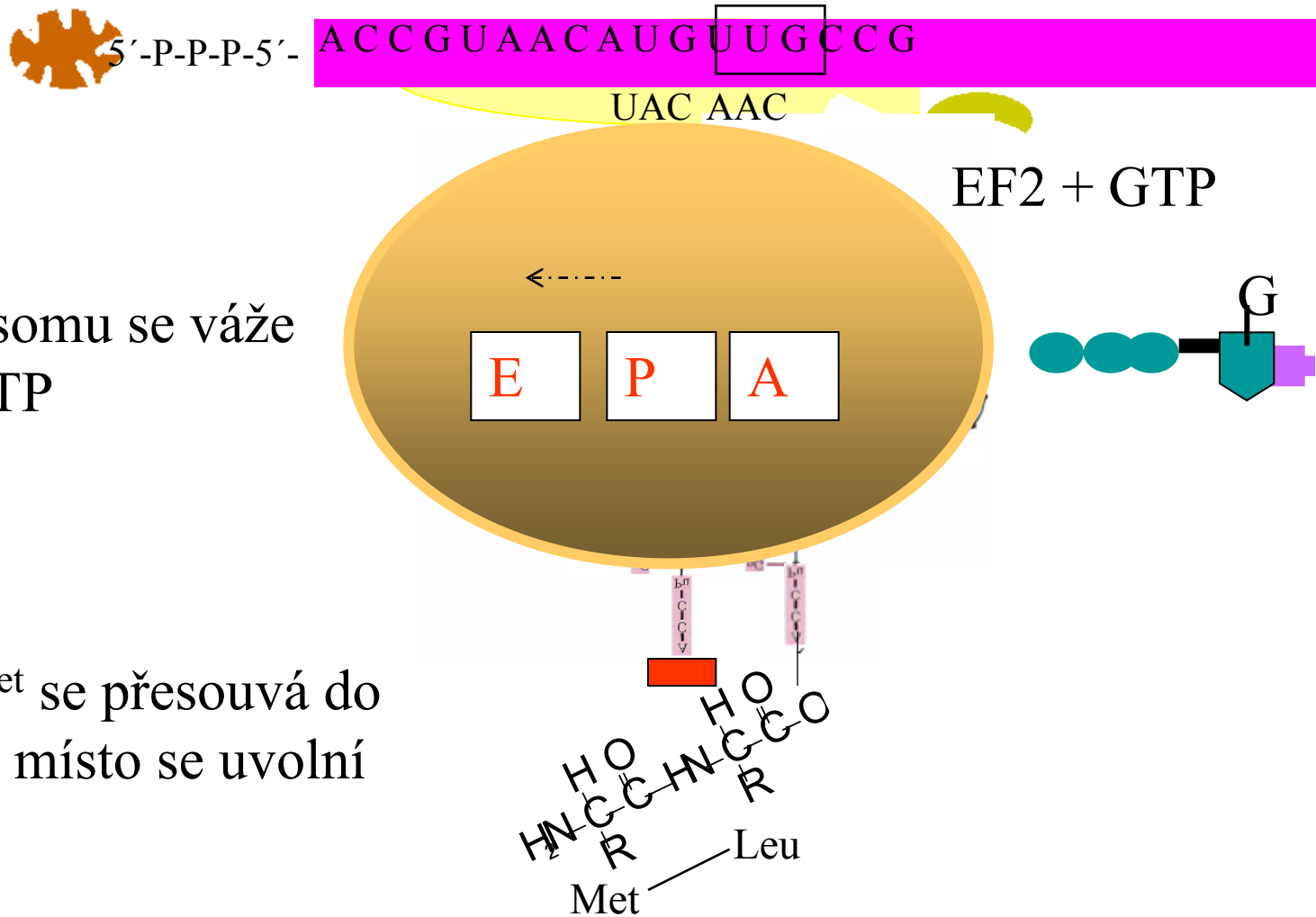
Proces elongace je u prokaryotů a eukaryontů velmi podobný (odlišné kofaktory elongace)

Tvorba peptidové vazby (transpeptidace)



Peptidyltransferasa katalyzuje odštěpení methioninu od tRNA a přenesení na leucin za vzniku peptidové vazby

Přesun Met-tRNA do místa E

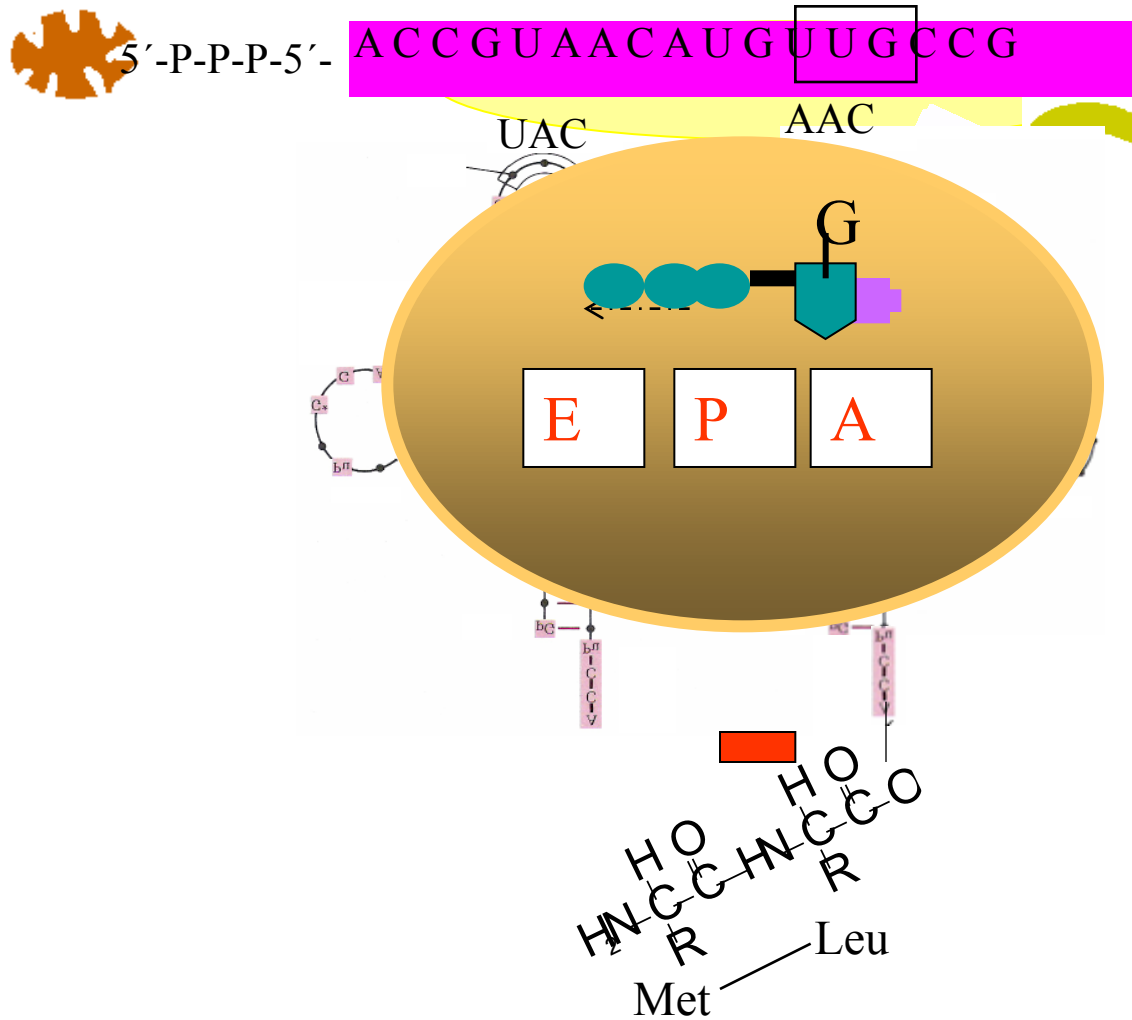


1. k ribosomu se váže EF2 a GTP

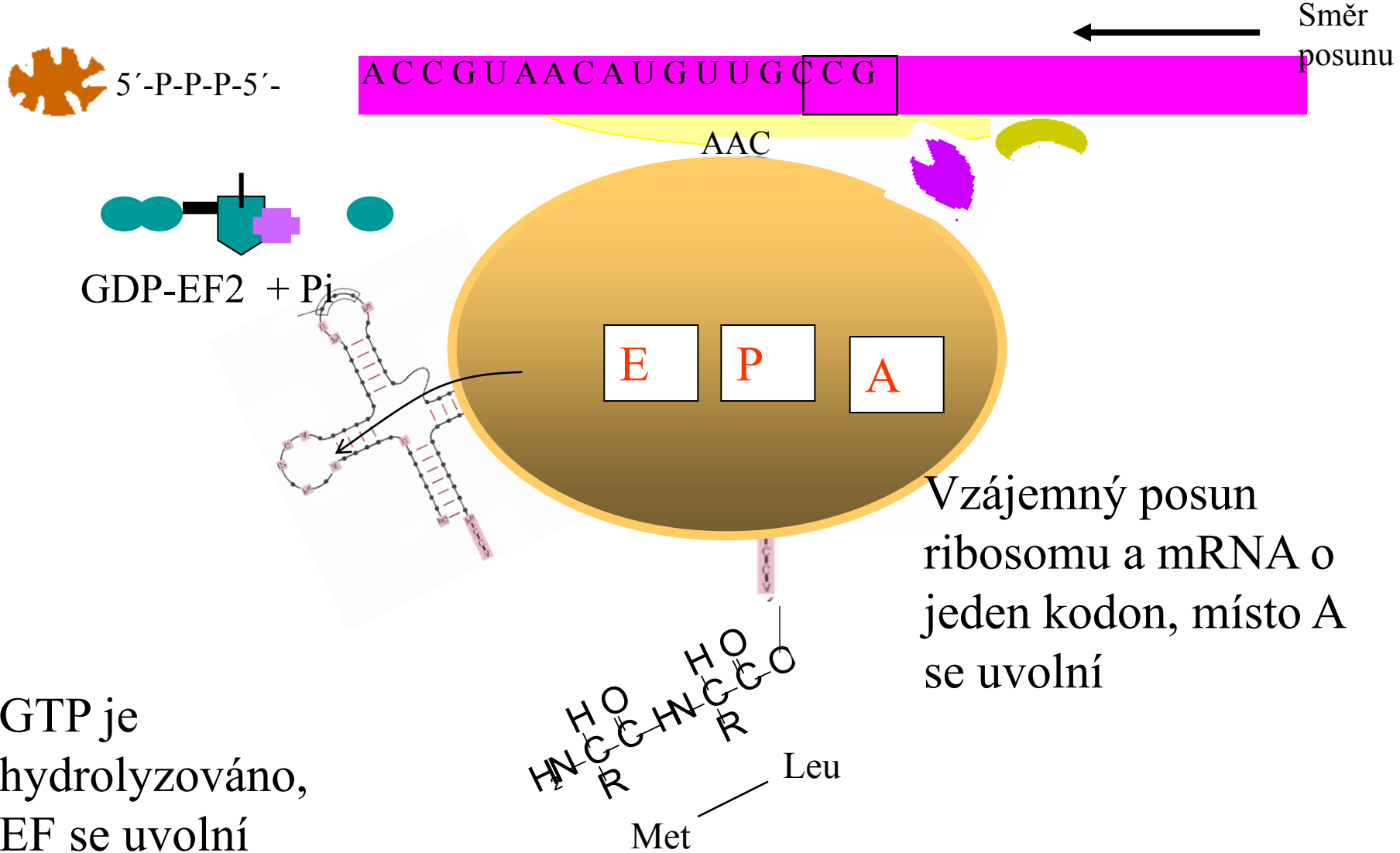
2. tRNA^{Met} se přesouvá do místa E, P místo se uvolní

Přesun met-tRNA do místa E

Výsledek animace na obr.37



Translokace a uvolnění Met-tRNA



Další cyklus elongace

Do místa A se navazuje další tRNA s navázanou AK (prolin)

Které další kroky budou následovat ?

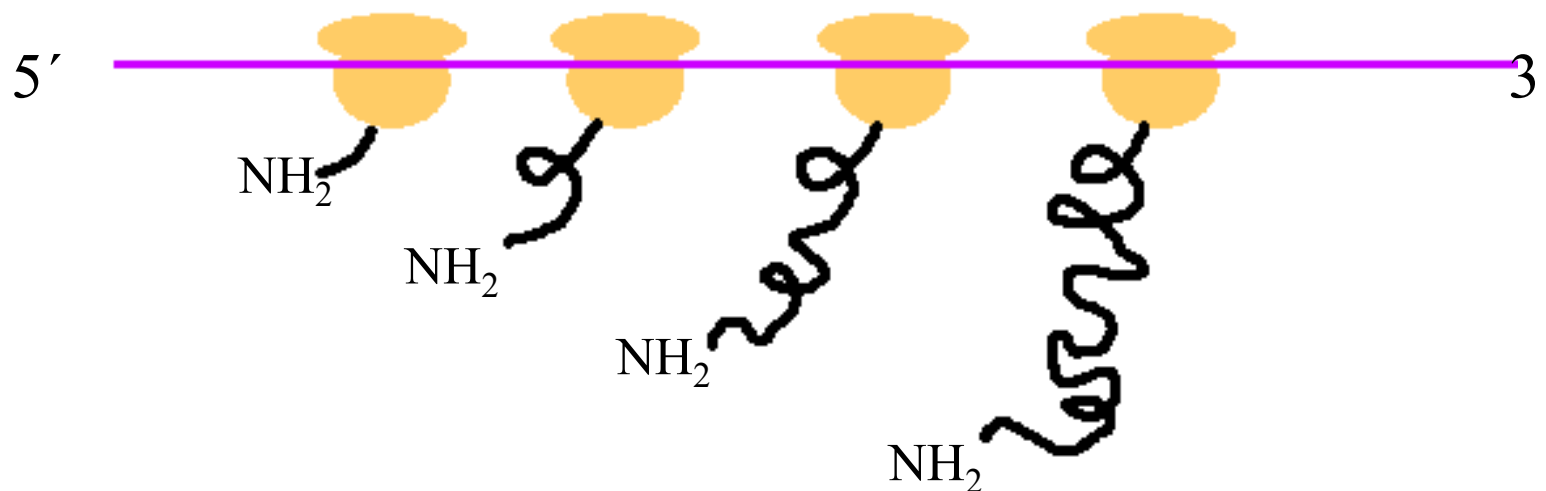


Terminace

- Elongace pokračuje dokud se terminační (Stop) kodon neposune k místu A na ribosomu
- V cytoplazmě není žádná tRNA schopná vázat se ke Stop-kodonu
- K ribosomu se navážou uvolňovací faktory (releasing factors)
- Peptidyltransferasa hydrolyzuje esterovou vazbu mezi peptidovým řetězcem a tRNA
- Nově syntetizovaný peptid je uvolněn z ribosomu
- Ribosom disociuje na podjednotky, mRNA se uvolní

Polysomy

Simultánní translace mRNA na více ribosomech



Zatímco jeden ribosom se pohybuje podél mRNA a produkuje polypeptidový řetězec, další ribosom se může vázat do prázdného místa na 5'-konci. Současně může na jedné mRNA působit mnoho ribosomů (s odstupem cca 80 nukleotidů = polyribosom (polysom))

Syntéza proteinů v mitochondriích

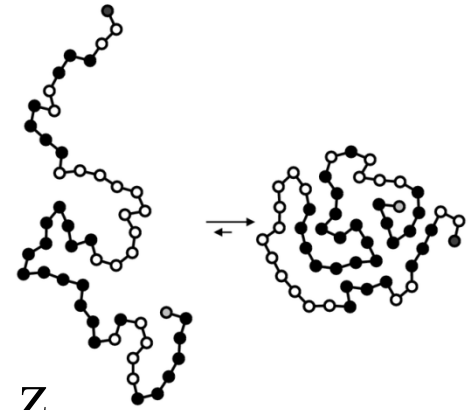
- Mitochondrie obsahují 2-10 kopií uzavřené kruhové, dvouvláknové DNA
- Velikost kolísá v závislosti od druhu
- Živočišná mitochondriální DNA má $M_r \sim 10^7$
- Kóduje rRNA, sadu tRNA a mRNA pro několik proteinů DŘ
- Proteiny syntetizované v mitochondriích jsou nepatrnou frakcí proteinů vnitřní mitochondriální membrány, jsou však esenciální pro průběh oxidativní fosforylace (část komplexů I, III, IV a ATP synthasy)
- Syntéza proteinů v mitochondriích má řadu rysů shodných se syntézou u prokaryontů (iniciace formylmethioninem, citlivost k antibiotikům atd.)

Účinky antibiotik na proteosyntézu bakterií

- Při působení antibiotik jsou využívány rozdíly v mechanismu proteosyntézy u eukaryontů a prokaryontů
- Některá antibiotika reagují specificky s proteiny bakteriálních ribosomů

Antibiotikum	Účinek
Streptomycin	Váže se k 30S ribosomální podjednotce, inhibuje tvorbu iniciačního komplexu. Vyvolává chyby ve čtení mRNA.
Tetracyklin	Váže se k 30S ribosomální podjednotce a inhibuje vazbu aminoacyl-tRNA do místa A
Chloramfenikol	Váže se k 50S ribosomální podjednotce a inhibuje peptidyltransferasu
Erytromycin	Váže se k 50S ribosomální podjednotce a inhibuje translokaci
Puromycin	Obsazuje A-místo ribosomu a vyvolává předčasnou terminaci

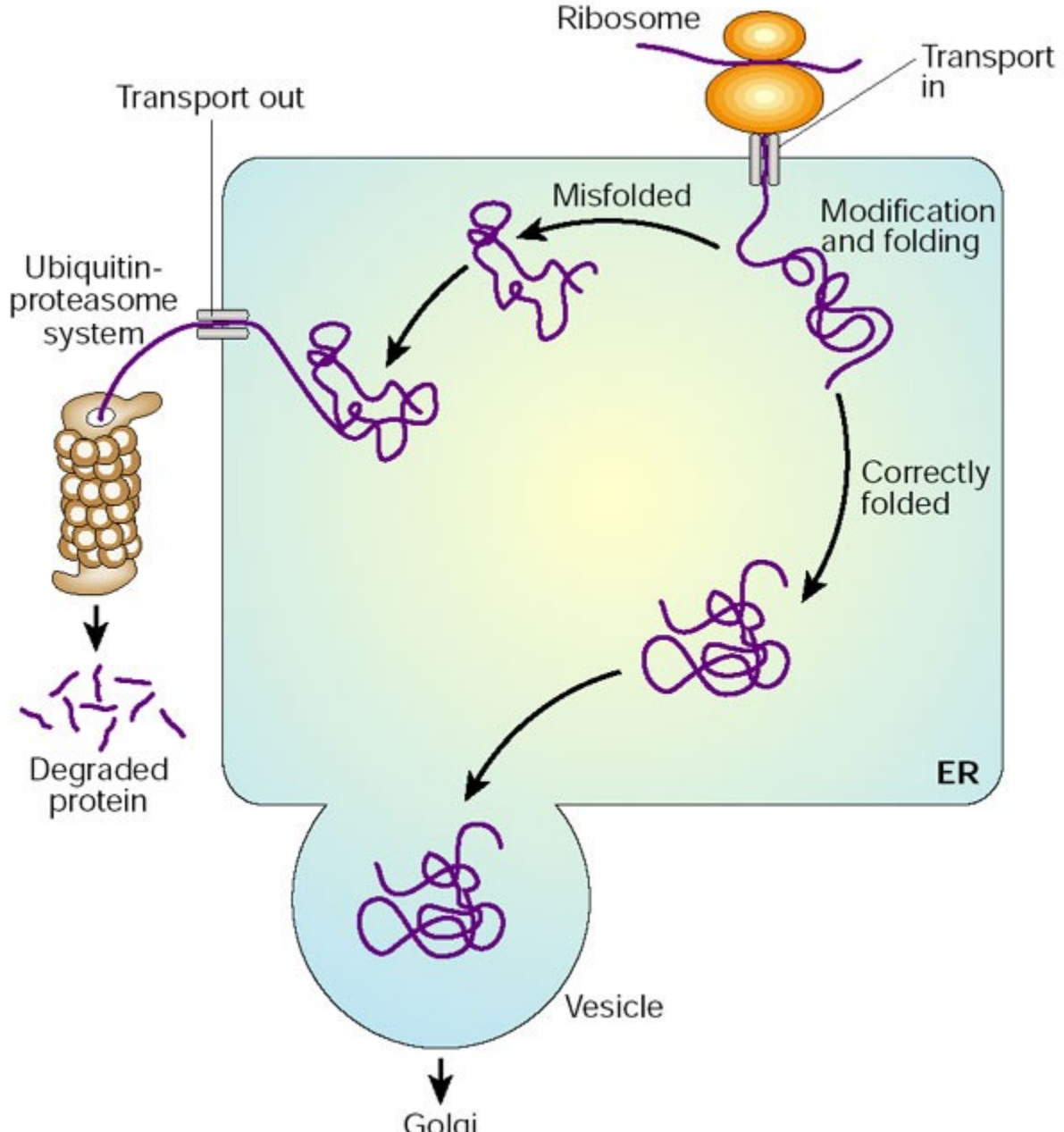
Skládání proteinů (folding)



Nascentní polypeptidový řetězec je transportován z ribosomů

Postupně se dostává mimo „chráněnou“ oblast ribosomu a nastává jeho prostorové skládání

Skládání proteinů



Folding

- Polypeptidový řetězec se sbalením dostává do prostorových konformací – pouze jediná je správná a odpovídá nativnímu stavu.
- Jiné konformace mohou vzniknout např. účinkem tepla, chemikálií, ozáření, oxidačním stresem atd. Skládání je regulováno chaperony.
- Špatné sbalení proteinů může vyplývat z mutace genu
- Špatně sbalené proteiny jsou cílem ubikvitinace a jsou degradovány v proteasomu.
- Akumulace velkého množství špatně sbalených proteinů může nastávat při nadprodukci proteinu, poškození nebo disfunkci.
- Vznikají proteinové shluky (amyloid), které mohou vést k poškození a zániku buňky.

Poruchy ve skládání - amyloidosy

Alzheimerova choroba, BSE (bovinní spongiformní encefalopatie), Parkinsonova choroba ad. Jsou vyvolány akumulací proteinových agregátů v neuronech CNS.

Poruchy vyvolané chyběním proteinů v důsledku chybného skládání

cystická fibroza (CFTR protein)

Marfan syndrome (fibrillin),

Fabryho choroba (alfa galactosidasa)

Chaperony

- kontrolují a zabezpečují správnou prostorovou strukturu proteinů a brání vzniku nesprávných vazeb.
- mnoho chaperonů patří mezi „heat shock proteins“ (hsp)
- Vážou se hlavně k hydrofobním oblastem proteinů
- nachází se hlavně v mitochondriích, cytoplazmě, lumen ER

Posttranslační modifikace proteinů

Modifikace	příklad
Odstranění methioninového zbytku, odstranění signálního peptidu	Definitivní úprava proteinu po translaci
Změna délky molekuly	pepsinogen→pepsin, aktivace koagulačních faktorů
Glykosylace	O-,N- glykoproteiny (viz dále)
Acetylace	Lysinové zbytky v histonech
Karboxylace	Gama-karboxylace glutamátu (osteokalcin, faktory krevního srážení)
Methylace	Lysin v histonech
Prenylace	proteinů zprostředkujících buněčnou proliferaci (GTP-vážíci proteiny, např. Ras, Rac, Rho)
Hydroxylace	Prolin, lysin v kolagenu
Fosforylace	Proteinkinasy, často regulační role
Sumoylace	Stabilizace topoisomerasy II, regulace funkce transkripčních faktorů

Transport bílkovin do subcelulárních a extracelulárních prostorů (targeting)

Syntéza proteinů na volných ribosomech



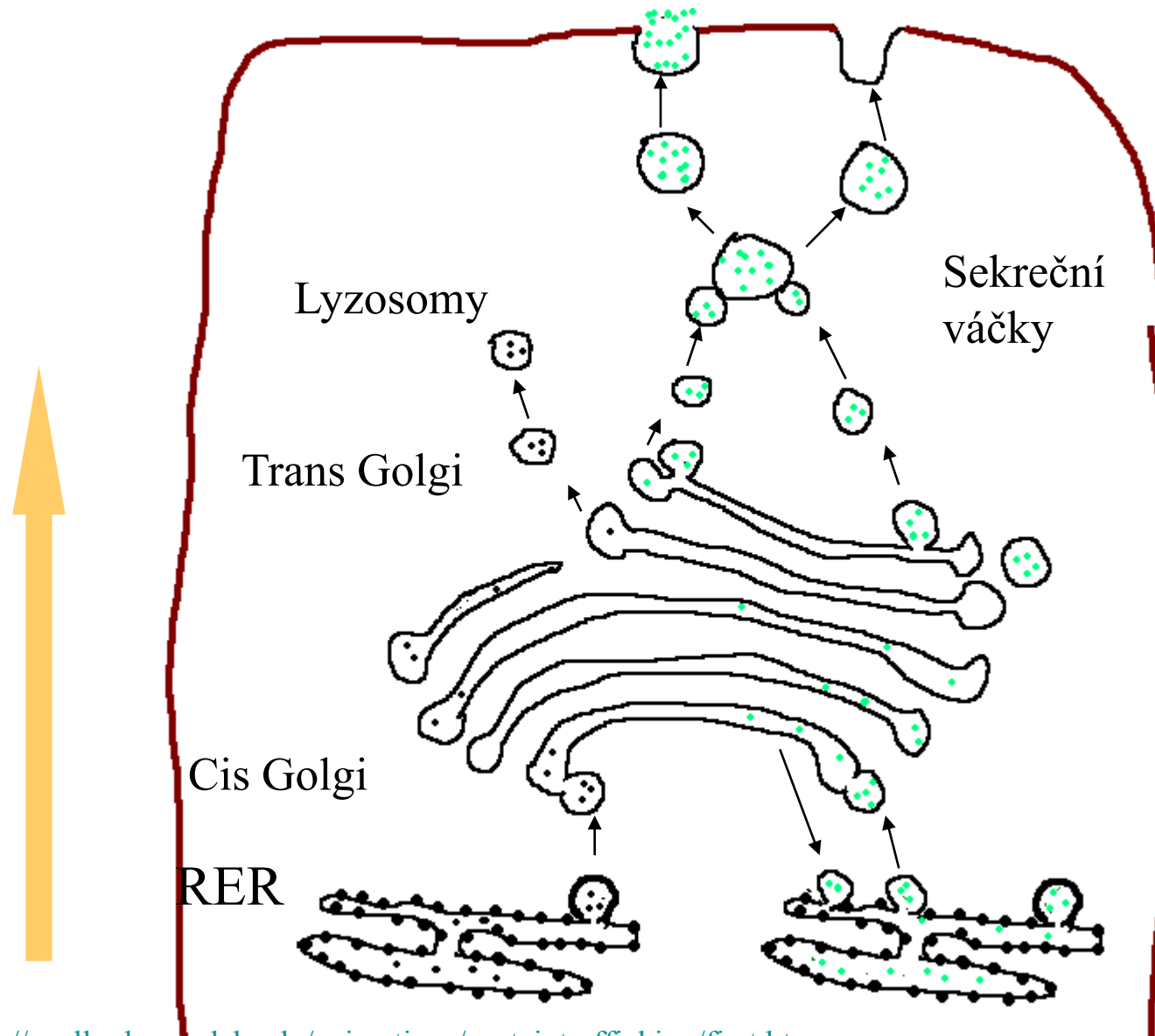
Proteiny zůstávají v cytoplazmě nebo jsou transportovány do organel (jádro, mitochondrie). Obsahují sekvenci AK, která směřuje jejich transport

Syntéza proteinů na RER



Transport do lyzozomů, ER, Golgiho komplexu nebo do membrán, sekrece z buňky

Transport proteinů syntetizovaných na RER-pokr.



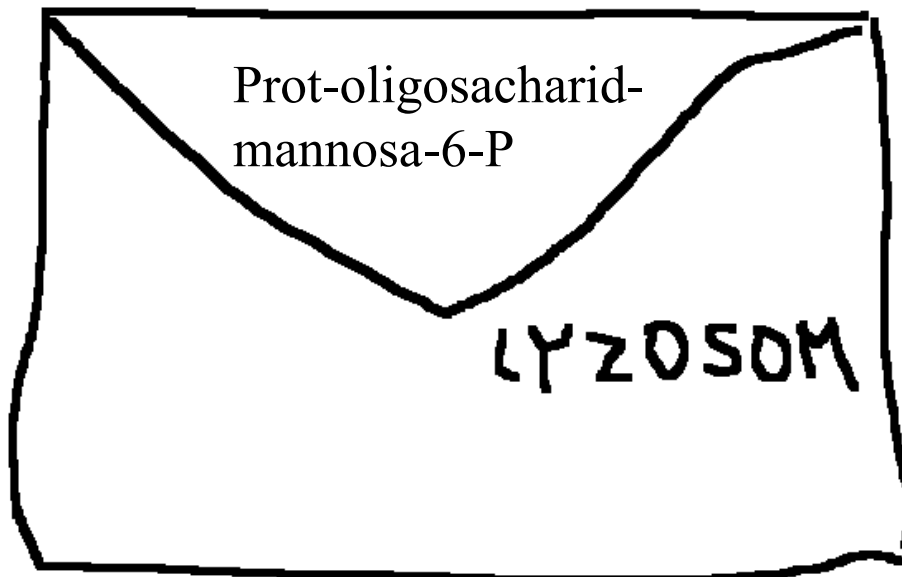
Transport proteinů syntetizovaných na RER-pokr.

- Proteiny syntetizované na RER jsou formou vesikulů transportovány do cis-části Golgiho aparátu
- Zde je třídící centrum – strukturní rysy určují, kam bude protein směřován (sorting)
- Některé zůstanou v Golgiho aparátu, jiné se vracejí do RER
- Další putují ve formě vesikulů do trans části Golgiho aparátu
- Zde se oddělují lyzosomy a sekreční vāčky
- Obsah sekrečních vāček je uvolněn extracelulárně
- Hydrofobní proteiny zabudované v membránách vāček se stávají membránovými proteiny

Principy intracelulárního třídění (sorting)

Příklad 1:

proteiny určené pro lyzosity jsou označeny N-vázanými oligosacharidy zakončenými mannososa-6-P

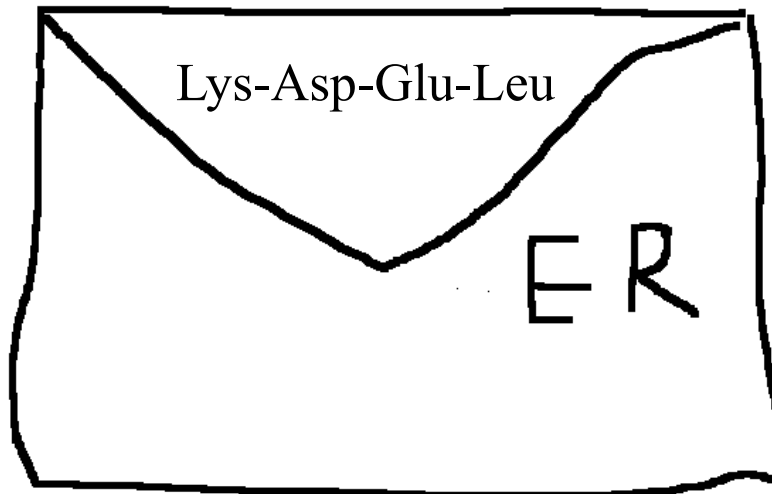


„adresa“ je rozpoznána specifickými membránovými receptory v Golgiho aparátu, který protein zabuduje do klathrinem pokrytého vesiklu

Principy intracelulárního třídění

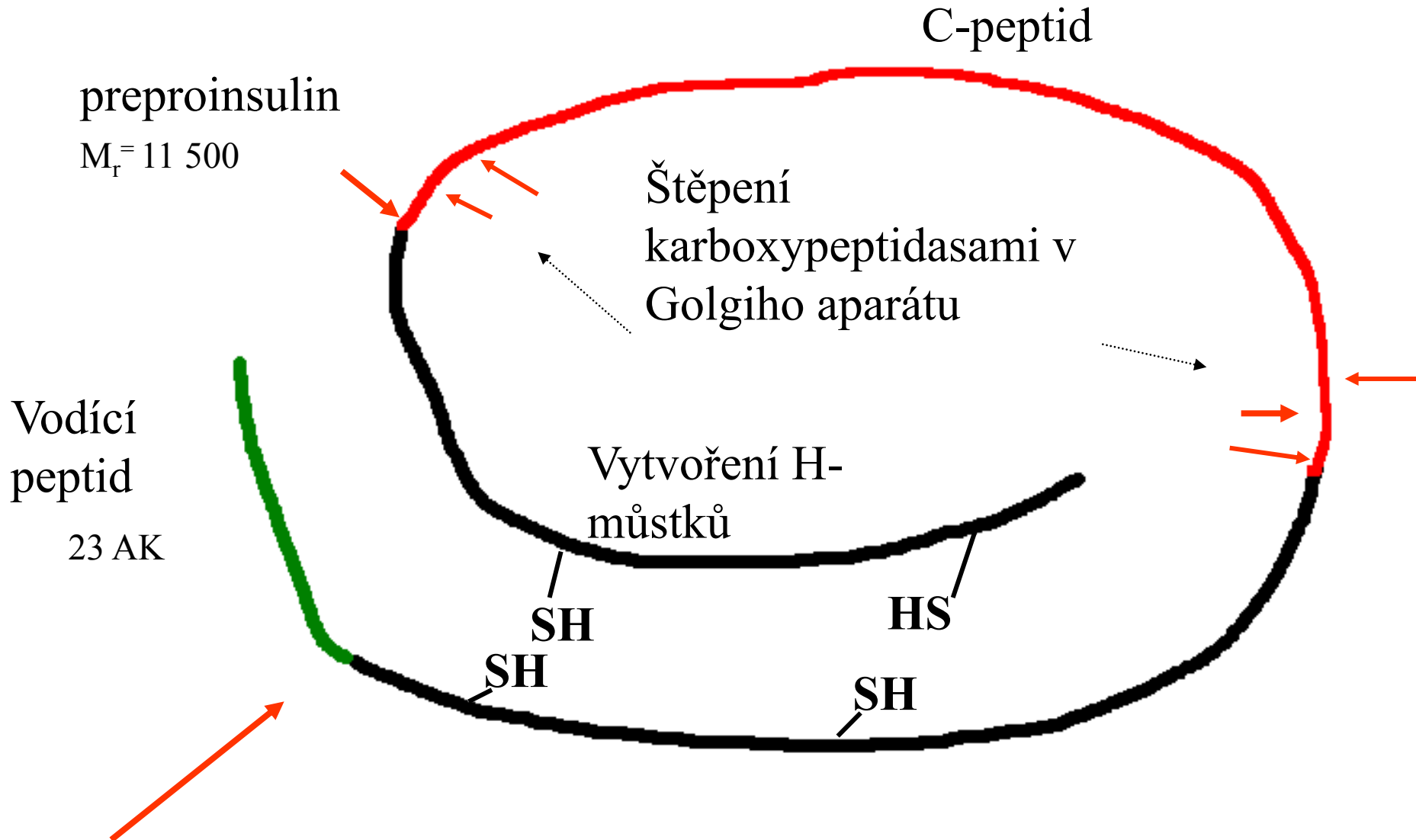
Příklad 2:

Proteiny určené pro ER mají na karboxylovém konci sekvenci Lys-Asp-Glu-Leu



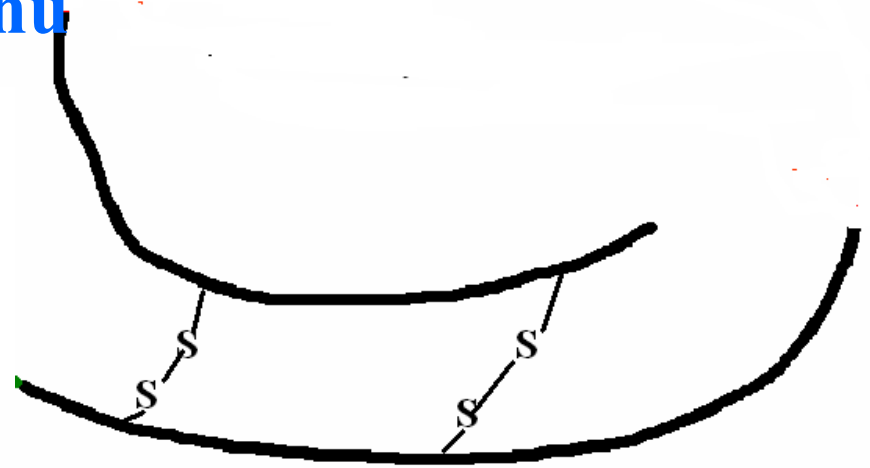
Proteiny jsou z Golgiho aparátu transportovány zpět do ER

Příklad posttranslační úpravy: syntéza insulinu



1 Odštěpení vodícího peptidu v ER

Výsledná struktura insulinu



Na ribosomech RER se syntetizuje preproinsulin

Po vstupu do RER se odstraní vodící peptid

Vytvoří se dva disulfidové můstky

Proinsulin putuje do Golgiho aparátu, zde začíná proteolýza a ukládání do sekrečních granul

Granula putují cytoplazmou k plazmatické membráně

Po stimulaci fúzují s membránou a inzulin se vylévá do extracelulárního prostoru

Glykosylace proteinů

Glykoproteiny



N-glykosidové

Vazba oligosacharidu na amidovou NH₂ skupinu asparaginu

O-glykosidové

Vazba oligosacharidu na -OH skupiny serinu nebo threoninu

Liší se obsahem sacharidů a způsobem syntézy