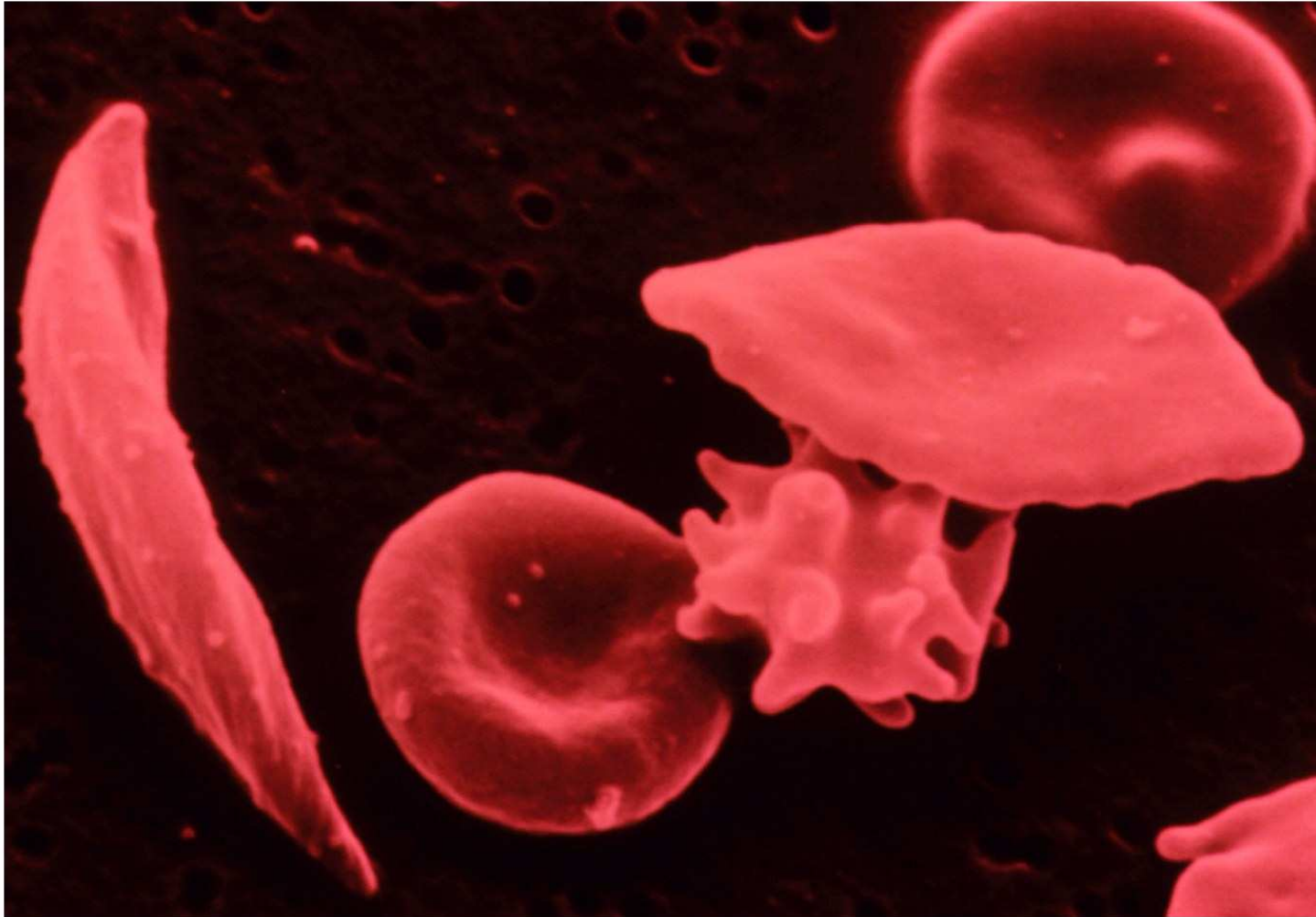


Translace a genetický kód



Srpkovitý tvar červených krvinek u srpkovité anémie: důsledek záměny jedné aminokyseliny v molekule jednoho z polypeptidů hemoglobinu

Osnova přednášky

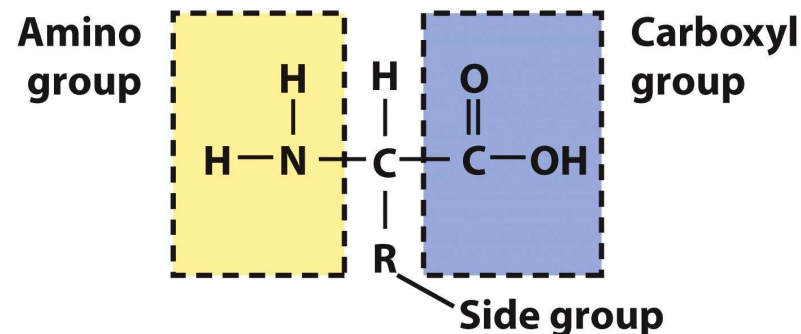
- struktura proteinů
- syntéza proteinů: translace
- genetický kód
- interakce kodon-tRNA
- potvrzení povahy genetického kódu *in vivo*

Struktura proteinů

- proteiny jsou složité makromolekuly složené z 20 různých aminokyselin
- tvoří 15% nativní hmotnosti buněk
- s výjimkou vody představují převládající složku živých organismů
- podílejí se na výstavbě jejich těl jako **strukturní** prvky i na jejich **funkci**

Aminokyseliny

- **proteiny** se skládají z **polypeptidů**
- každý polypeptid je kódován genem a skládá se z **aminokyselin** uspořádaných do dlouhých řetězců, ve kterých jsou aminokyseliny spojeny kovalentními vazbami
- aminokyseliny mají volnou **aminoskupinu** a volnou **karboxylovou skupinu**
- aminokyseliny se vzájemně odlišují **postranními skupinami (R)**



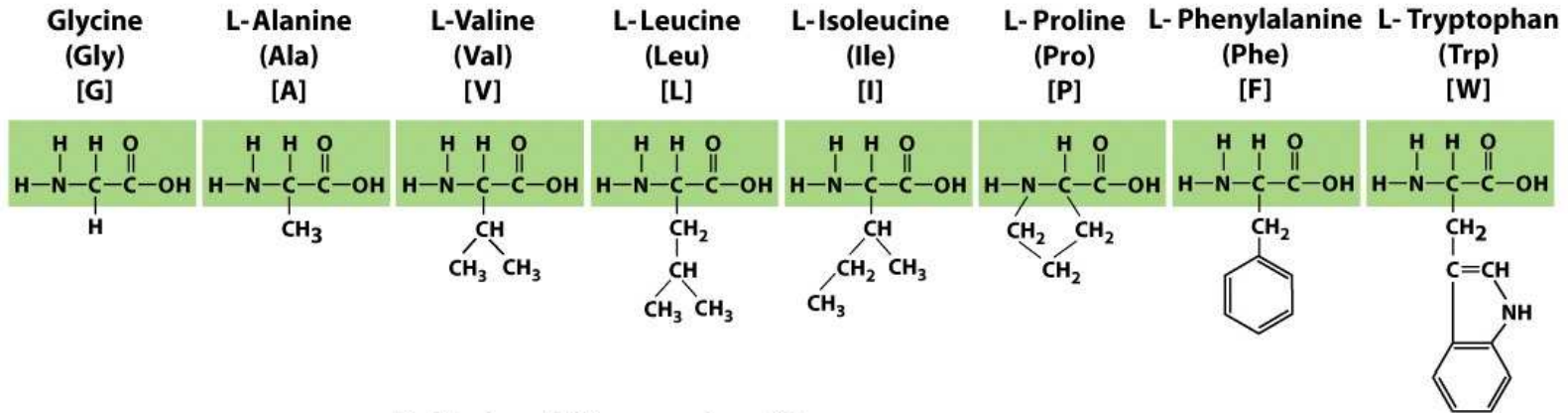
Postranní skupiny aminokyselin

- zdroj jejich strukturní (a funkční) diverzity

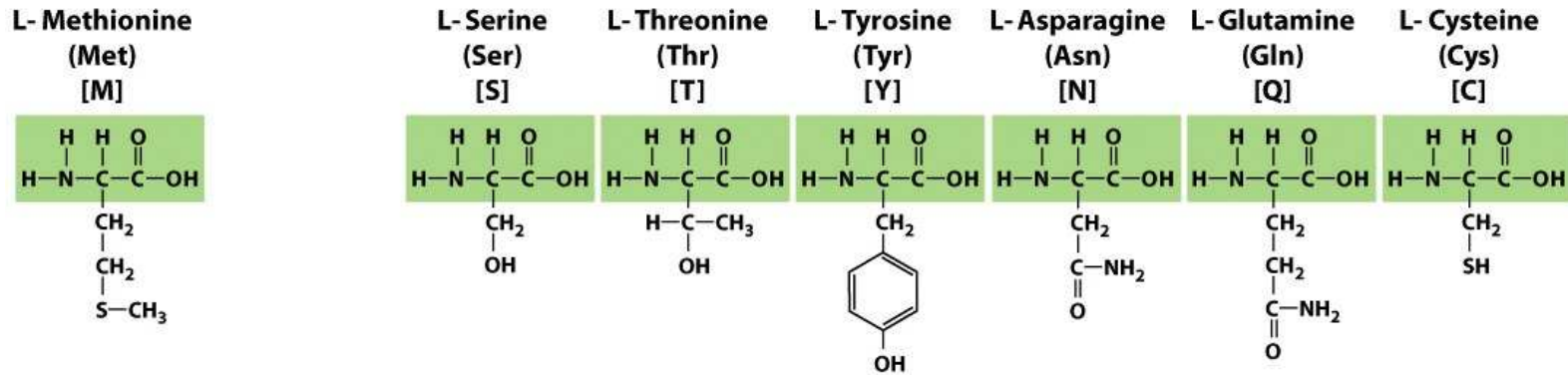
4 typy:

- hydrofóbní (nepolární)
- hydrofilní (polární)
- kyselé (negativně nabité)
- bazické (pozitivně nabité)

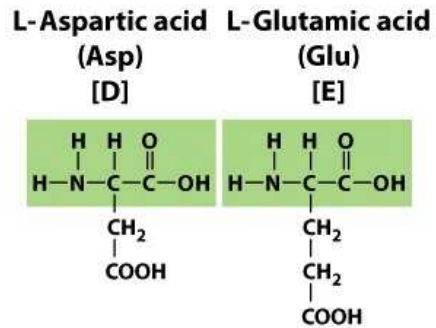
1. Hydrophobic or nonpolar side groups



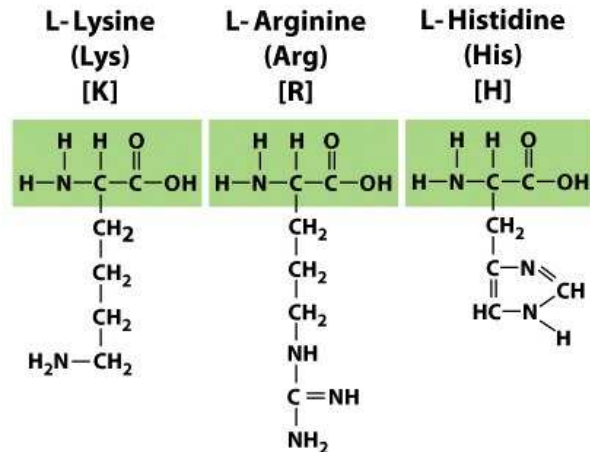
2. Hydrophilic or polar side groups



3. Acidic side groups

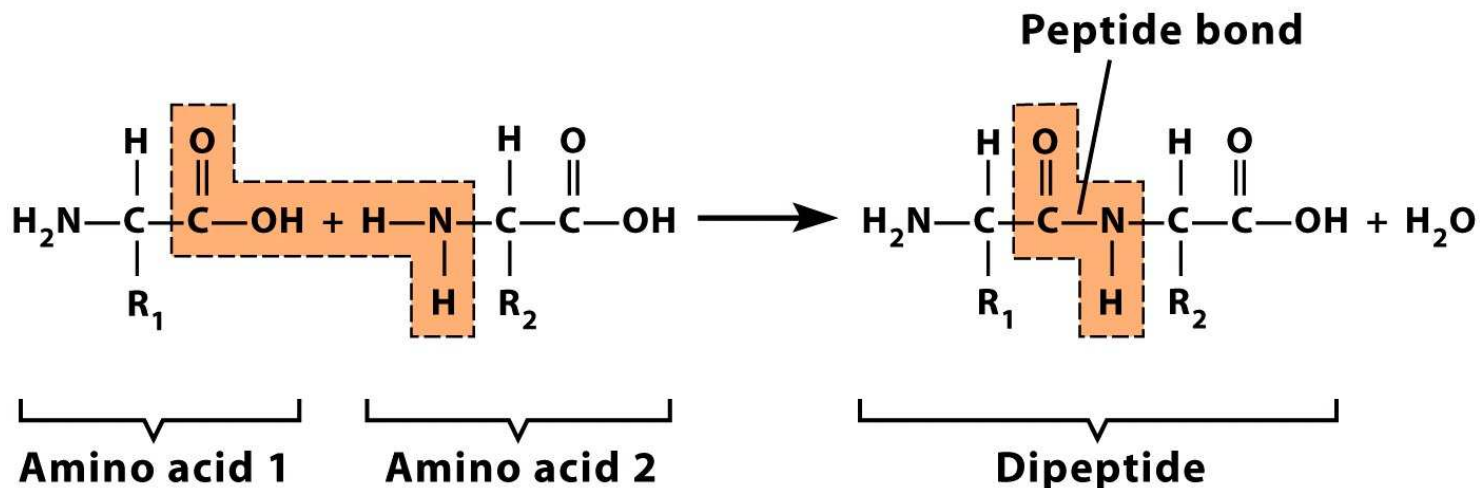


4. Basic side groups



Peptid

- látka složená ze dvou nebo více aminokyselin
- polypeptid je složen z mnoha aminokyselin (od 51 AK u inzulinu do více než 1000 AK u fibroinu hedvábí)
- počet různých kombinací 20 AK v proteinech je obrovský (u peptidu dlouhého pouhých 7 AK je to 20^7 - 1,28 miliard)
- aminokyseliny jsou v peptidech spojeny **peptidovými vazbami**
- peptidová vazba vzniká reakcí **mezi aminoskupinou** jedné AK a **karboxylovou skupinou** druhé AK při současném uvolnění molekuly vody



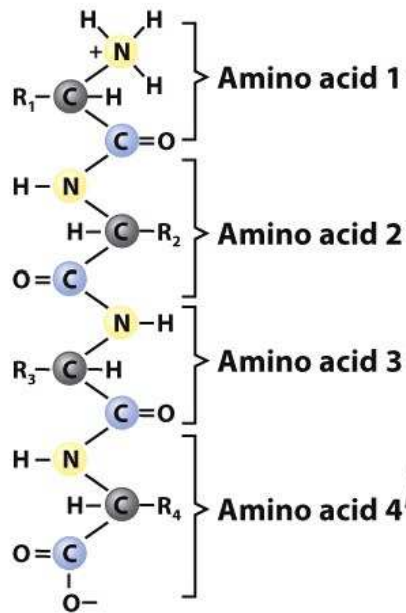
Uspořádání proteinů v prostoru

4 úrovně organizace struktury proteinů:

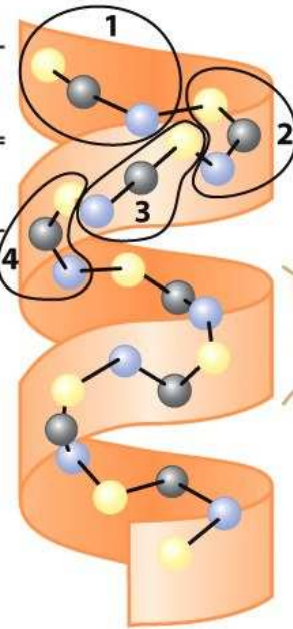
- **primární struktura:** určena sekvencí aminokyselin (kódována genem)
- **sekundární struktura:** určena prostorovými vztahy aminokyselin v částech polypeptidu
- **terciární struktura:** celkové složení polypeptidu v trojrozměrném prostoru
- **kvarterní struktura:** vyplývá ze spojení dvou nebo více polypeptidů v proteinu s více podjednotkami

Uspořádání proteinů v prostoru

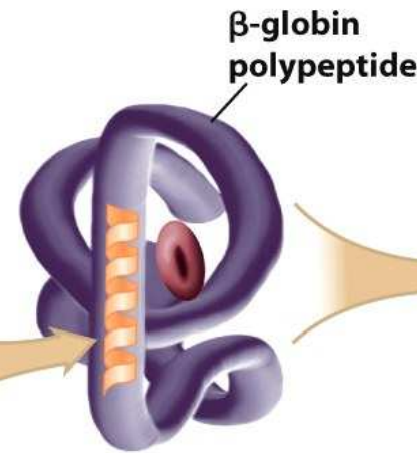
Primary structure



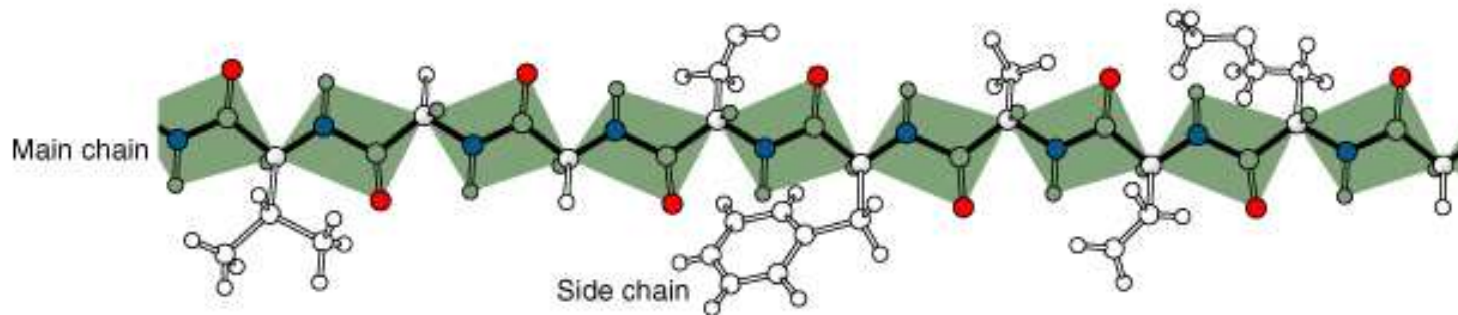
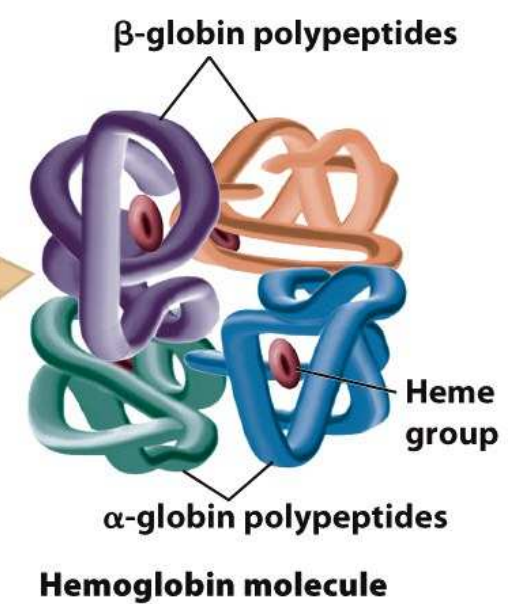
Secondary structure
(α helix)



Tertiary structure



Quaternary structure



Nejběžnější typy sekundární struktury proteinů

- **alfa-šroubovice**
- **beta-struktura**
- obě jsou stabilizovány vodíkovými vazbami mezi blízkými peptidovými vazbami
- alfa-šroubovice: AK se skládají do tvaru válce, ve kterém se vodíkové vazby tvoří mezi peptidovými vazbami vzdálenými 3-4 AK

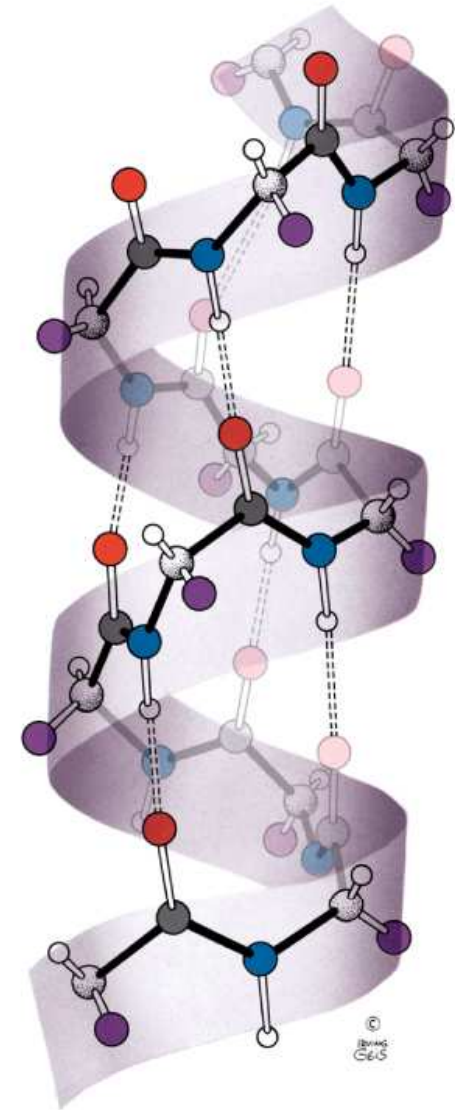


Figure 6-7. Key to Structure. The α helix.
[Figure copyrighted by © Irving Geis.]

Nejběžnější typy sekundární struktury proteinů

beta-struktura

- úseky o 5 - 10 ÅK téhož řetězce nebo více řetězců jsou položeny vedle sebe a spojeny vodíkovými vazbami mezi skupinami CO- a NH-peptidových vazeb
- skládaný list, kdy zbytky R vyčnívají kolmo k rovině listu

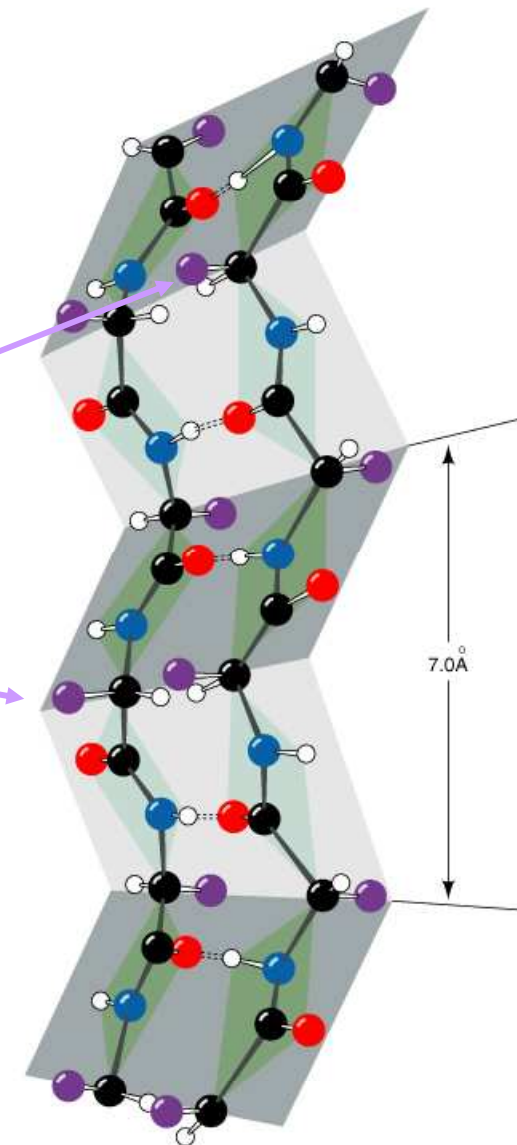
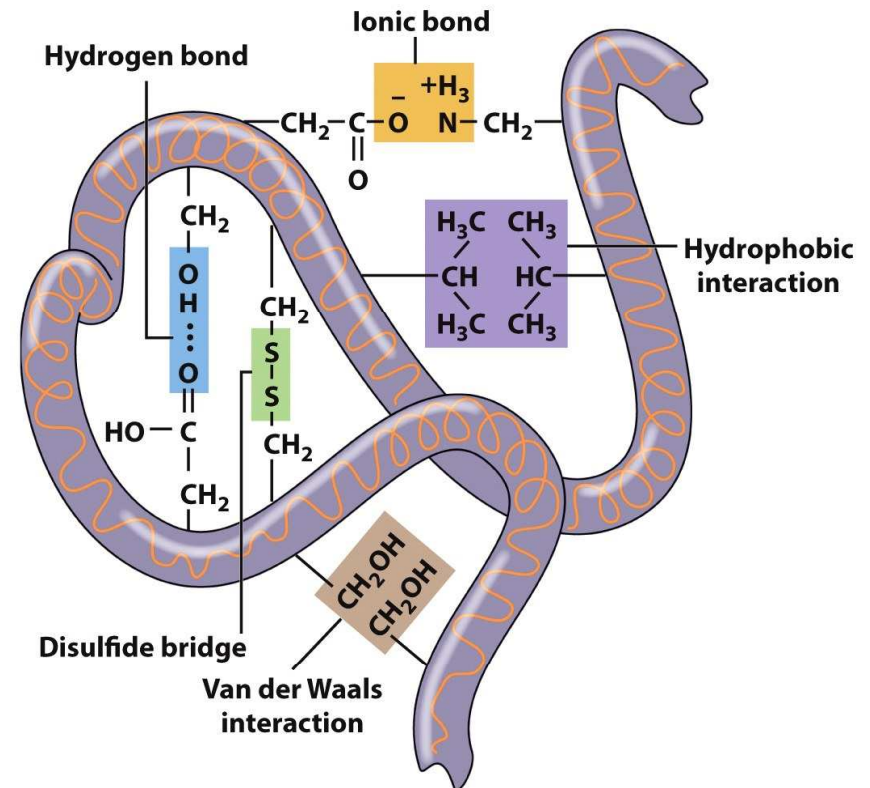


Figure 6-10. Pleated appearance of a β sheet.
[Figure copyrighted © by Irving Geis.]

Terciární struktura proteinů

- celkové složení polypeptidu (konformace)
- **hydrofilní** AK: obvykle **na povrchu** proteinů
- **hydrofobní** AK: interagují vzájemně **ve vnitřních oblastech** proteinu
- terciární strukturu stabilizují hlavně nekovalentní vazby:
 - iontové
 - vodíkové
 - hydrofobní interakce
 - Van der Waalsovy síly
- jediný typ kovalentní vazby:
 - disulfidové můstky

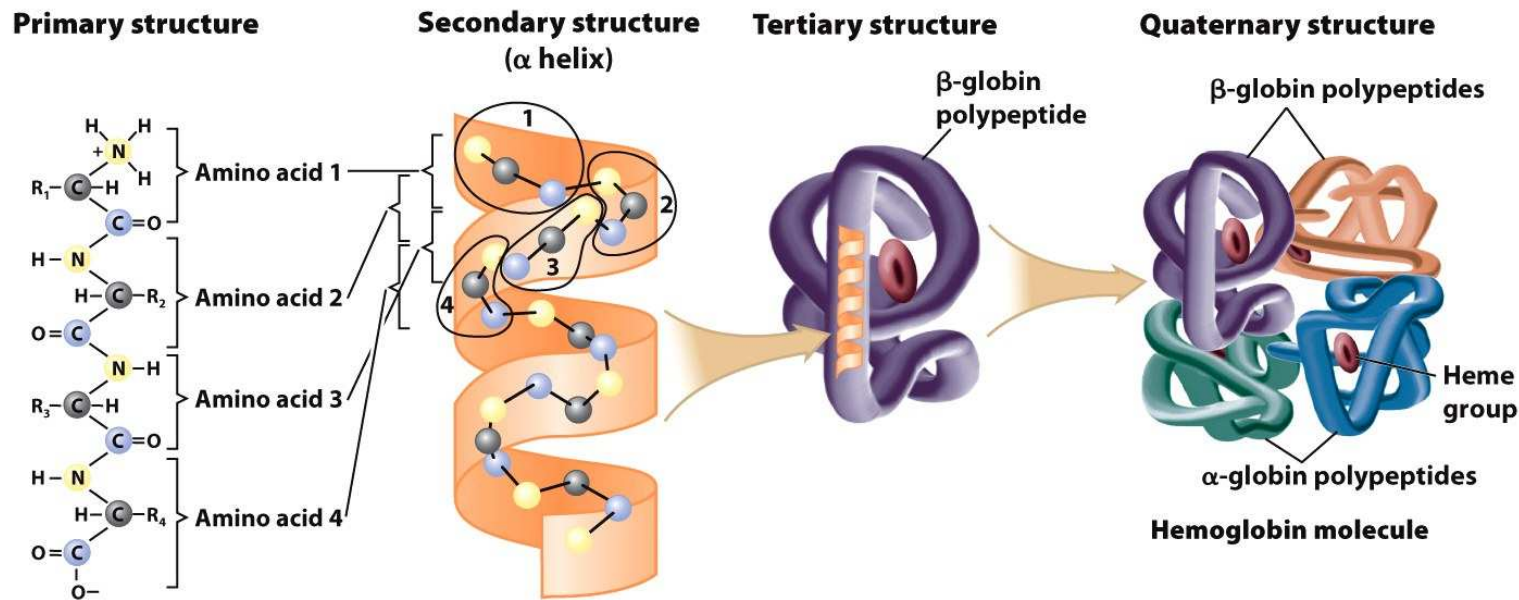


Nekovalentní vazby

- **iontové vazby**: mezi postranními řetězci AK s opačným nábojem
- **vodíkové vazby**: mezi elektronegativními atomy (které mají částečný negativní náboj) a atomy vodíku (jsou elektropozitivní, protože jsou vázány k jiným elektronegativním atomům)
- **hydrofobní interakce**: spojení mezi nepolárními skupinami, když jsou vystaveny vodnému prostředí
- **Van der Waalsovy interakce**: nastávají mezi atomy, které jsou v těsné vzájemné blízkosti (slabé, 1/1000 síly vazby kovalentní), důležité pro udržování konformací makromolekul

Kvartérní struktura proteinů

- týká se jen proteinů složených z více než jednoho polypeptidu (např. hemoglobin)



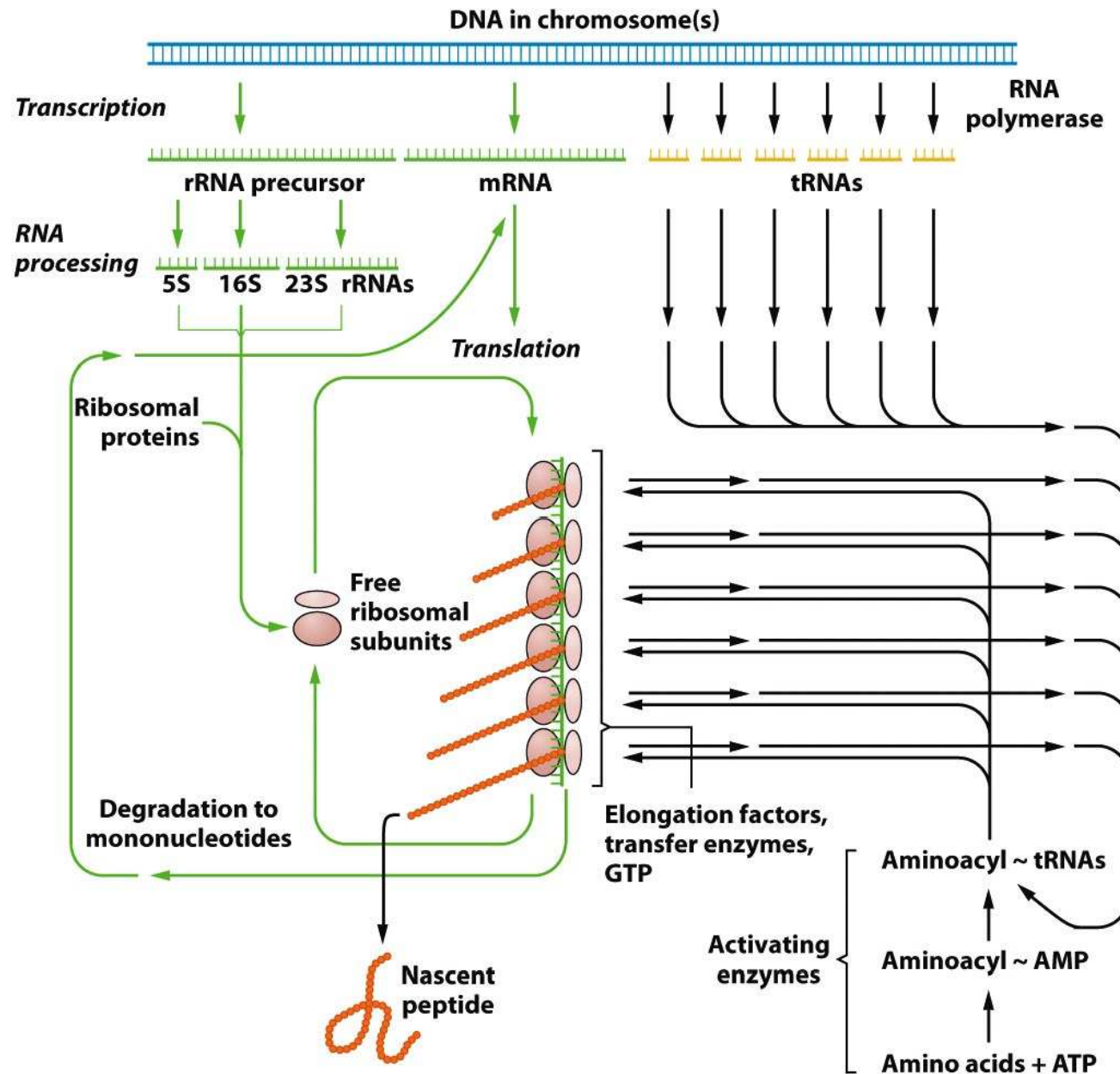
Take home message

- většina genů realizuje svou funkci (vliv na fenotyp organismu) prostřednictvím proteinů
- proteiny jsou makromolekuly složené z polypeptidů
- každý polypeptid je polymer složený z různých aminokyselin
- aminokyselinová sekvence každého polypeptidu je určena nukleotidovou sekvencí genu
- funkční diverzita proteinů je z velké míry důsledkem je složitých trojrozměrných struktur, které proteiny zaujímají

Principy translace

- genetická informace se z mRNA překládá do sekvence aminokyselin v polypeptidu pomocí genetického kódu
- do procesu translace je zapojeno:
 - více než 50 proteinů
 - mRNA
 - 3 až 5 typů rRNA v ribozomu
 - alespoň 20 enzymů pro aktivaci aminokyselin (**aminoacyl-tRNA syntetázy**)
 - 40 až 60 různých tRNA
 - řada rozpustných proteinů zapojených do iniciace, elongace a terminace translace
- translační systém představuje dominantní část metabolického aparátu každé buňky

Celkový přehled proteosyntézy



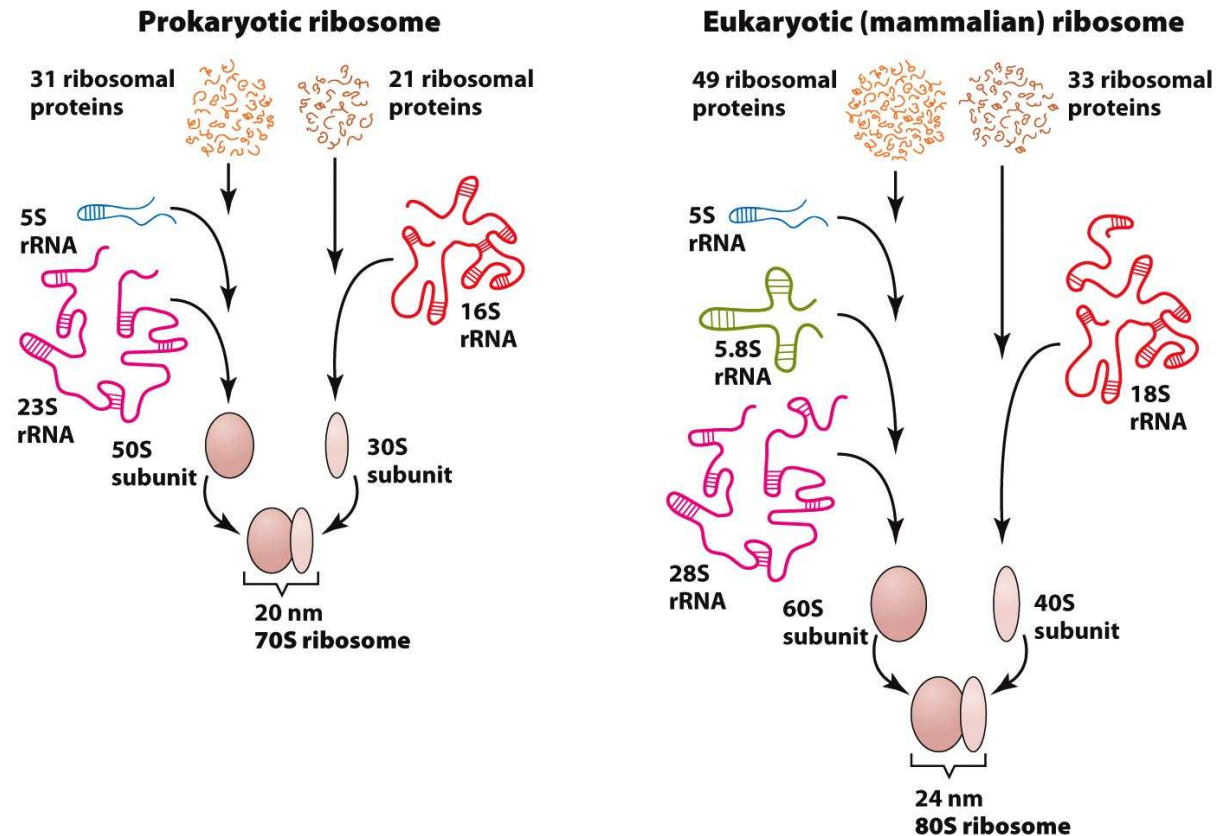
Genetický kód

- systém, podle kterého se určuje přiřazení specifické AK do polypeptidového řetězce podle nukleotidové sekvence mRNA
- každá AK je určena jedním nebo několika **kodony** v mRNA
- každý kodon obsahuje tři nukleotidy (**triplety**)
- ze 64 možných tripletů: 61 určuje aminokyseliny + 3 určují terminaci translace
- kodony v mRNA jsou rozeznávány (a dočasně vázány na základě párování bází) komplementárními sekvencemi v tRNA (**antikodony**), které nesou specifické aminokyseliny

Ribozomy

- místa syntézy proteinů, kde jsou soustředěny potřebné nástroje pro tuto funkci
- **nespecifické** (dokážou syntetizovat jakýkoliv peptid kódovaný příslušnou mRNA, i z jiných buněk či organismů)
- molekula mRNA může být současně překládána několika ribozomy: tvorba **polyribosomů** (polyzomů)
- v buňce *E. coli* je cca 200 000 ribosomů (tj. 25% sušiny buňky)
- všechny molekuly zapojené do proteosyntézy dohromady tvoří 1/3 sušiny buněk, vysoká energetická náročnost, význam pro život

Ribozomy



- obsahují proteiny a RNA v poměru přibližně 1:1
- skládají se ze dvou podjednotek: velké a malé
- každá podjednotka obsahuje velkou složenou molekulu RNA, na které se sestavují ribozomální proteiny
- velikosti ribozomů se často vyjadřují podle rychlosti sedimentace (Svedbergovy jednotky "S")

Ribozomy prokaryot a eukaryot

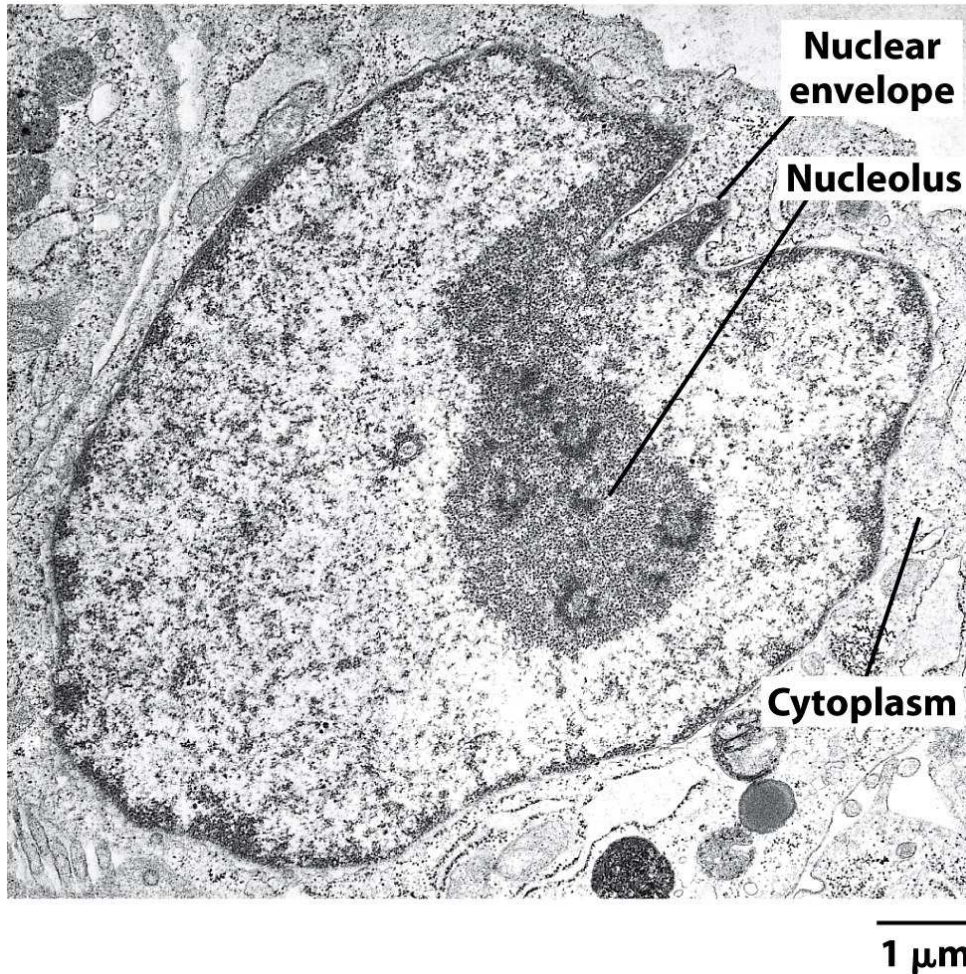
Prokaryota:

- velikost **70S** (20 x 25 nm)
- malá podjednotka **30S**: rRNA 16S + 21 polypeptidů
- velká podjednotka **50S**: rRNA 5S a 23S + 31 polypeptidů

Eukaryota:

- obvyklá velikost **80S** (určitá mezidruhová variabilita)
- v mitochondriích a chloroplastech 60S
- malá podjednotka **40S**: rRNA 18S + 33 polypeptidů
- velká podjednotka **60S**: rRNA 5S, 5.8S, 28S + 49 polypeptidů

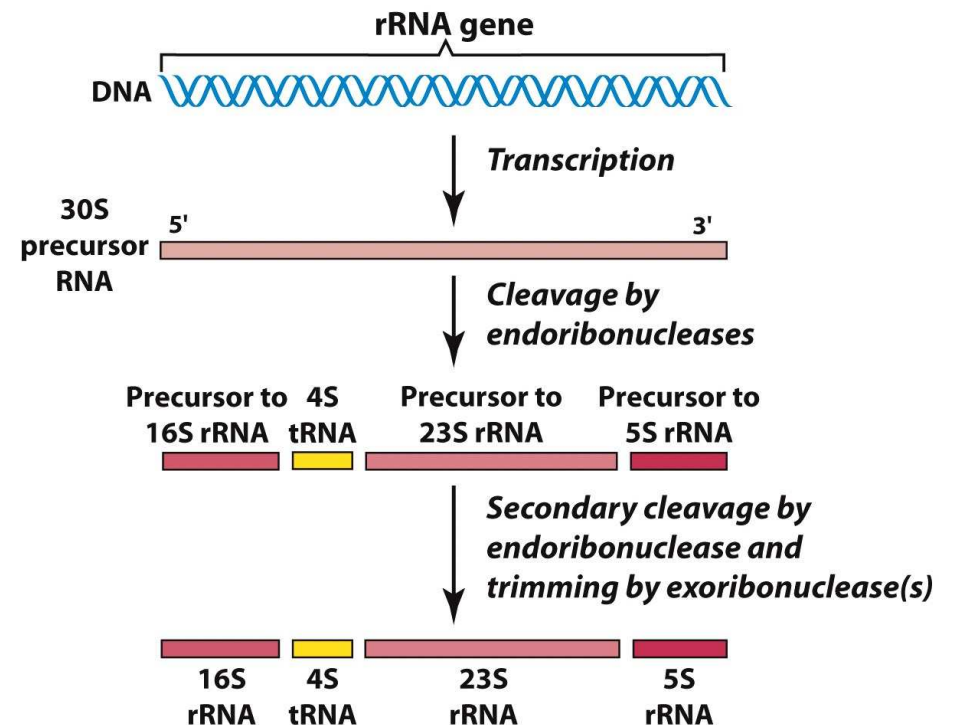
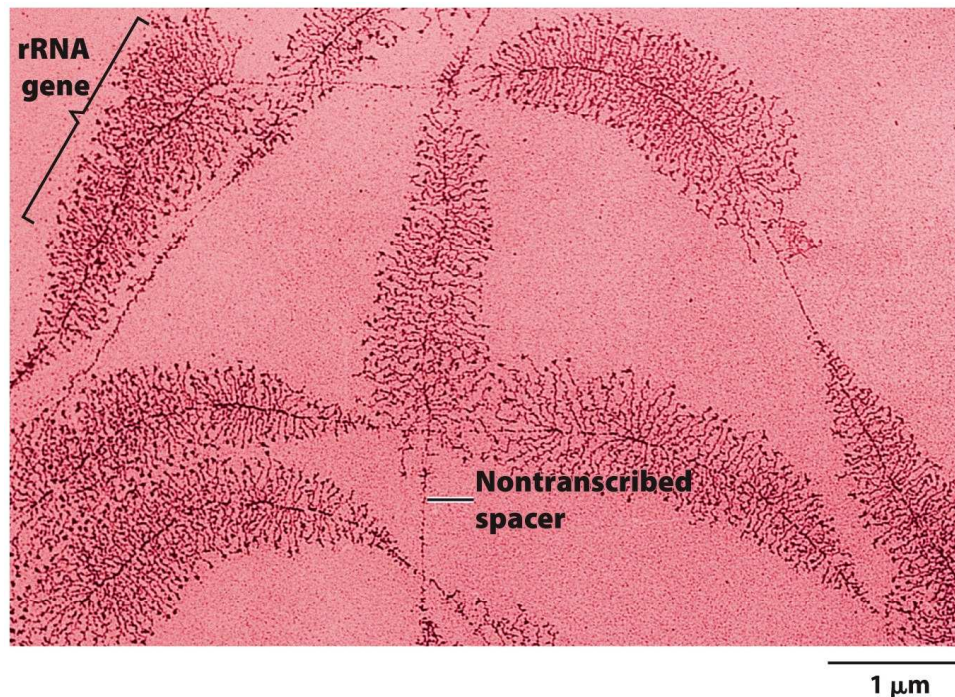
Sestavování ribozomů



- rRNA vznikají transkripcí DNA
- u eukaryot rRNA vzniká v jadérku (oblasti specializované na tvorbu ribozomů)
- transkripce RNA polymerázou I

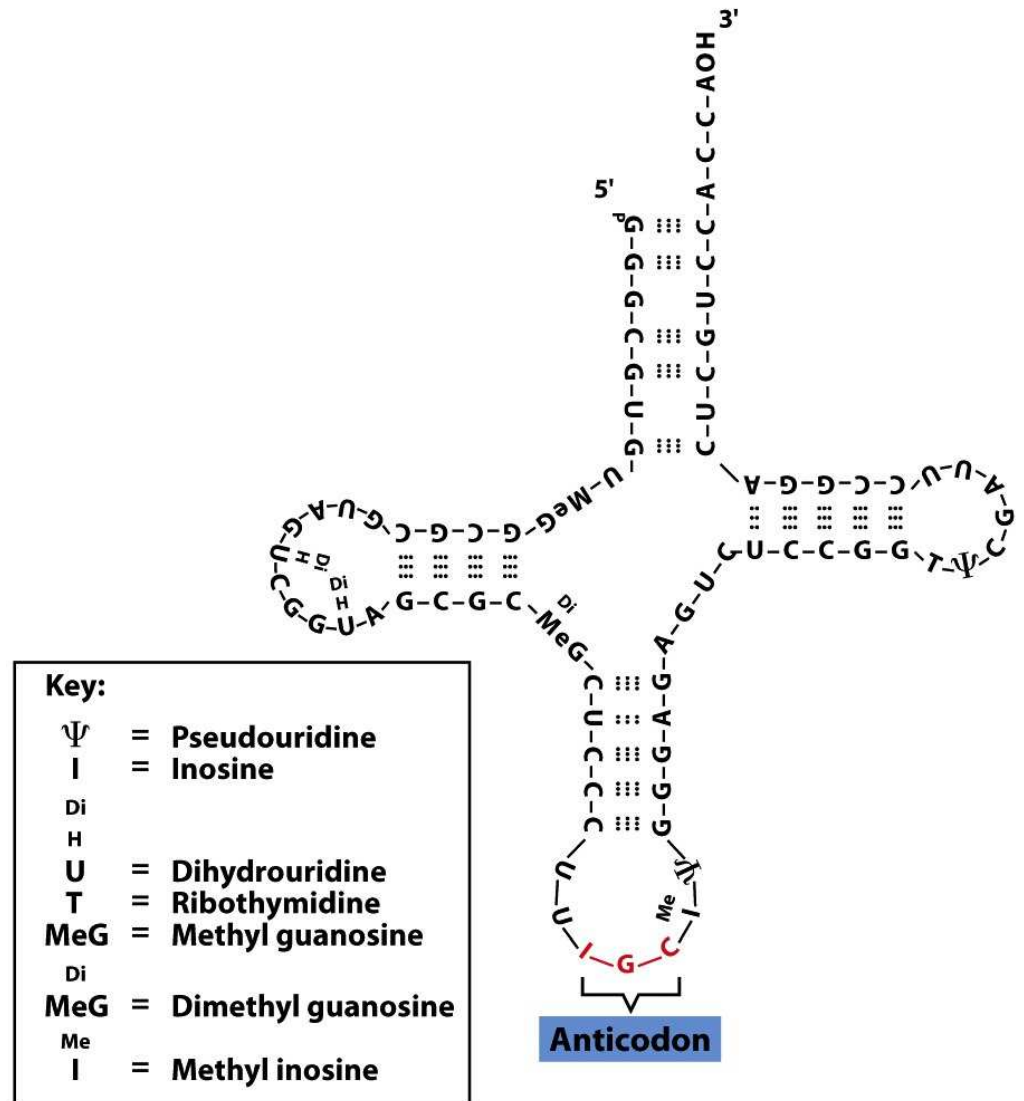
Geny pro rRNA

- uspořádaný za sebou v mnoha kopiích a odděleny mezigenovými oblastmi (mezerníky)
- transkripce těchto genů je velmi účinná
- transkripcí genů pro rRNA obvykle vznikají delší prekurzory, které se posttranskripčním endonukleolytickým štěpením upravují do konečné podoby



tRNA

- malé RNA (4S, 70-95 nukleotidů)
- fungují jako **adaptéry** mezi aminokyselinami a kodony v mRNA
- obsahují **antikodon** - sekvenci tří nukleotidů komplementárních ke kodonu mRNA
- k 3' konci tRNA je kovalentně připojena určitá **aminokyselina**
- v tRNA se často objevují modifikované nukleotidy



Vazba mezi aminokyselinou a tRNA

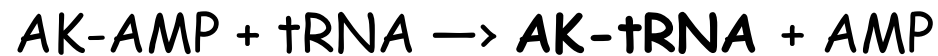
- vysokoenergetická vazba (velmi reaktivní) mezi karboxylovou skupinou aminokyseliny a 3' hydroxylovým koncem tRNA

- vazba AK (=aktivace, nabití tRNA) probíhá ve dvou krocích, které oba katalyzuje enzym **aminoacyl-tRNA syntetáza**:

1. aktivace AK energií z ATP:



2. reakce s tRNA:



- existuje alespoň jedna aminoacyl-tRNA syntetáza pro každou z 20 AK

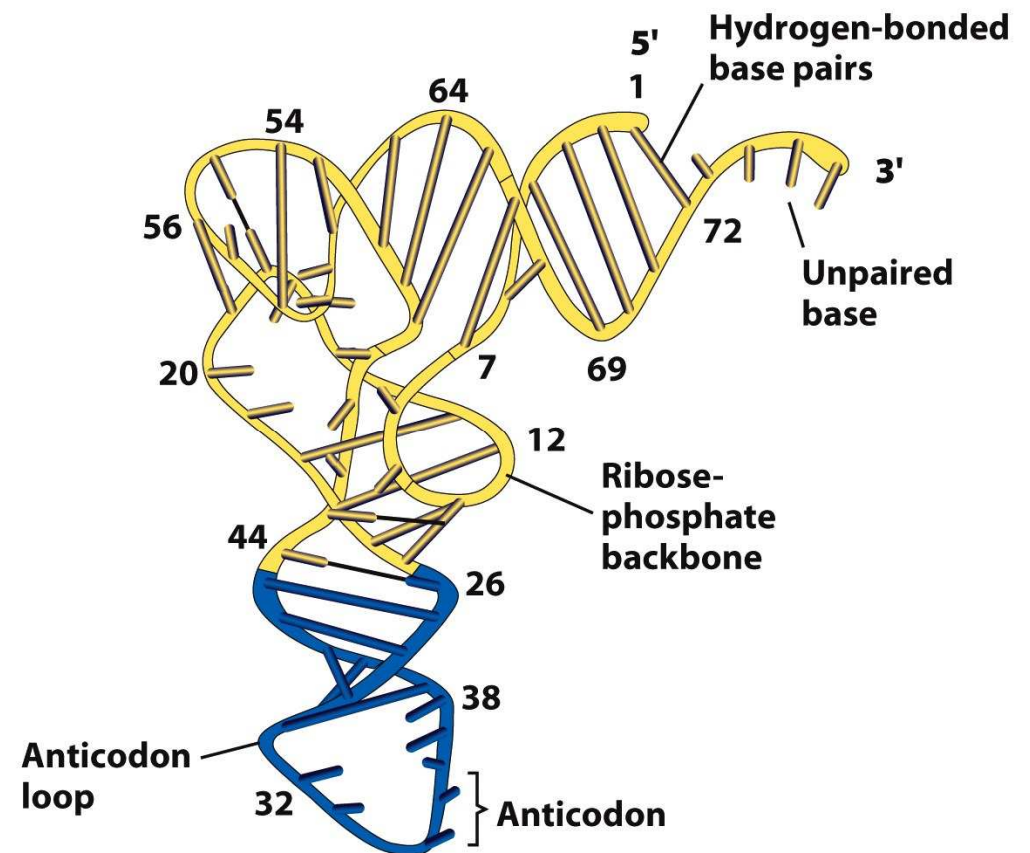
- aminoacyl-tRNA jsou vlastními substráty proteosyntézy na ribozomech (správná **kombinace AK a kodonu**, **přístupnost antikodonu** pro reakci s kodonem, **prezentace AK** v takové prostorové konformaci, která umožňuje tvorbu peptidových vazeb)

Geny pro tRNA

- transkribovány ve formě větších prekurzorů (podobně jako rRNA)
- běžné jsou posttranskripční úpravy (štěpení, metylace, apod.)
- v tRNA se běžně vyskytují neobvyklé nukleotidy (inozin, pseudouridin, dihydrouridin, metylguanosen, apod.) - vznikají posttranskripčními úpravami čtyř běžných nukleotidů, katalyzováno enzymaticky

Struktura tRNA

- ovlivněna vodíkovými vazbami mezi komplementárními nukleotidy uvnitř téže molekuly
- antikodon se nachází uvnitř nespárované smyčky ve střední části molekuly



Specifita tRNA

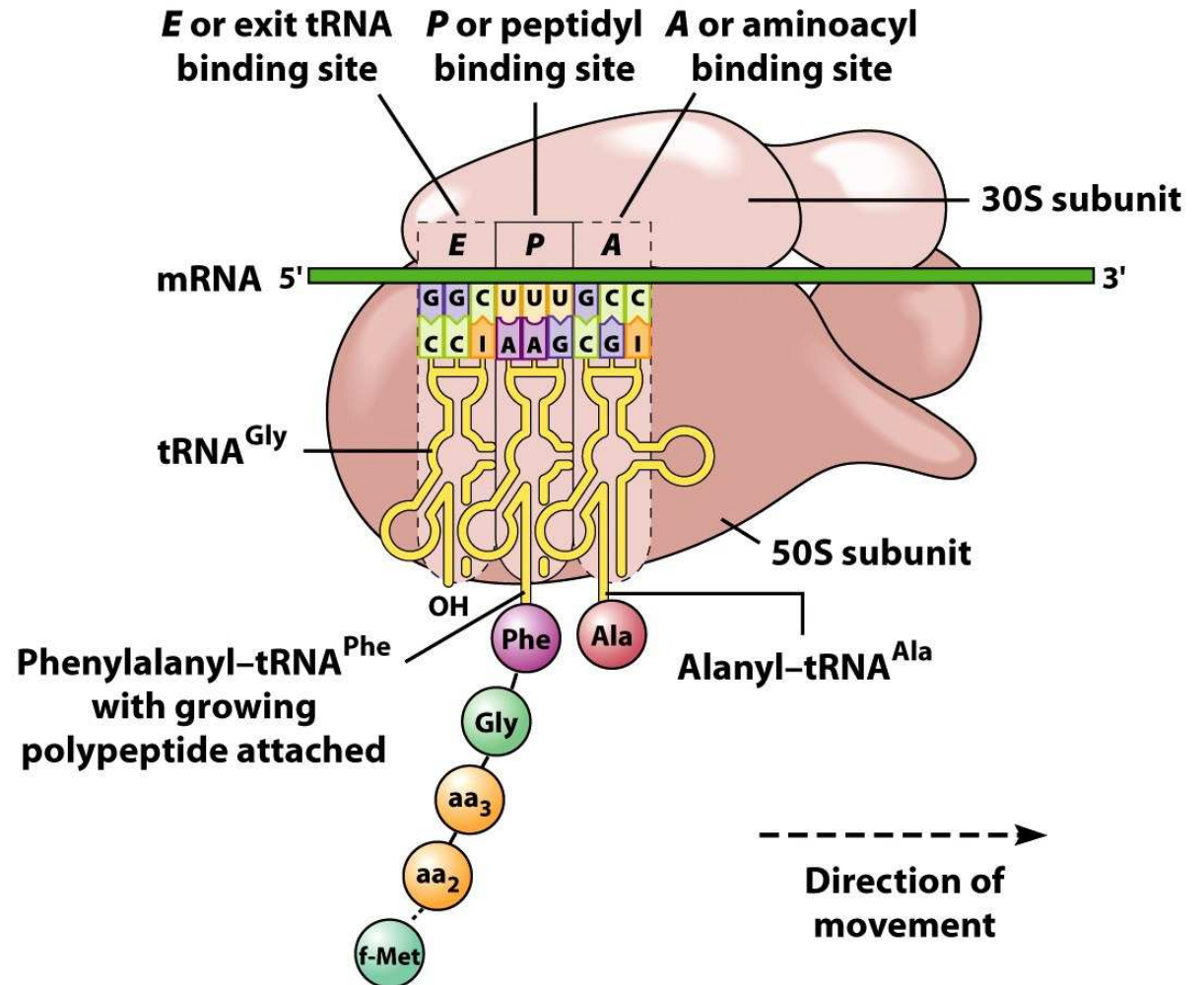
- musí mít **správnou sekvenci antikodonu** (aby reagovala na správný kodon)
- musí být rozeznána správnou **aminoacyl-tRNA syntetázou** (aby nesla správnou AK)
- musí se vázat na **správná místa v ribozomech** (aby mohla realizovat svou adaptérovou funkci)

Vazba tRNA k ribozomům

na každém ribozomu jsou tři vazebná místa:

- **A (aminoacylové)**: váže aminoacyl-tRNA
- **P (peptidylové)**: váže tRNA, ke které je připojen rostoucí polypeptidový řetězec
- **E (místo exitu)**: váže tRNA zbavenou AK před opuštěním ribozomu

70S ribosome diagram



Vazba tRNA k ribozomům

- při pohybu ribozomu podél mRNA se ve vazebných místech objevují nové **kodony, které určují specifitu** vazby tRNA
- samotná vazebná místa na ribozomu (za nepřítomnosti mRNA) mohou vázat jakoukoliv aminoacyl-tRNA

Průběh translace

3 fáze: iniciace, elongace, terminace

1. Iniciace translace

zahrnuje všechny děje, které předcházejí tvorbě peptidové vazby mezi prvními dvěma AK nového polypeptidu

Zapojené molekuly u prokaryot:

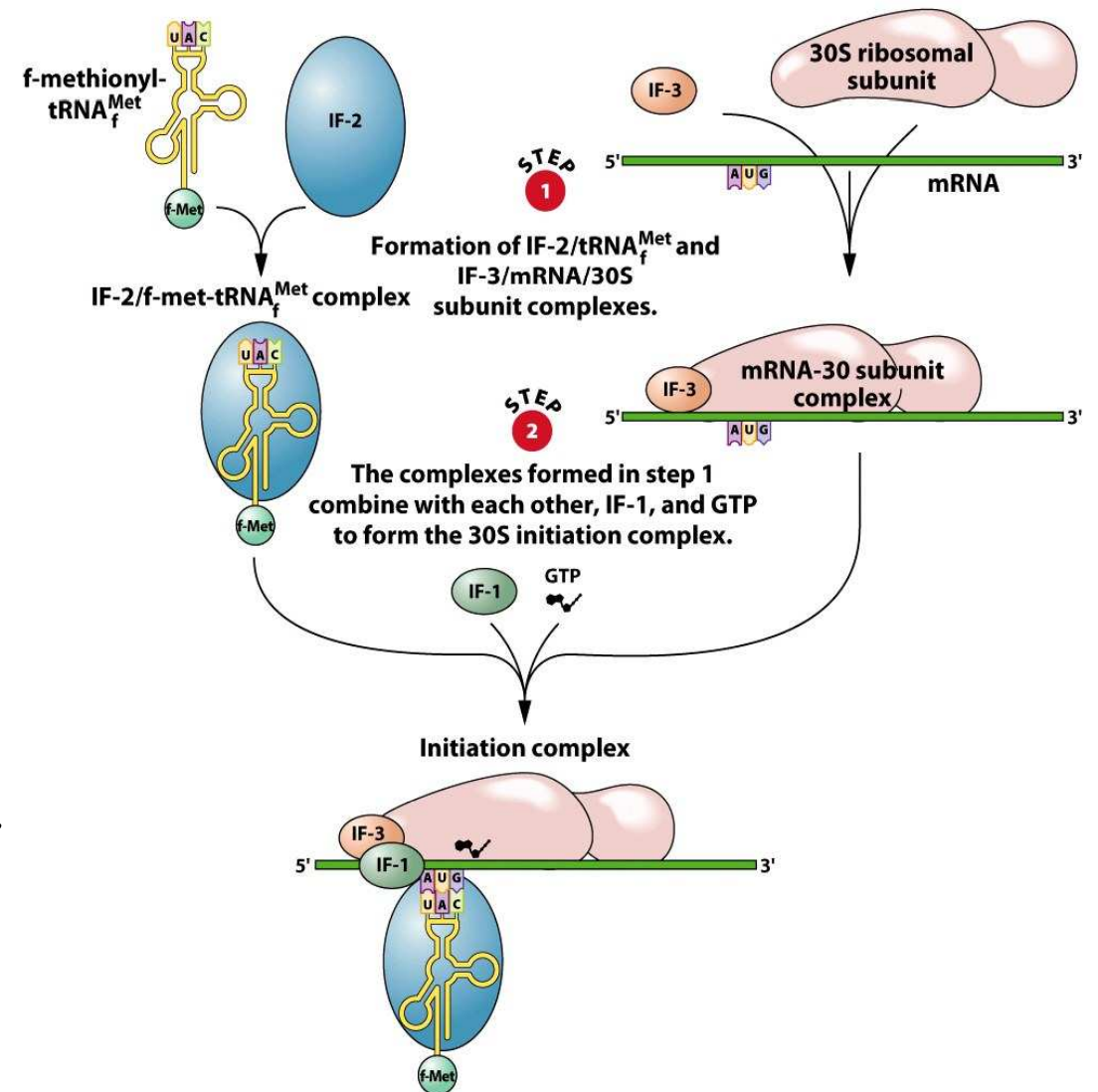
- podjednotka 30S ribozomu
- iniciátorová tRNA
- mRNA
- tři rozpustné iniciační faktory: IF-1, IF-2, IF-3
- jedna molekula GTP

Iniciace translace u prokaryot

• ribozomy se po dokončení syntézy každého polypeptidu rozpadají na své podjednotky 30S a 50S

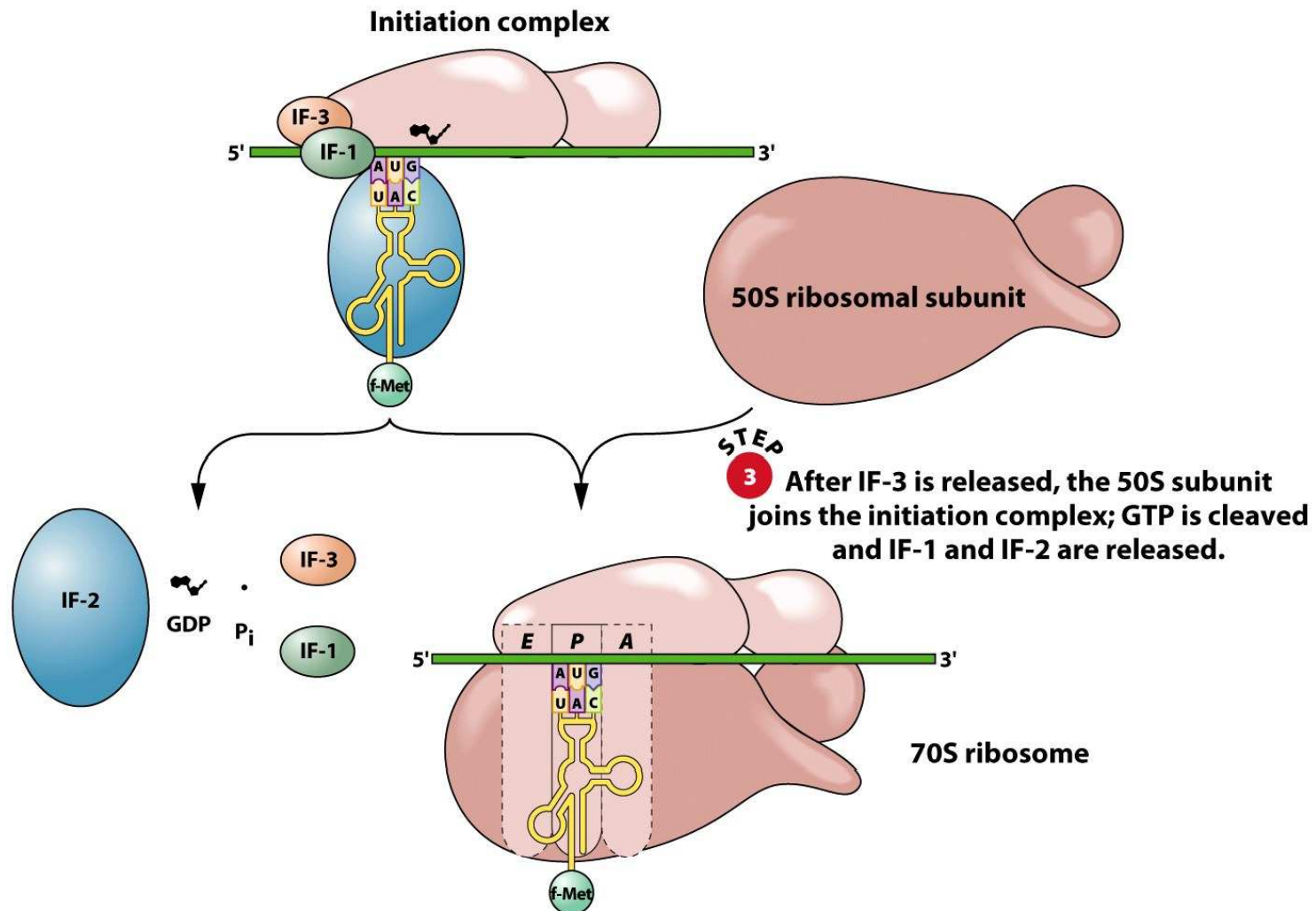
Tvorba 2 komplexů:

- **podjednotka 30S + mRNA + IF-3**
- **iniciační metionyl-tRNA_f^{Met} + IF-2**
 - nese metionin, jehož aminoskupina je blokována formylovou skupinou
 - nese antikodon pro iniciační kodon AUG
- oba komplexy se spojují, připojují se IF-1 a GTP: vzniká **30S iniciační komplex**



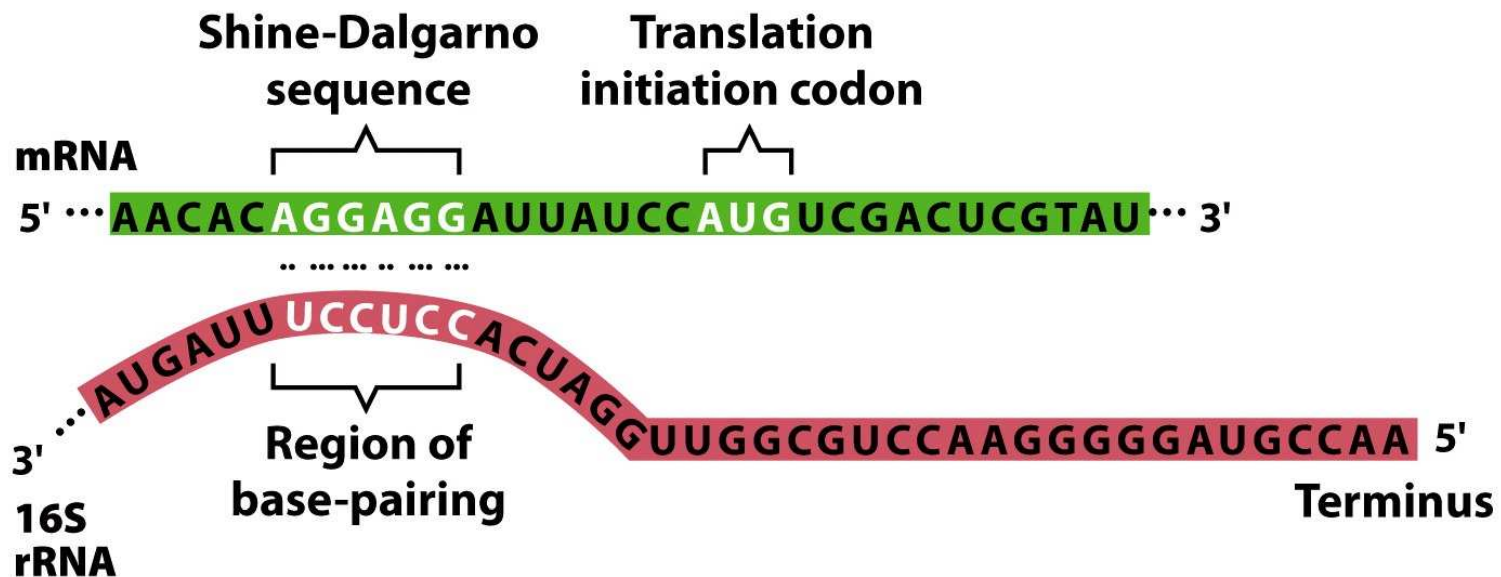
Iniciace translace

- po uvolnění IF-3 se k iniciačnímu komplexu připojuje podjednotka 50S
- vzniká ribozom 70S, metionyl-tRNA_f^{Met} se připojuje přímo do místa P
- štěpí se GTP a uvolňují se IF-1 a IF-2



Shine-Dalgarnova sekvence

- umístěna 7 nukleotidů proti směru translace od iniciačního kodonu AUG
- konzervativní sekvence obsahující purinové nukleotidy
- je komplementární sekvenci blízko 3' konce 16S rRNA
- párování bází mezi SD sekvencí a 16S rRNA je podmínkou translace u prokaryot



Iniciace translace u eukaryot

- složitější než u prokaryot
- zapojeno několik rozpustných **iniciačních faktorů**
- aminoskupina metioninu na iniciátorové tRNA **není formylována**
- iniciační komplex se tvoří **na 5' konci mRNA** (ne v oblasti Shine-Dalgarno/AUG)
- iniciační komplex zkoumá mRNA od 5' konce a hledá iniciační kodon AUG
- translace začíná na prvním AUG od 5' konce

Iniciace translace u eukaryot

- **protein CBP** (cap-binding protein) se váže 7-metylguanozinovou čepičku na 5' konci mRNA
- ke komplexu CBP-mRNA se vážou **iniciační faktory**
- následuje vazba malé podjednotky 40S ribozomu
- iniciační komplex se pohybuje ve směru 5' - 3' po mRNA dokud a hledá AUG
- v místě AUG: iniciační faktory opouštějí iniciační komplex, připojuje se velká podjednotka 60S
- metionyl-tRNA_i^{Met} se váže přímo do místa P

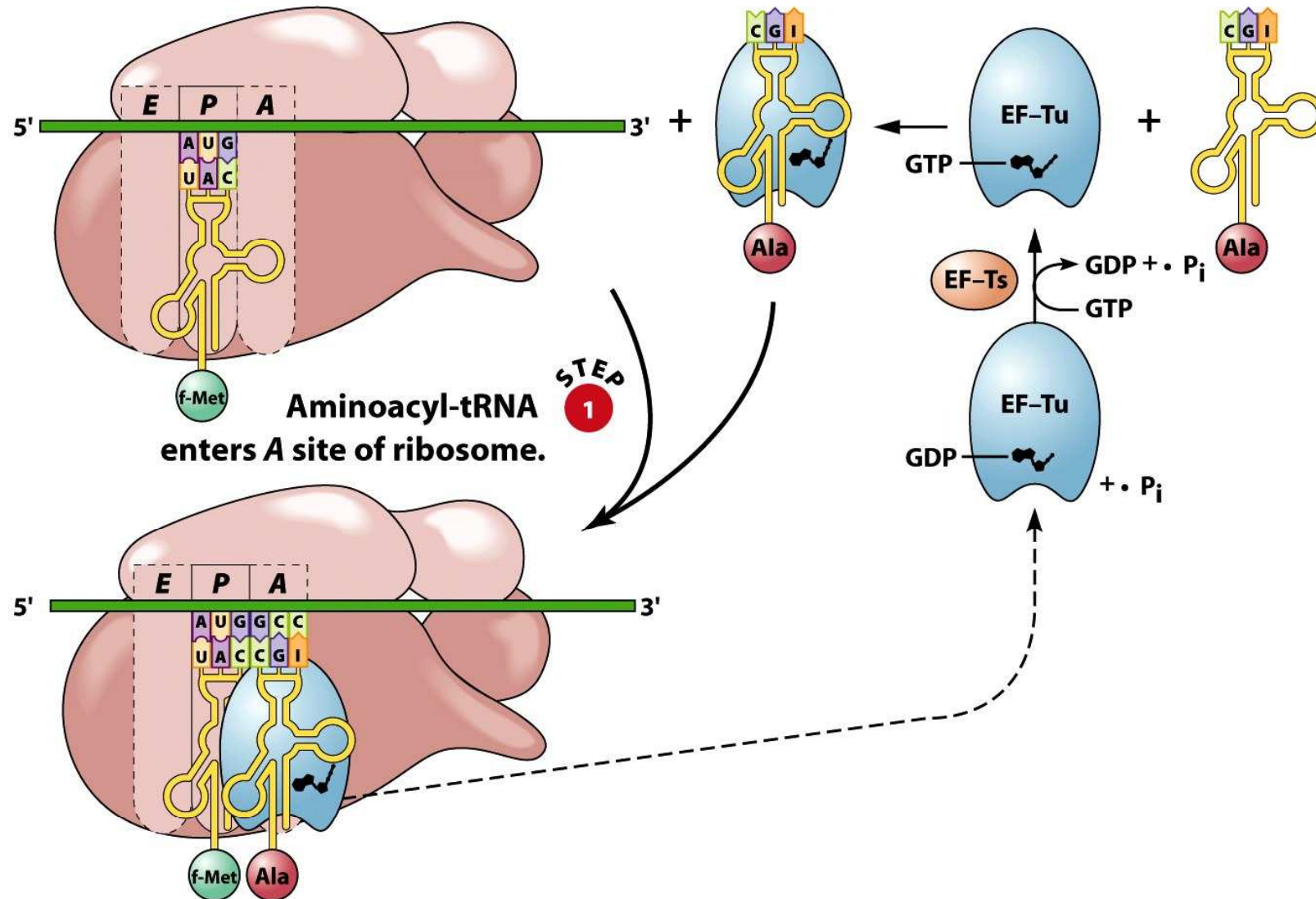
Elongace translace

- postupné připojování aminokyselin k rostoucímu polypeptidu
- probíhá obdobně u prokaryot a eukaryot

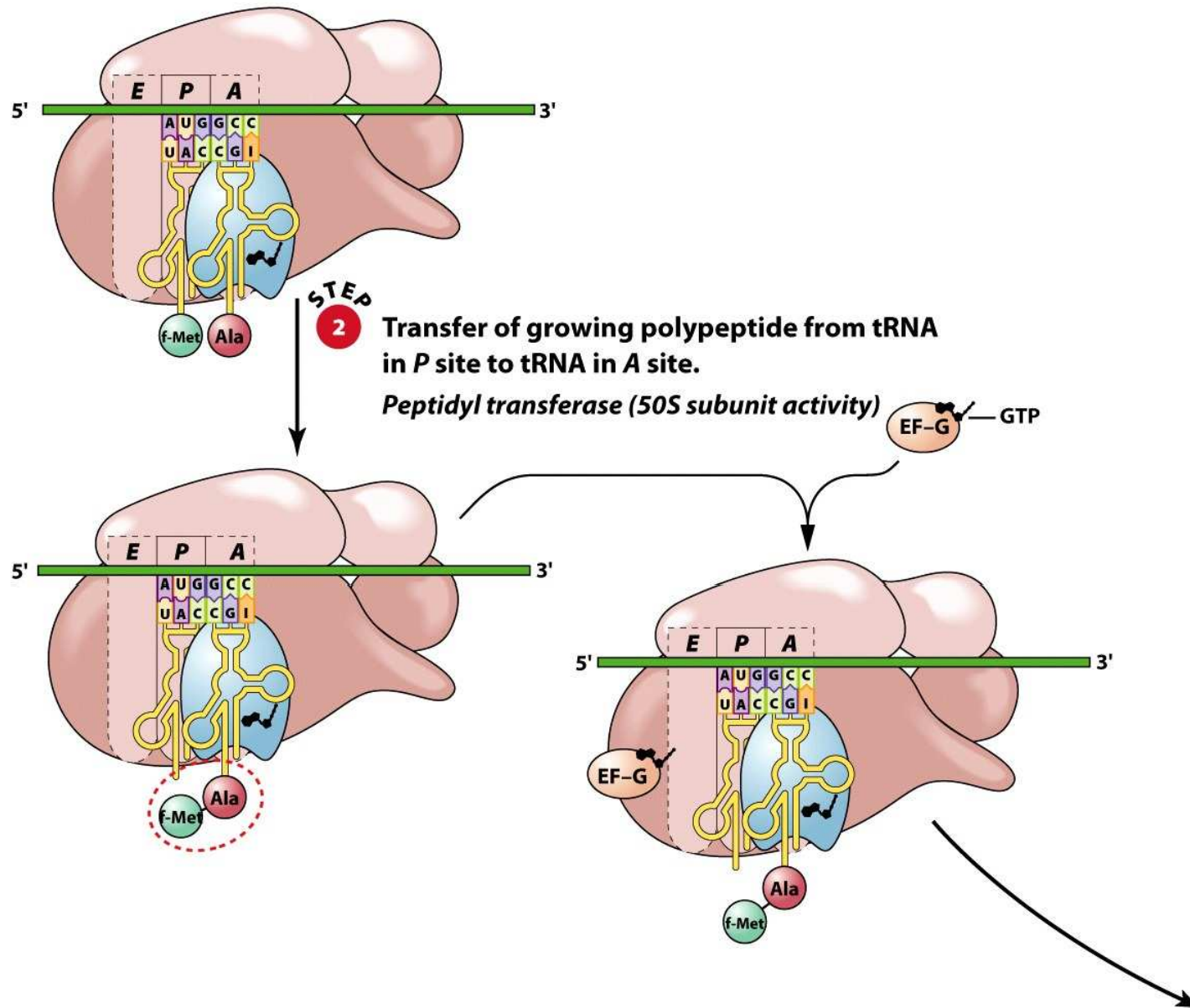
Sled událostí:

- vazba **aminoacyl-tRNA** do místa *A* ribozomu
- přenos **rostoucího řetězce** z tRNA v místě *P* na tRNA v místě *A* vytvořením nové **peptidové vazby**
- posun ribozomu po mRNA, vedoucí k umístění dalšího kodonu do místa *A*
- zároveň se vznikající polypeptid navázaný na tRNA přemístí z místa *A* do místa *P*
- "prázdná" tRNA se přemístí z místa *P* do místa *E*

- aminoacyl-tRNA se váže k místu *A*
- antikodon aminoacyl-tRNA se musí párovat s kodonem mRNA v místě *A*
- nutná přítomnost elongačního faktoru EF-Tu s molekulou GTP
- po hydrolýze GTP na GDP se EF-Tu uvolňuje

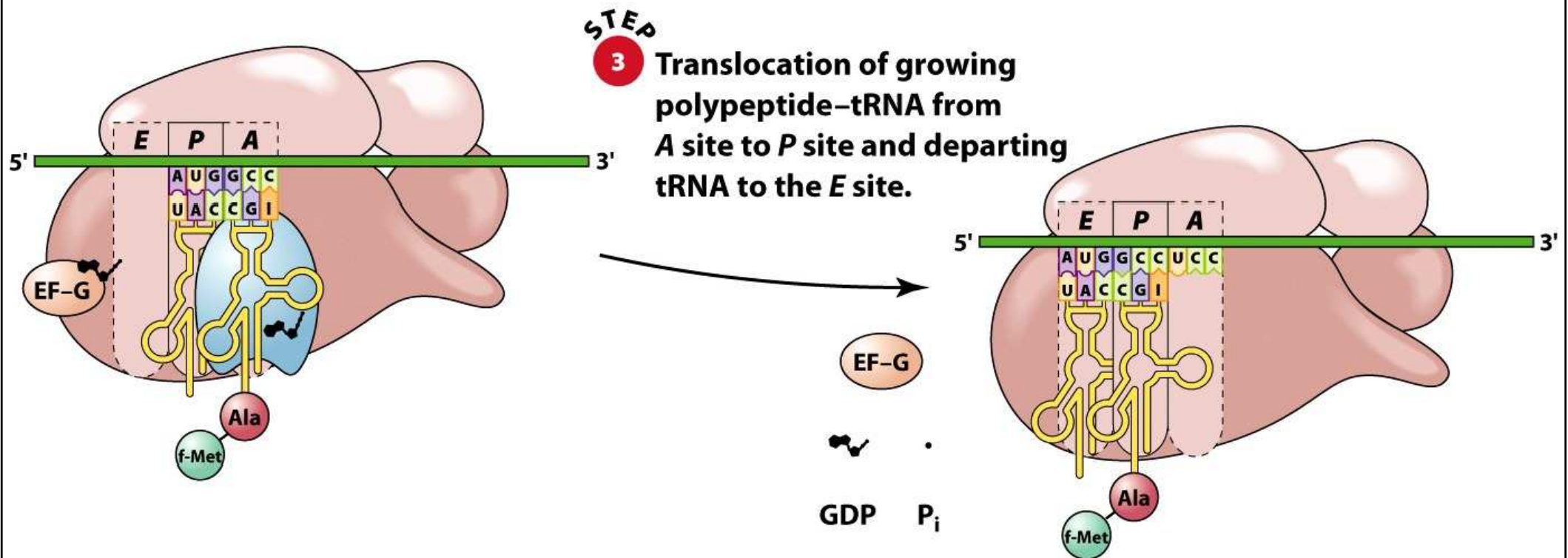


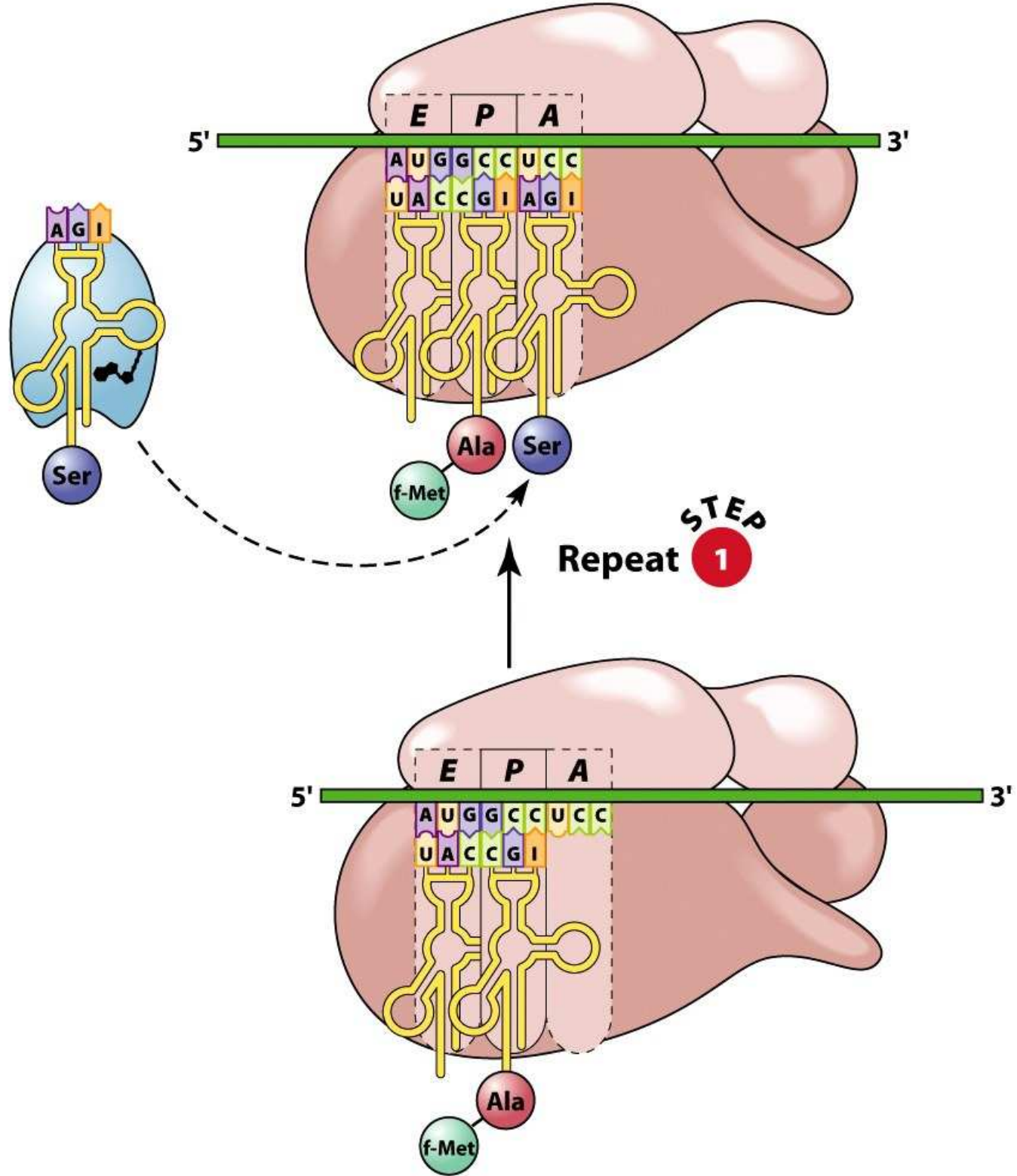
- tvorba peptidové vazby mezi aminoskupinou aminoacyl-tRNA v místě *A* a karboxylovou skupinou rostoucího polypeptidového řetězce připojeného k tRNA v místě *P* - tím se řetězec připojí k tRNA v místě *A*
- katalyzováno **peptidyltransferázou** (současná hydrolýza GTP)

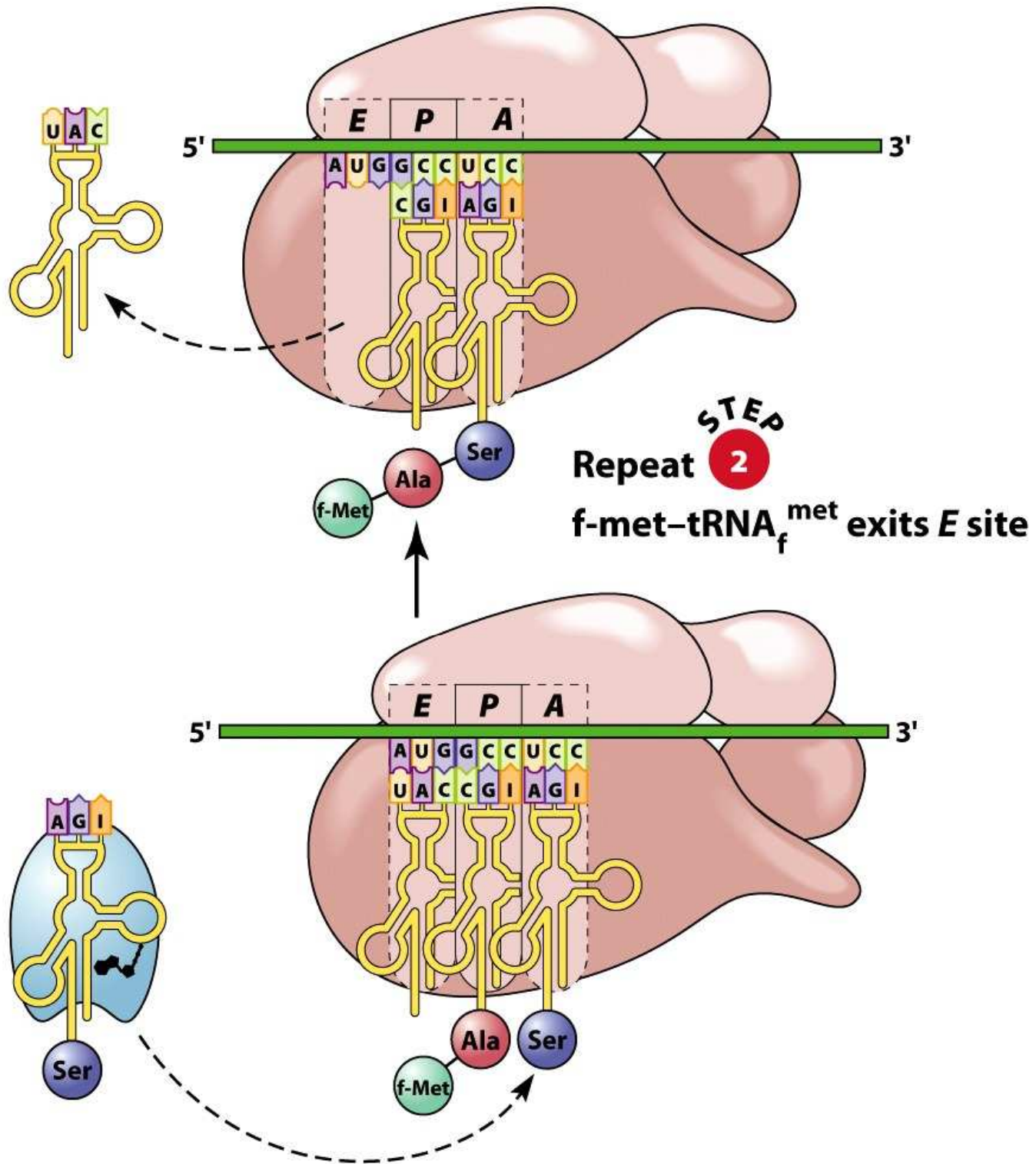


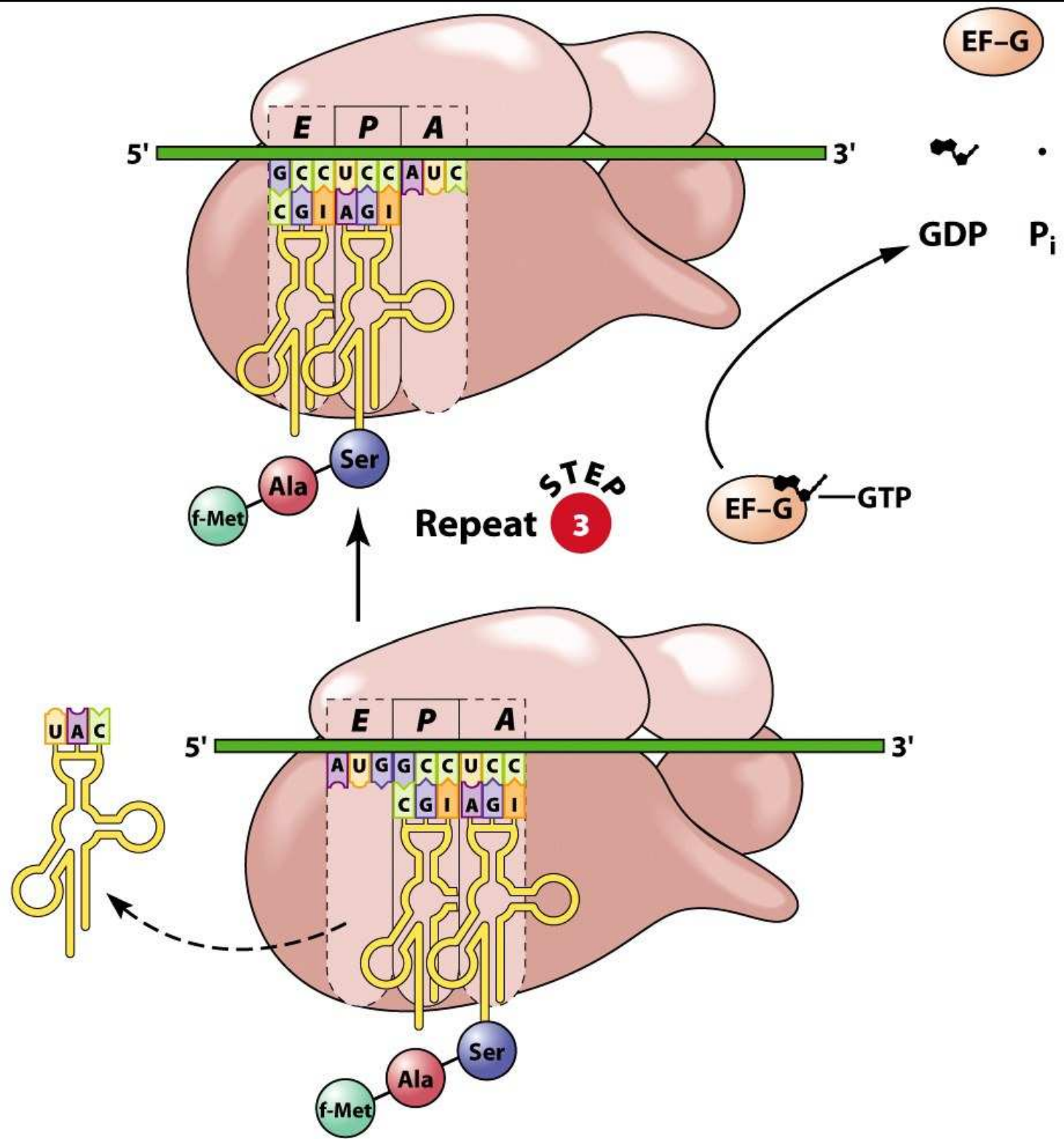
Ribozom se na mRNA posune o jeden kodon směre k 3' konci:

- peptidyl-tRNA v místě se přesunuje z místa *A* do místa *P*
- prázdná tRNA se zároveň přesunuje z místa *P* do místa *E*
- nutná přítomnost EF-G a energie hydrolýzy GTP
- místo *A* je prázdné a připraveno pro příjem další aminoacyl-tRNA





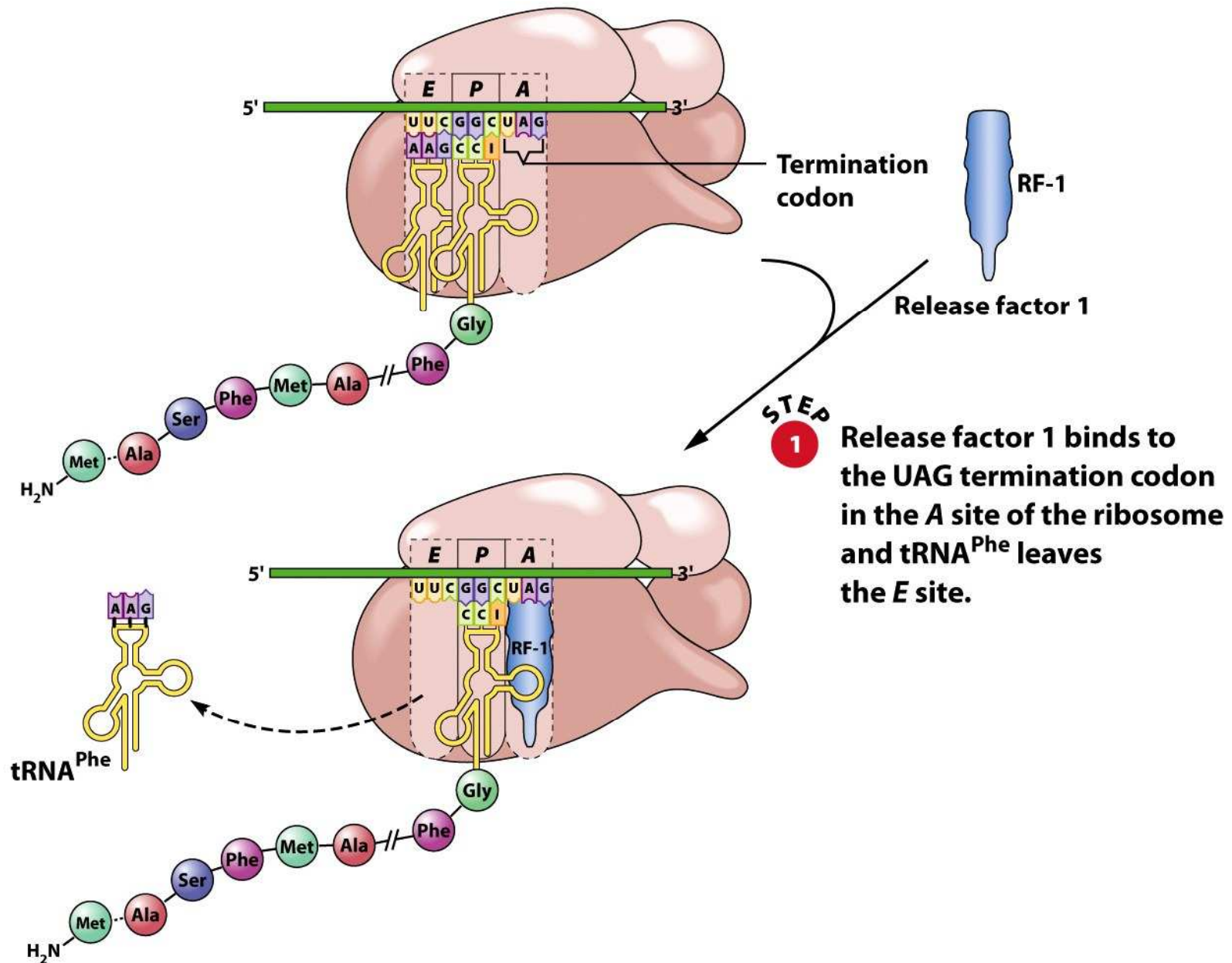




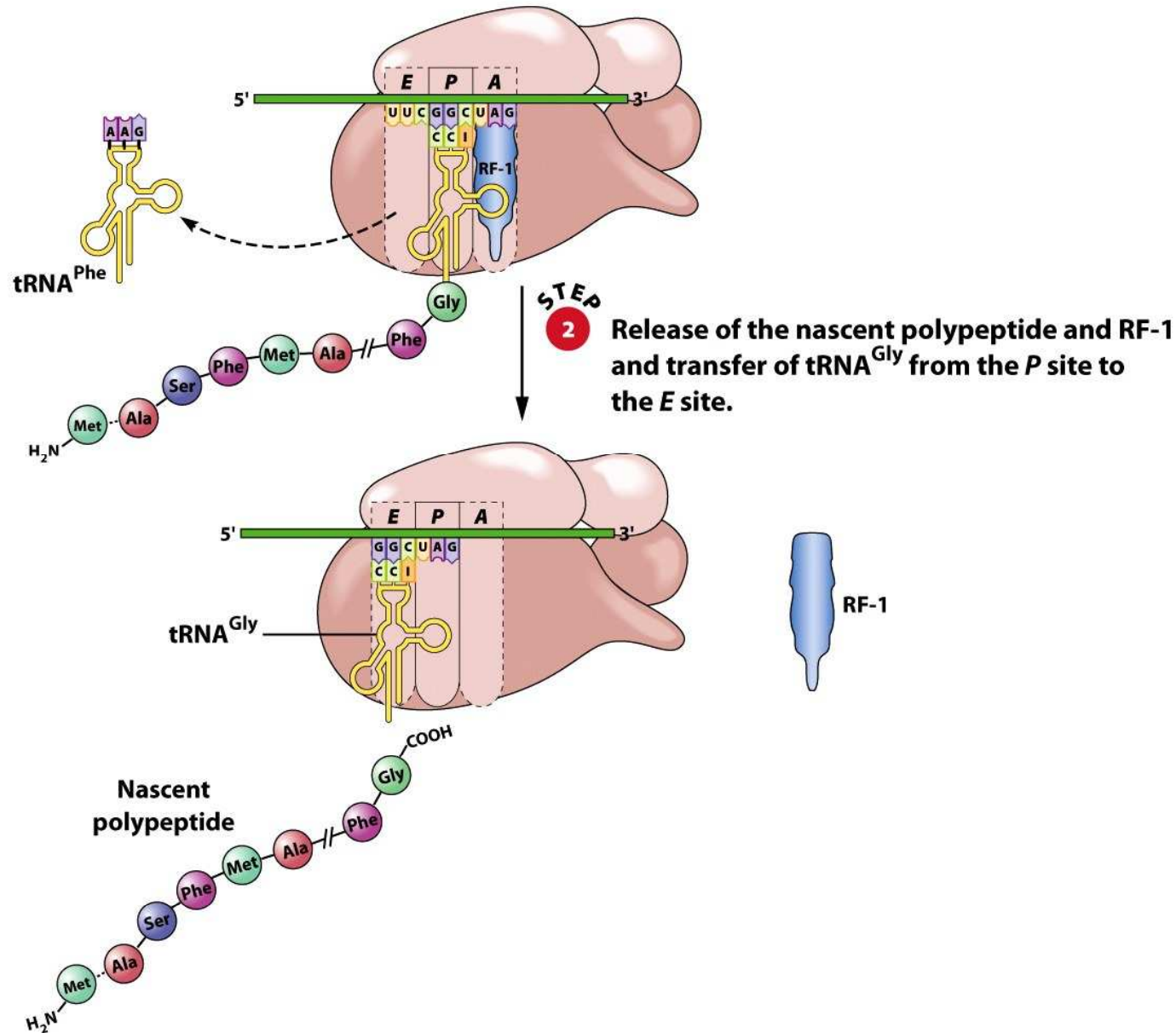
Terminace translace

- nastává v okamžiku, kdy do místa *A* vstoupí **terminační kodon (stop kodon): UAA, UAG nebo UGA**
- zároveň se do místa *A* váže **uvolňovací faktor**
- ke karboxylovému konci vzniklého polypeptidu se naváže molekula vody, což vede k terminaci translace

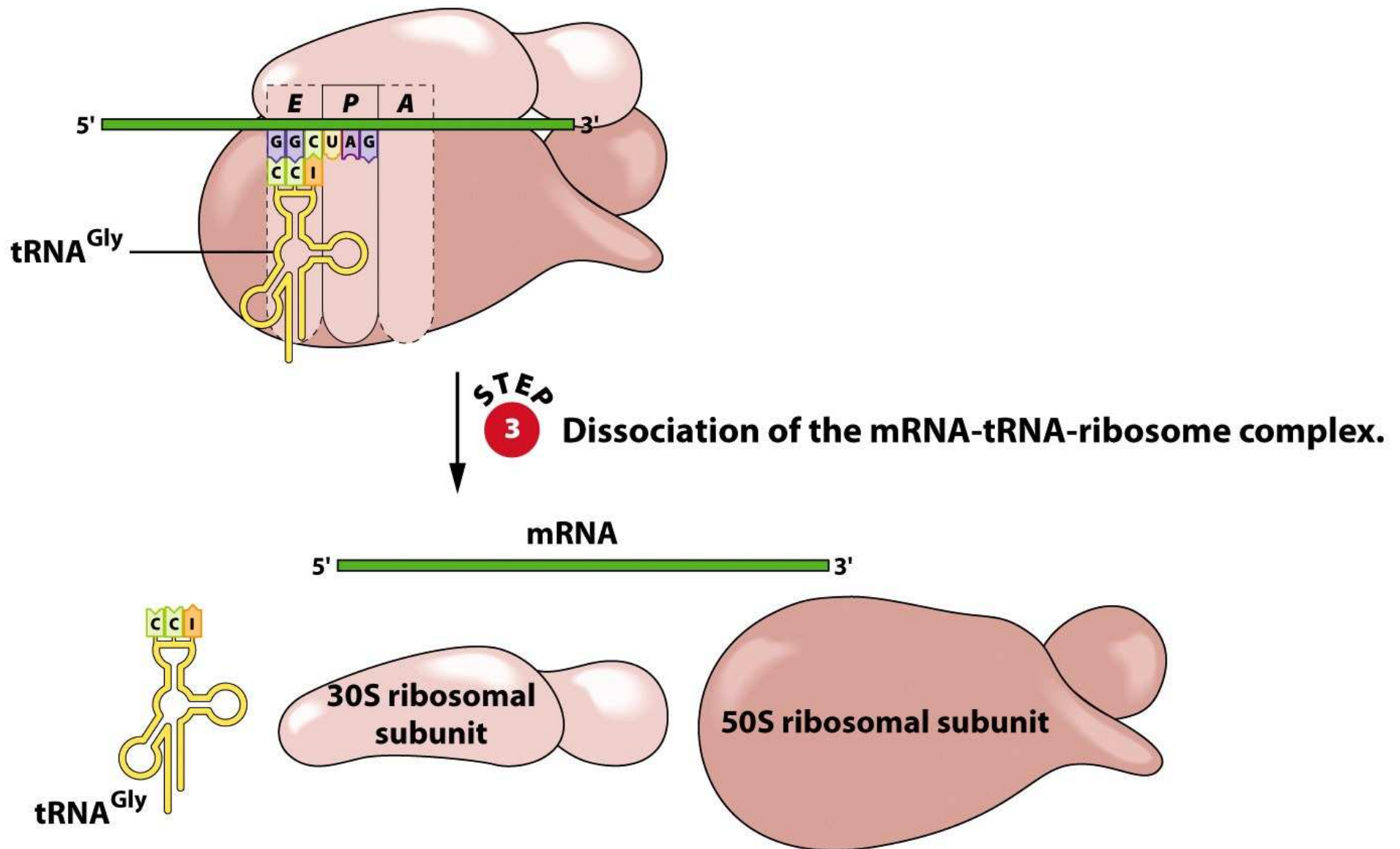
- k terminačnímu kodonu v místě *A* se váže uvolňovací faktor (RF u prokaryot, eRF u eukaryot)



- **RF mění aktivitu peptidyltransferázy:** přidává molekulu vody k C-konci
- uvolnění polypeptidu z tRNA v místě *P*, translokace prázdné tRNA do místa *E*



- uvolnění mRNA z ribozomu
- disociace podjednotek ribozomu



Take home message

- genetická informace uložená v sekvencích nukleotidů mRNA se překládá do sekvencí aminokyselin v polypeptidech pomocí ribozomů a složitého aparátu
- translační proces je složitý a vyžaduje účast mnoha různých RNA a proteinů
- tRNA slouží jako adaptéry zprostředkující interakce mezi aminokyselinami a kodony v mRNA
- translace probíhá ve fázích iniciace, elongace, terminace podle genetického kódu

Genetický kód

- nepřekrývající se kód, který určuje typ aminokyseliny, iniciaci a terminaci translace



Vlastnosti genetického kódu

- složen z tripletů nukleotidů
- triplety se nepřekrývají
- neobsahuje interpunkční znaménka
- je degenerovaný
- obsahuje kodony pro začátek a konec translace
- je téměř univerzální

► **TABLE 12.1**

The Genetic Code^a

		Second letter					
		U	C	A	G		
First (5') letter	U	UUU } Phe (F)	UCU } Ser (S)	UAU } Tyr (Y)	UGU } Cys (C)	U	
		UUC } Leu (L)		UCC } Ser (S)	UAC } Tyr (Y)	UGC } Cys (C)	C
		UUA } Leu (L)		UCA } Ser (S)	UAA Stop (terminator)	UGA Stop (terminator)	A
		UUG } Leu (L)		UCG } Ser (S)	UAG Stop (terminator)	UGG Trp (W)	G
	C	CUU } Leu (L)	CCU } Pro (P)	CAU } His (H)	CGU } Arg (R)	U	
		CUC } Leu (L)		CCC } Pro (P)	CAC } His (H)	CGC } Arg (R)	C
		CUA } Leu (L)		CCA } Pro (P)	CAA } Gln (Q)	CGA } Arg (R)	A
		CUG } Leu (L)		CCG } Pro (P)	CAG } Gln (Q)	CGG } Arg (R)	G
	A	AUU } Ileu (I)	ACU } Thr (T)	AAU } Asn (N)	AGU } Ser (S)	U	
		AUC } Ileu (I)		ACC } Thr (T)	AAC } Asn (N)	AGC } Ser (S)	C
		AUA } Ileu (I)		ACA } Thr (T)	AAA } Lys (K)	AGA } Arg (R)	A
		AUG <i>Met (M) (initiator)</i>		ACG } Thr (T)	AAG } Lys (K)	AGG } Arg (R)	G
	G	GUU } Val (V)	GCU } Ala (A)	GAU } Asp (D)	GGU } Gly (G)	U	
		GUC } Val (V)		GCC } Ala (A)	GAC } Asp (D)	GGC } Gly (G)	C
		GUA } Val (V)		GCA } Ala (A)	GAA } Glu (E)	GGA } Gly (G)	A
		GUG } Val (V)		GCG } Ala (A)	GAG } Glu (E)	GGG } Gly (G)	G

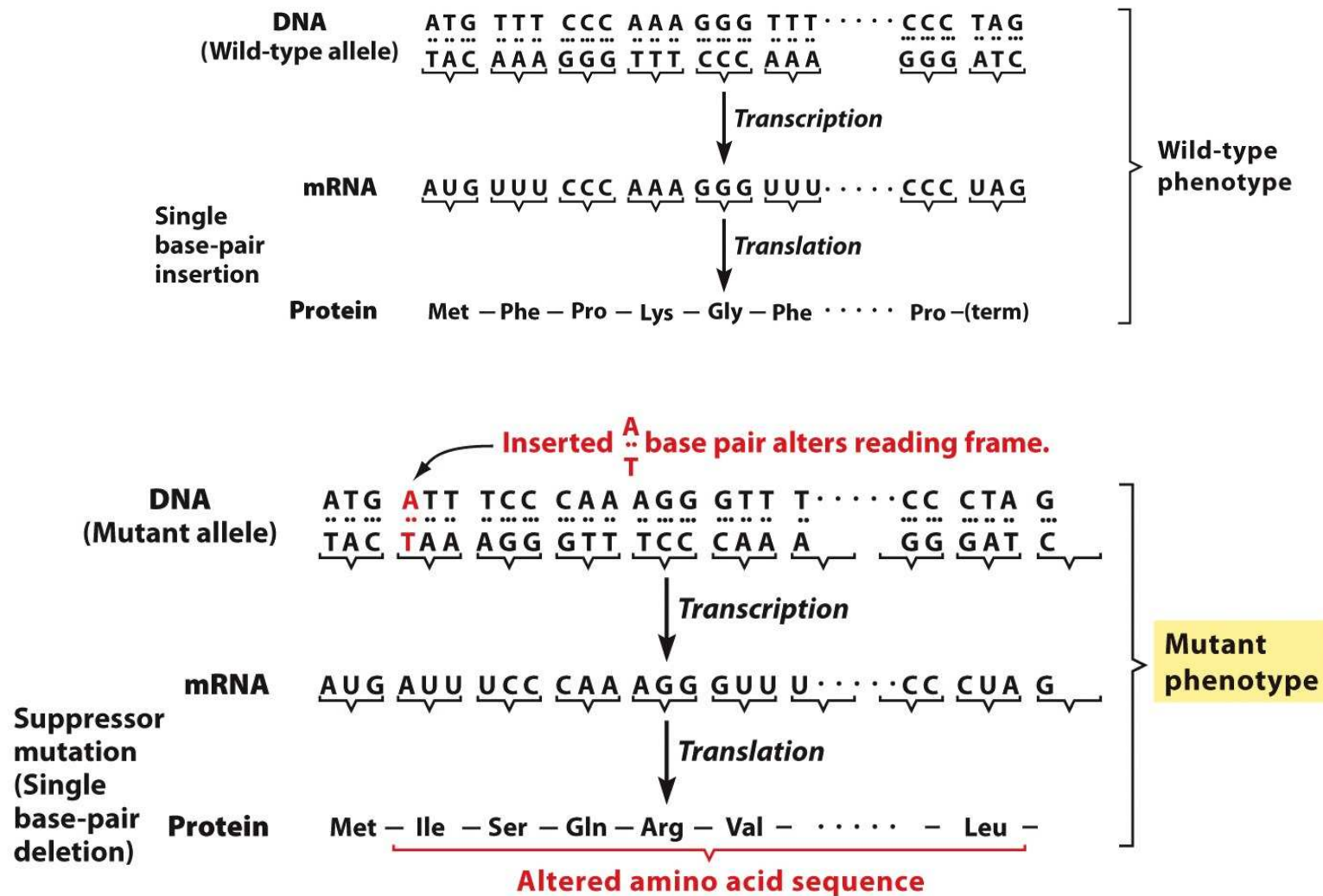
 = Polypeptide chain initiation codon
 = Polypeptide chain termination codon

^aEach triplet nucleotide sequence or codon refers to the nucleotide sequence in mRNA (not DNA) that specifies the incorporation of the indicated amino acid or polypeptide chain termination. The one-letter symbols for the amino acids are given in parentheses after the standard three-letter abbreviations.

Genetický kód je tripletový

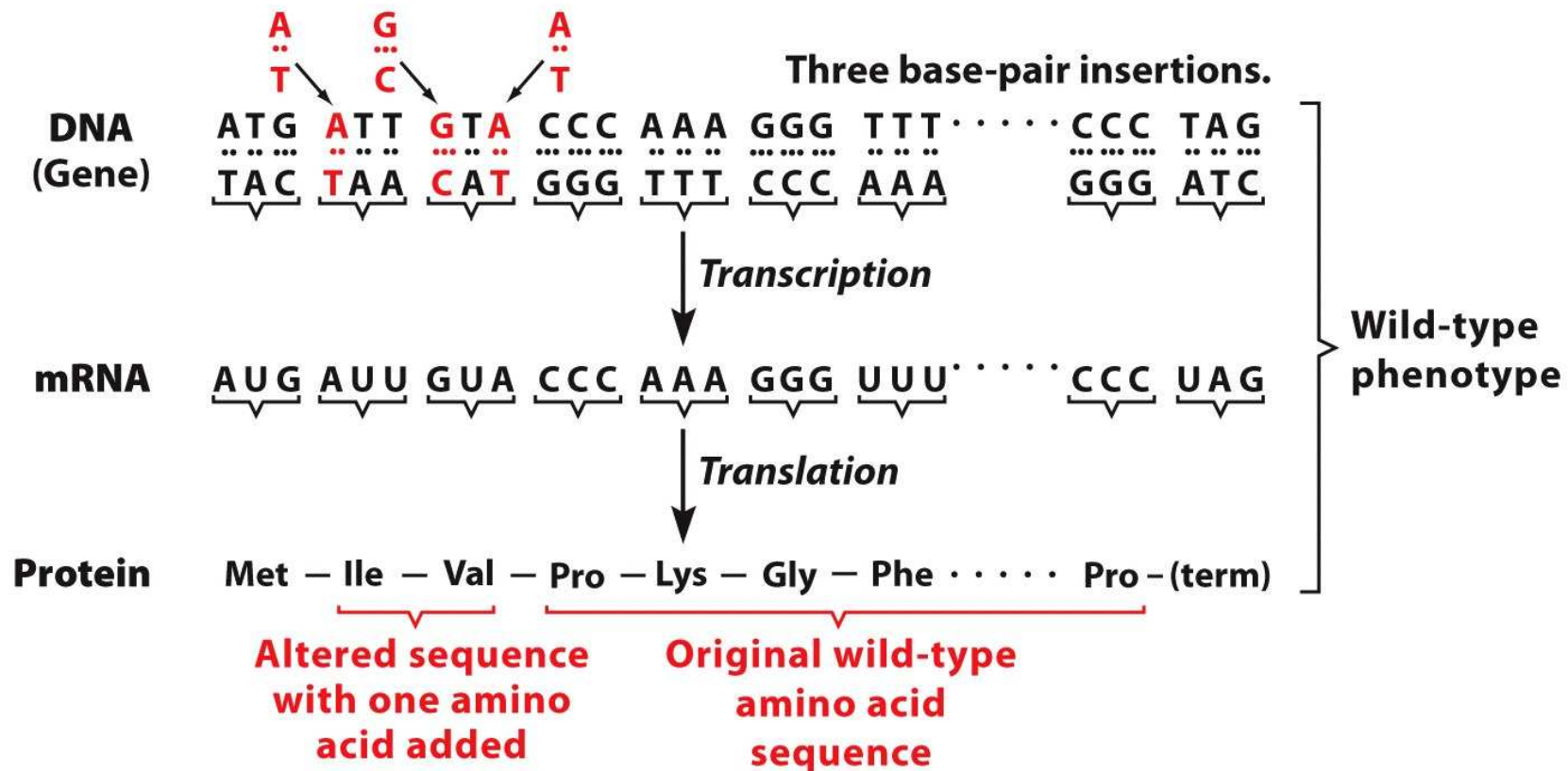
Inzerce/delece jednoho/dvou páru bází mění čtecí rámeček

A single base-pair deletion restores the reading frame changed by a single base-pair addition.

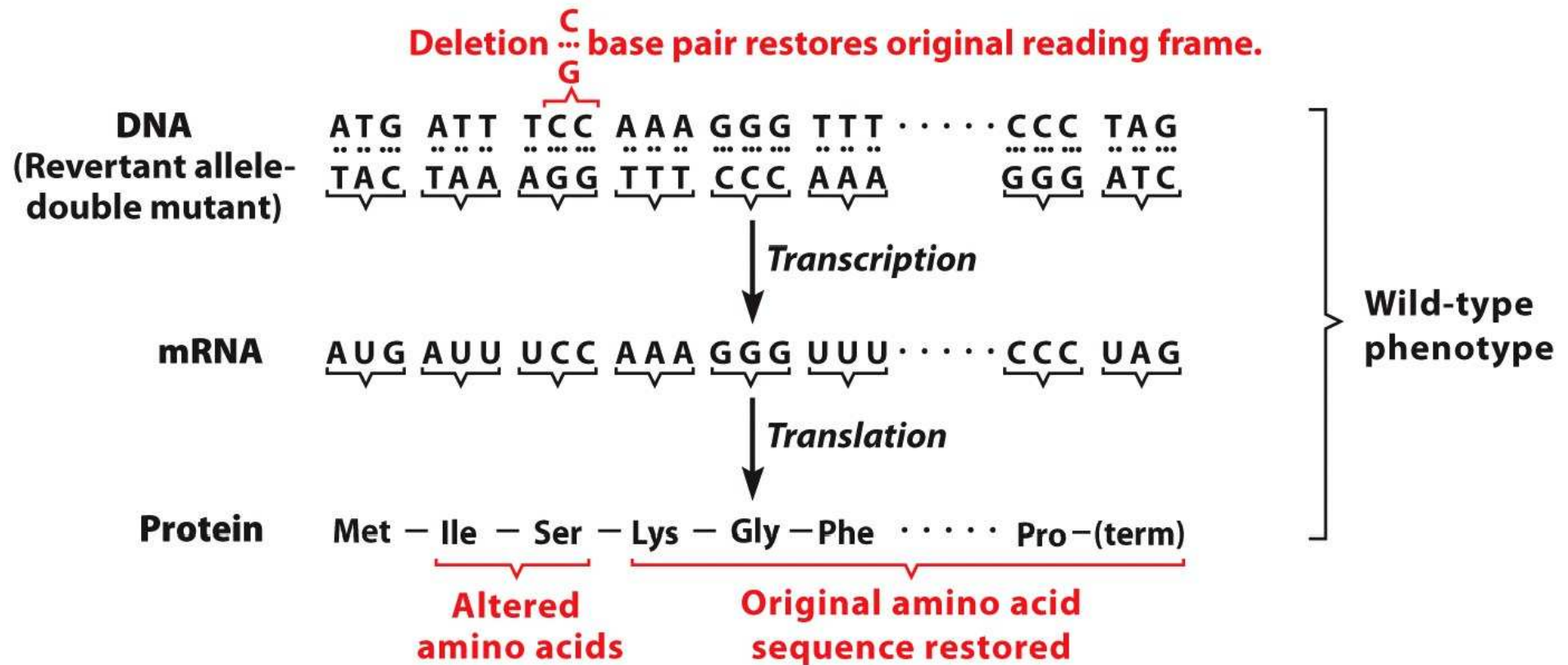


Inserce/delece 3 párů bází čtecí rámec nemění

Recombinant containing three single base-pair additions has the wild-type reading frame.



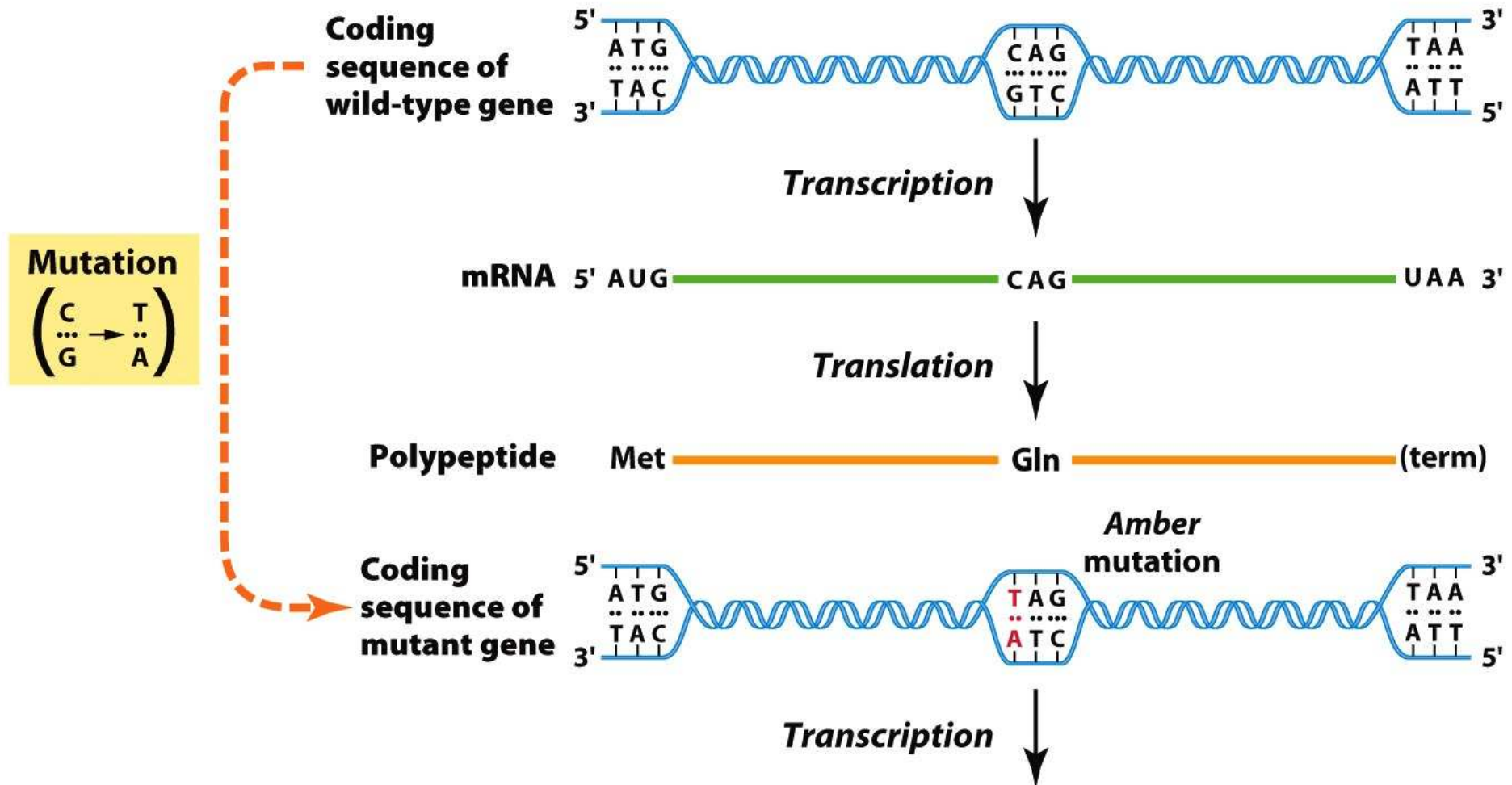
Supresorové mutace obnovují původní čtecí rámeček



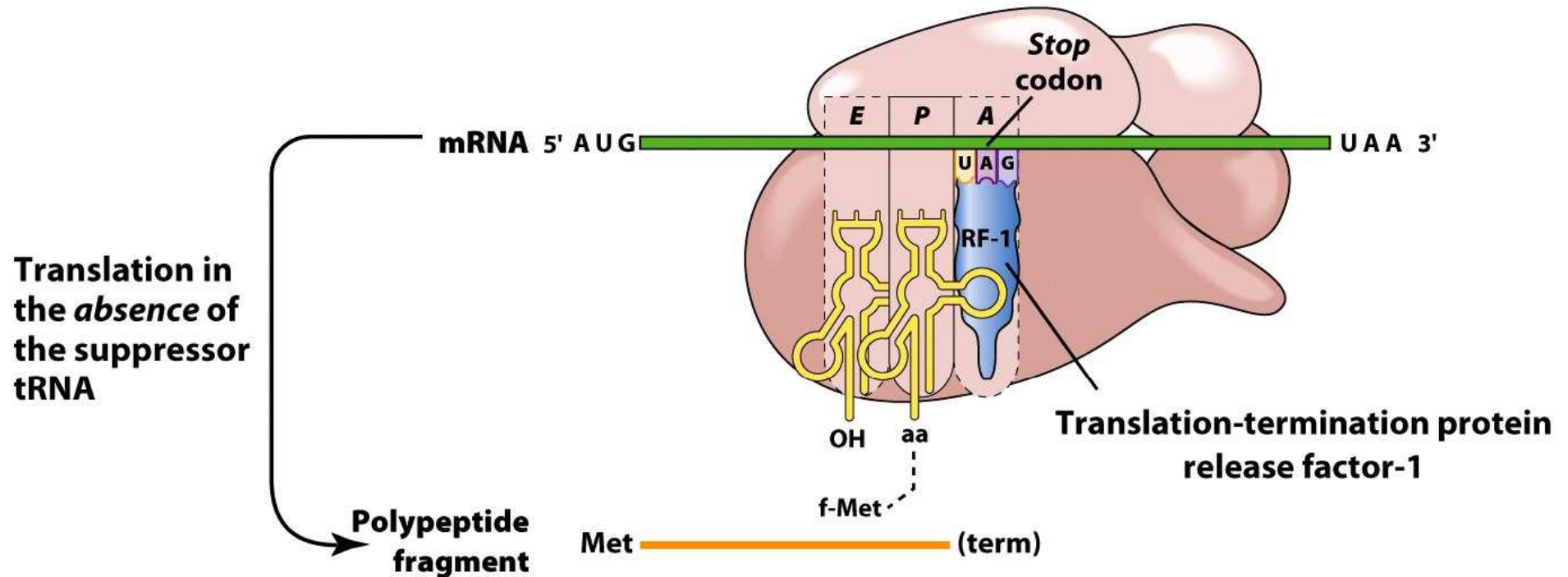
Supresorové mutace

- některé mutace v genech pro tRNA mění strukturu antikodonů a proto vedou k chybné interpretaci kodonů v mRNA
- tyto mutace byly původně nalezeny jako supresorové mutace, které potlačovaly účinek jiných mutací
- příklad: mutace tRNA, které suprimují mutace *amber* (mutace způsobující terminaci řetězce UAG) v kódující sekvenci genu

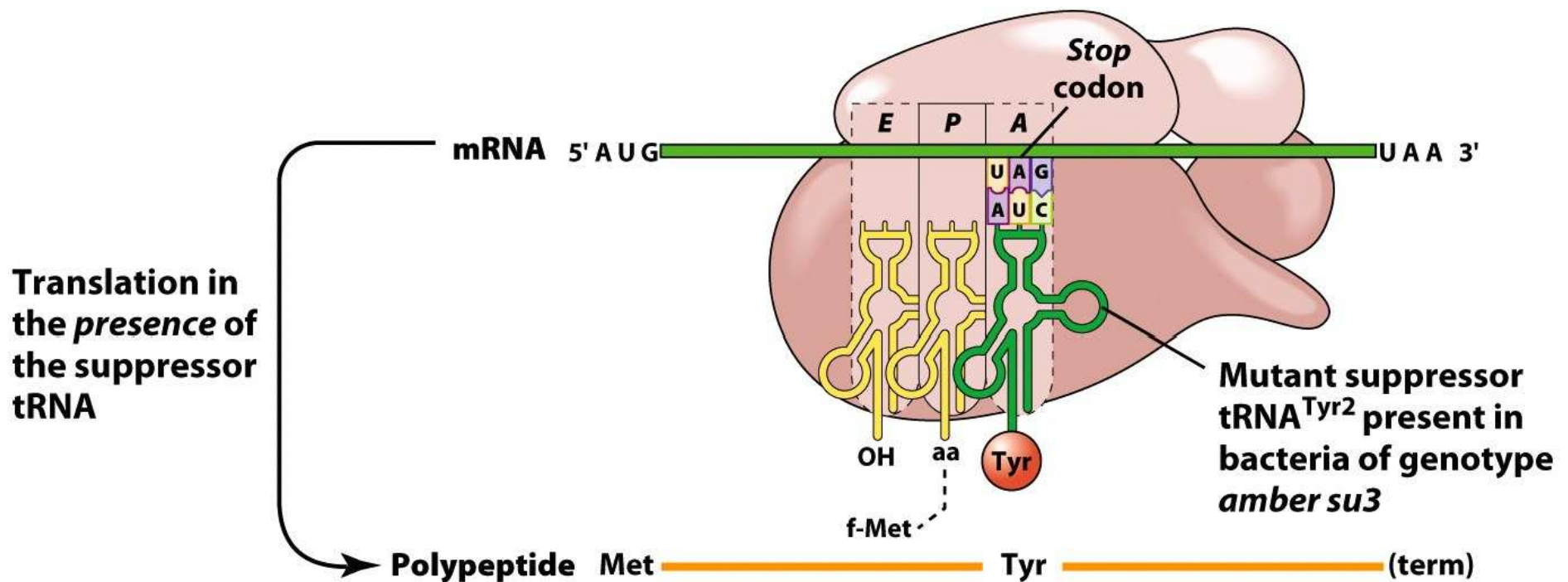
Mutate amber (UAG)



Translace mutace *amber* za nepřítomnosti supresorové tRNA



Translace mutace *amber* za přítomnosti supresorové tRNA



- některé supresorové mutace mění antikodony tRNA tak, že mutantní tRNA reagují na terminační kodony
- tím se do polypeptidů začleňují aminokyseliny (na místo terminace translace)

Genetický kód

- Iniciační a terminační kodony:
 - iniciační: AUG
 - terminační: UAA, UAG, UGA
- téměř univerzální (výjimky: mitochondrie a někteří prvoci)

Take home message

- každá z 20 aminokyselin v proteinech je určena jedním nebo několika nukleotidovými triplety v mRNA
- z 64 možných tripletů vytvořených ze 4 bází v mRNA, 61 určuje aminokyseliny a 3 signalizují terminaci řetězce
- kód je **nepřekrývající** (každý nukleotid patří k jedinému kodonu), **degenerovaný** (většina AK je určena 2-4 kodony)
- kód je téměř **univerzální**; s minimálními výjimkami má 64 tripletů stejný význam u všech organizmů

Potvrzení povahy genetického kódu *in vivo*

- srovnání nukleotidových sekvencí genů se sekvencemi aminokyselin jejich polypeptidových produktů prokázalo, že kódující smysl kodonů vyvozený ze studií *in vitro* plně odpovídá jejich využití při proteosyntéze v živých buňkách
- srpkovitá anémie: srovnání nukleotidové sekvence normální a "nemocné" alely a jejich proteinových produktů