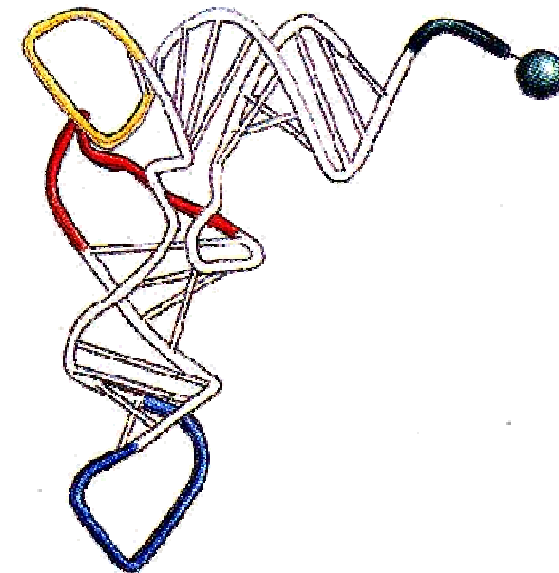
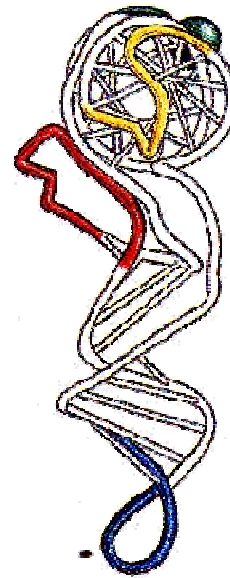
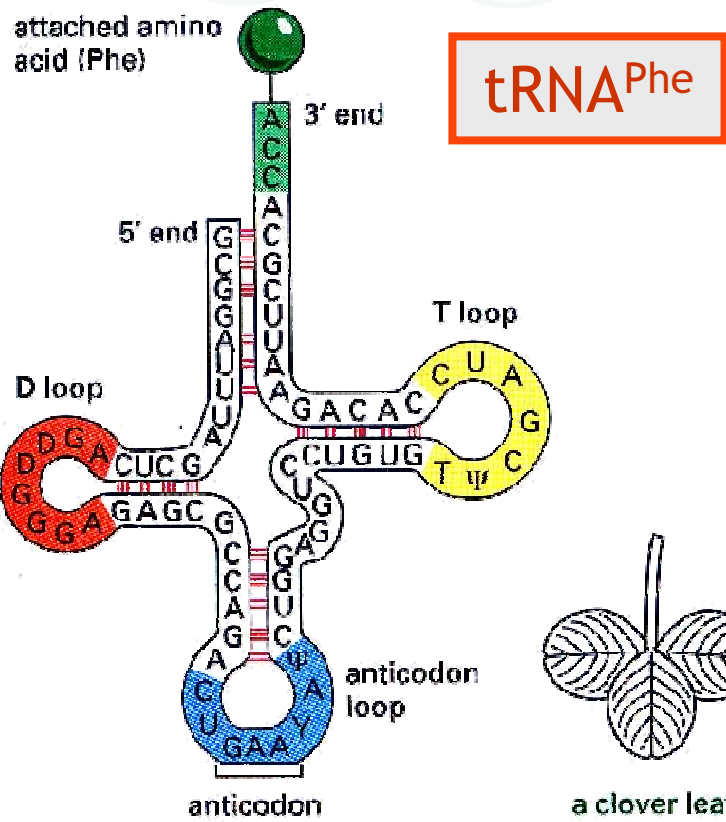


Translace - překlad genetické informace

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



(A)

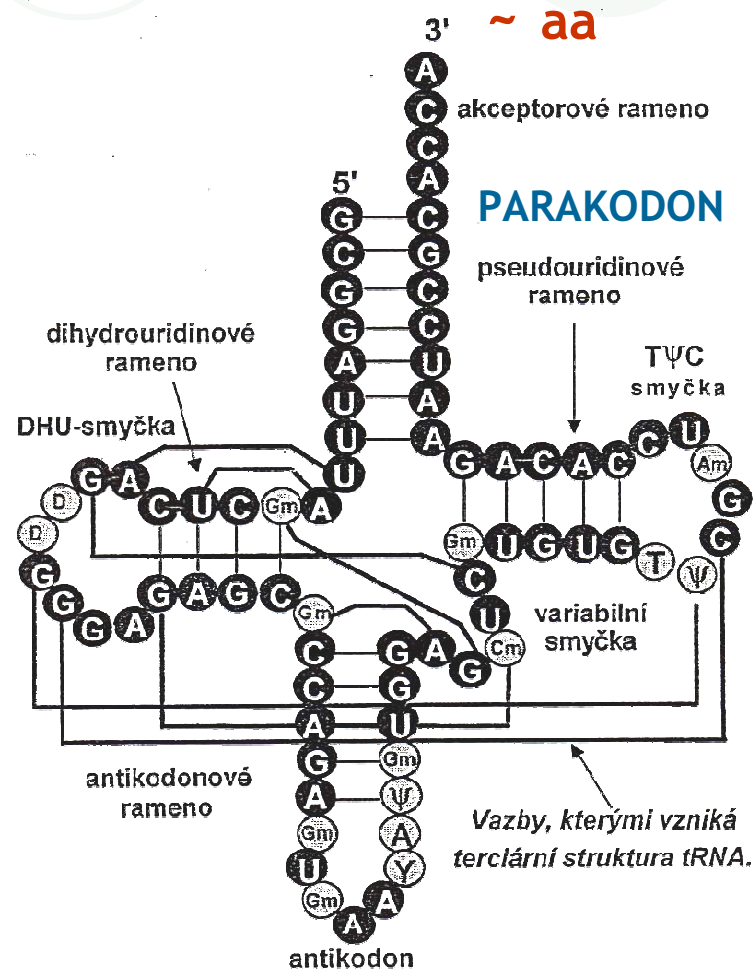
(B)

(C)

(D) 5' GCGGAUUUAGCUCAGDDGGGAGAGCGCCAGACUGAAYATCUGGAGGUCCUGUGTΨCGAUCCACAGAAUUCGCACCA 3'

anticodon

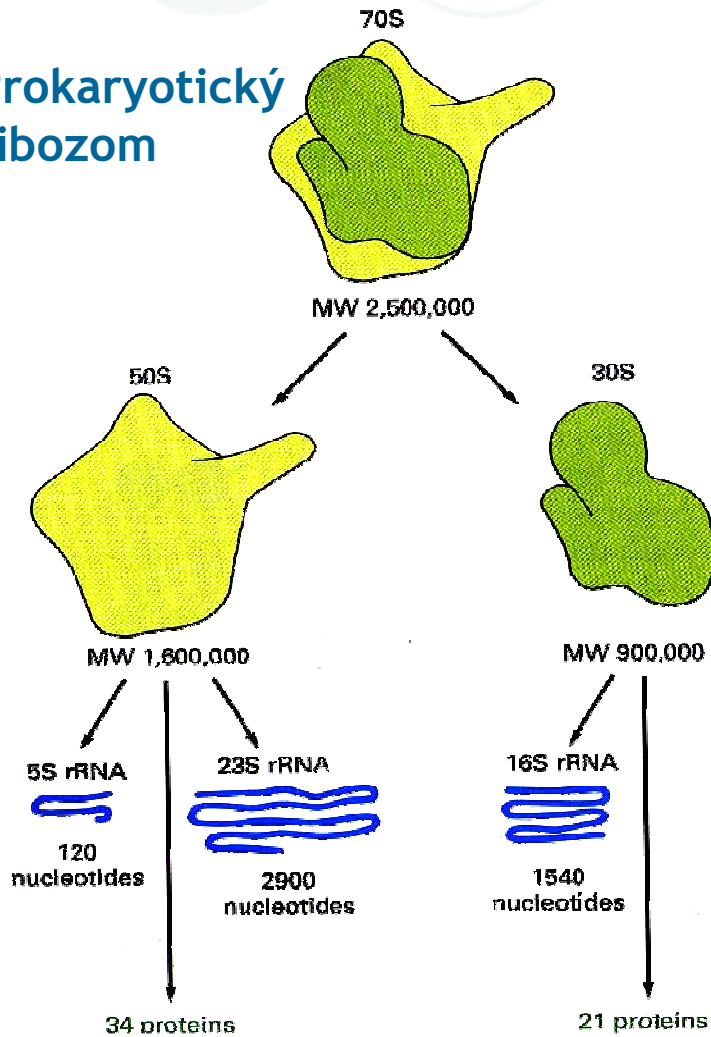
Sekundární struktura tRNA



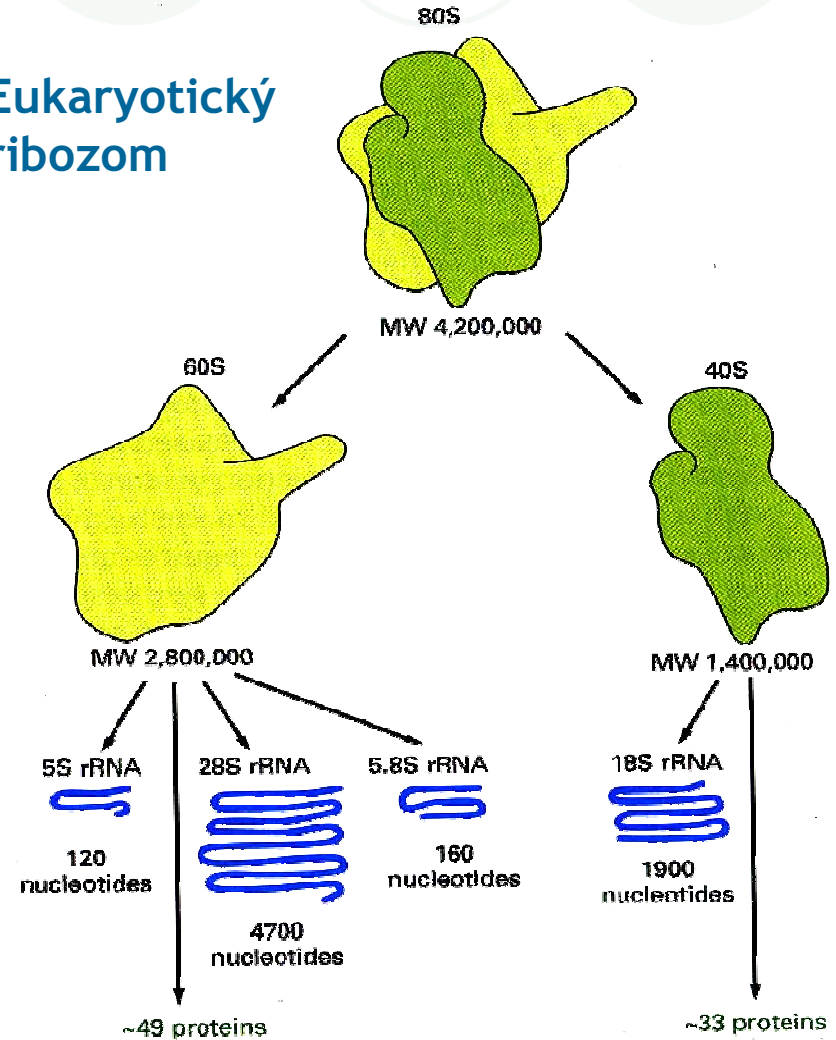
černé kroužky = standardní nukleotidy
 šedé kroužky = neobvyklé nukleotidy

Srovnání struktury prokaryotického a eukaryotického ribozomu

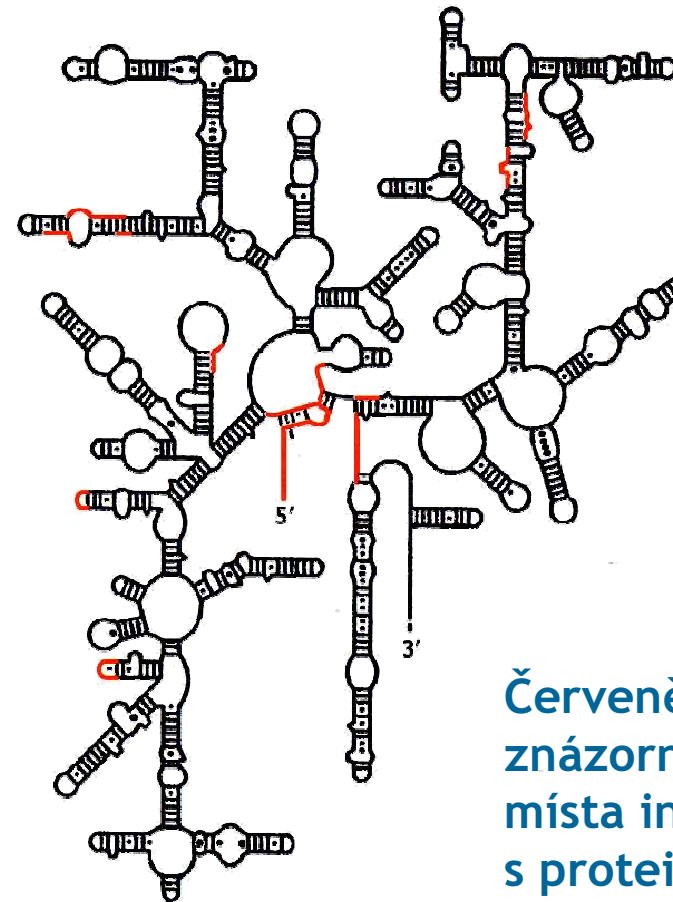
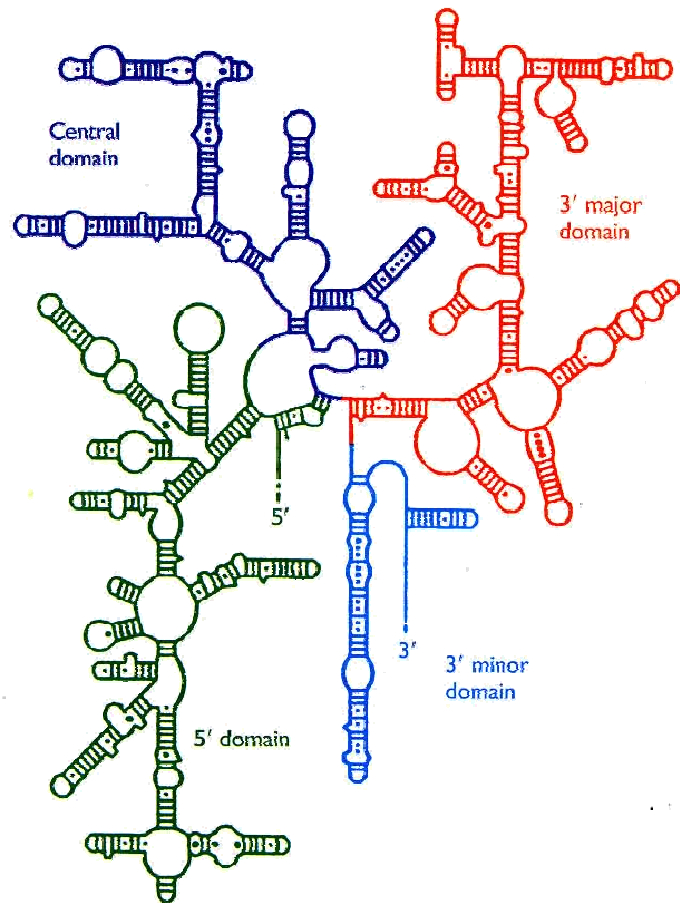
Prokaryotický ribozom



Eukaryotický ribozom

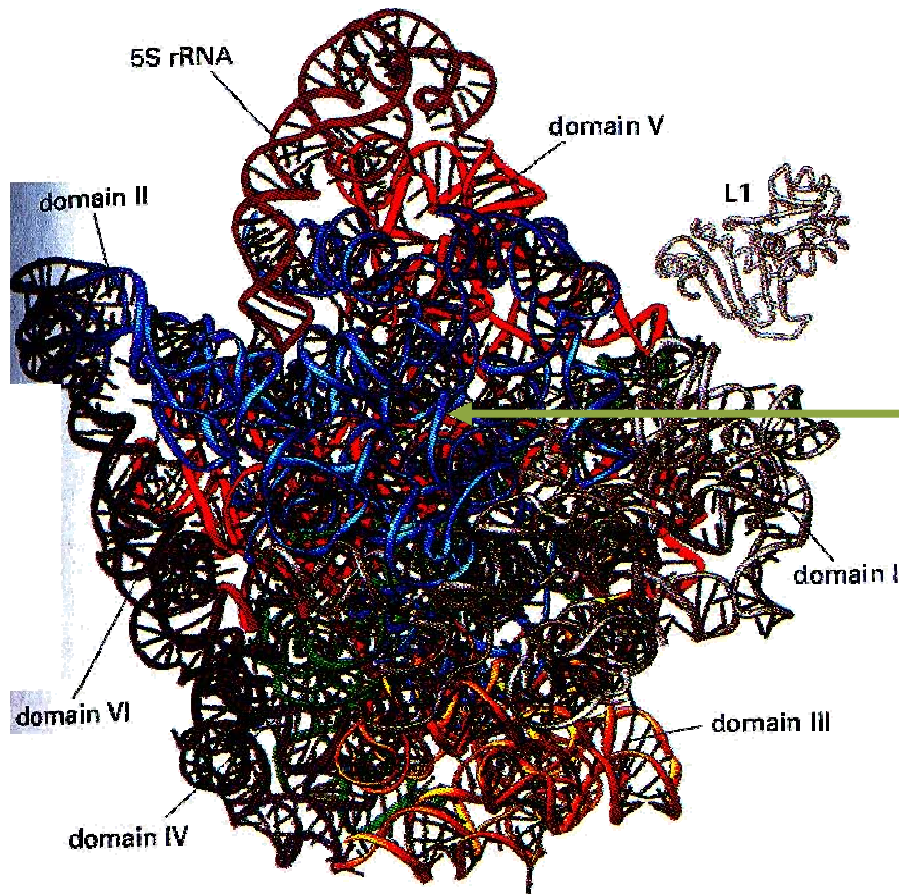


Sekundární struktura 16S rRNA *E. coli*

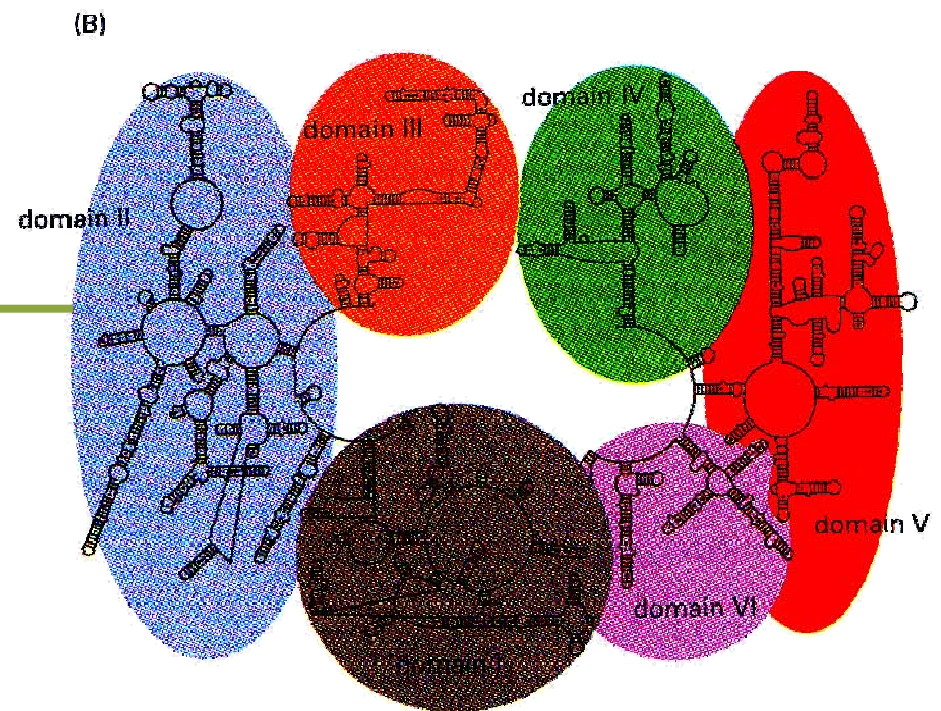


Červeně jsou
znázorněna
místa interakce
s proteinem S5

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

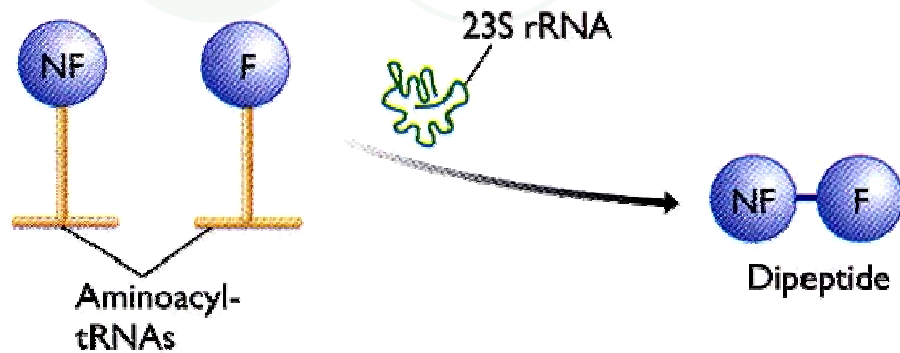


Trojrozměrná struktura rRNA a L1 proteinu v poměrné velikosti



Schema sekundární struktury 23S rRNA

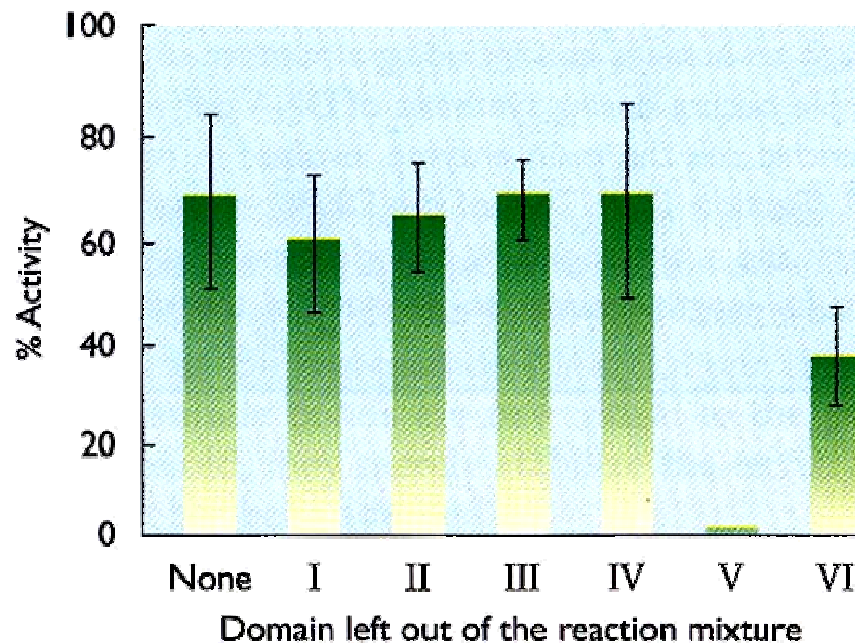
Peptidyltransferázová aktivita 23S rRNA - ribozymu



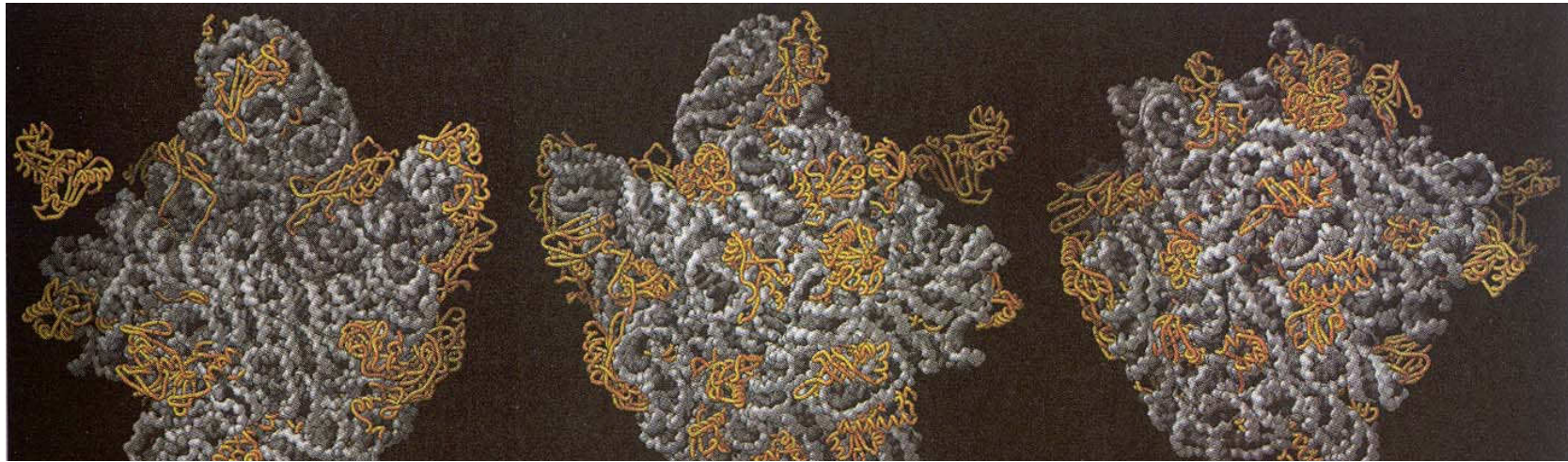
Purifikovaná 23S rRNA z *E. coli* katalyzuje vytvoření peptidové vazby mezi aminokyslečinami vázanými na tRNA za tvorby dipeptidu

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



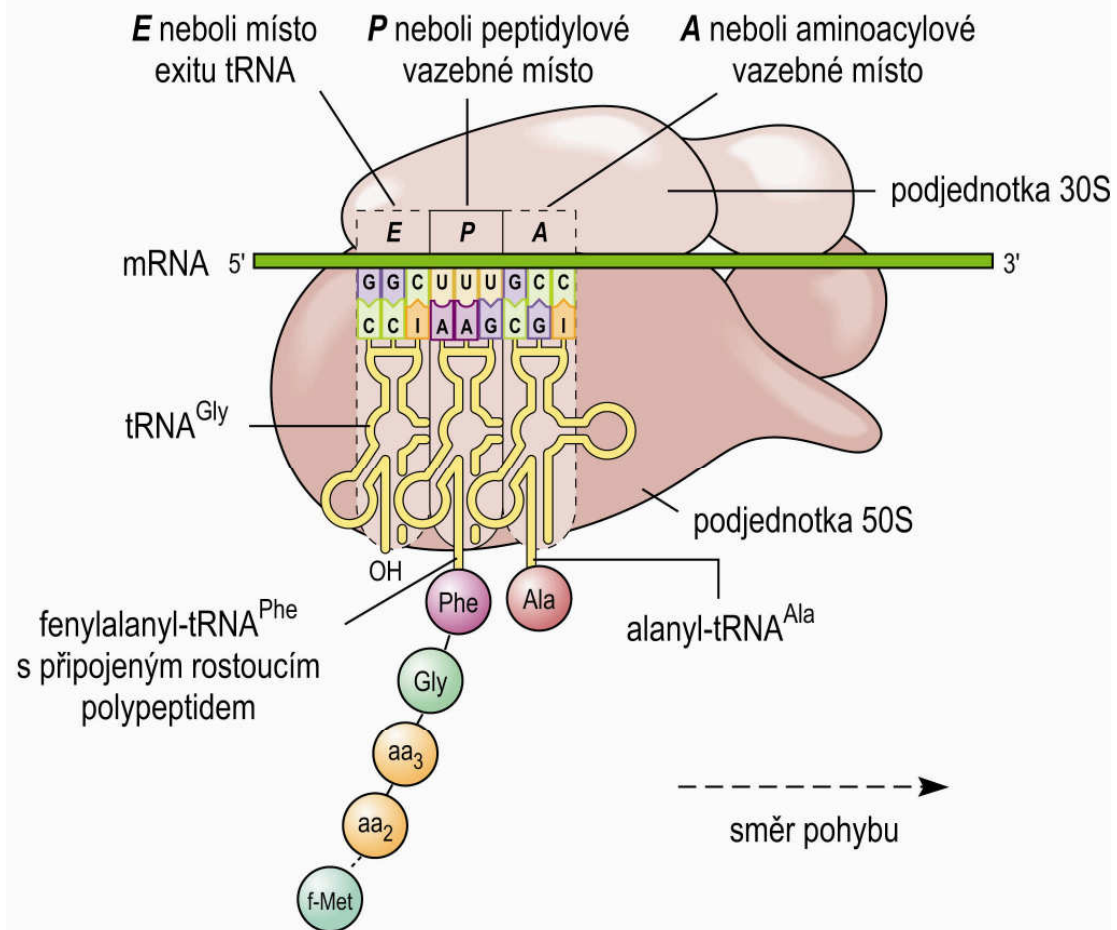
Šedě = 5S a 23S rRNA; žlutě: L proteiny

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



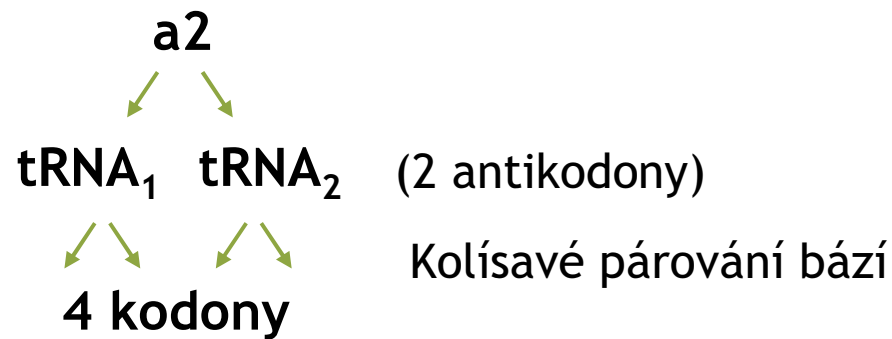
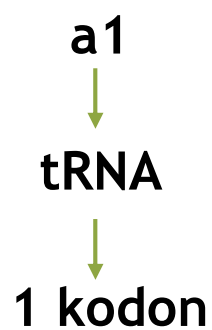
20 aa-tRNA-syntetáz



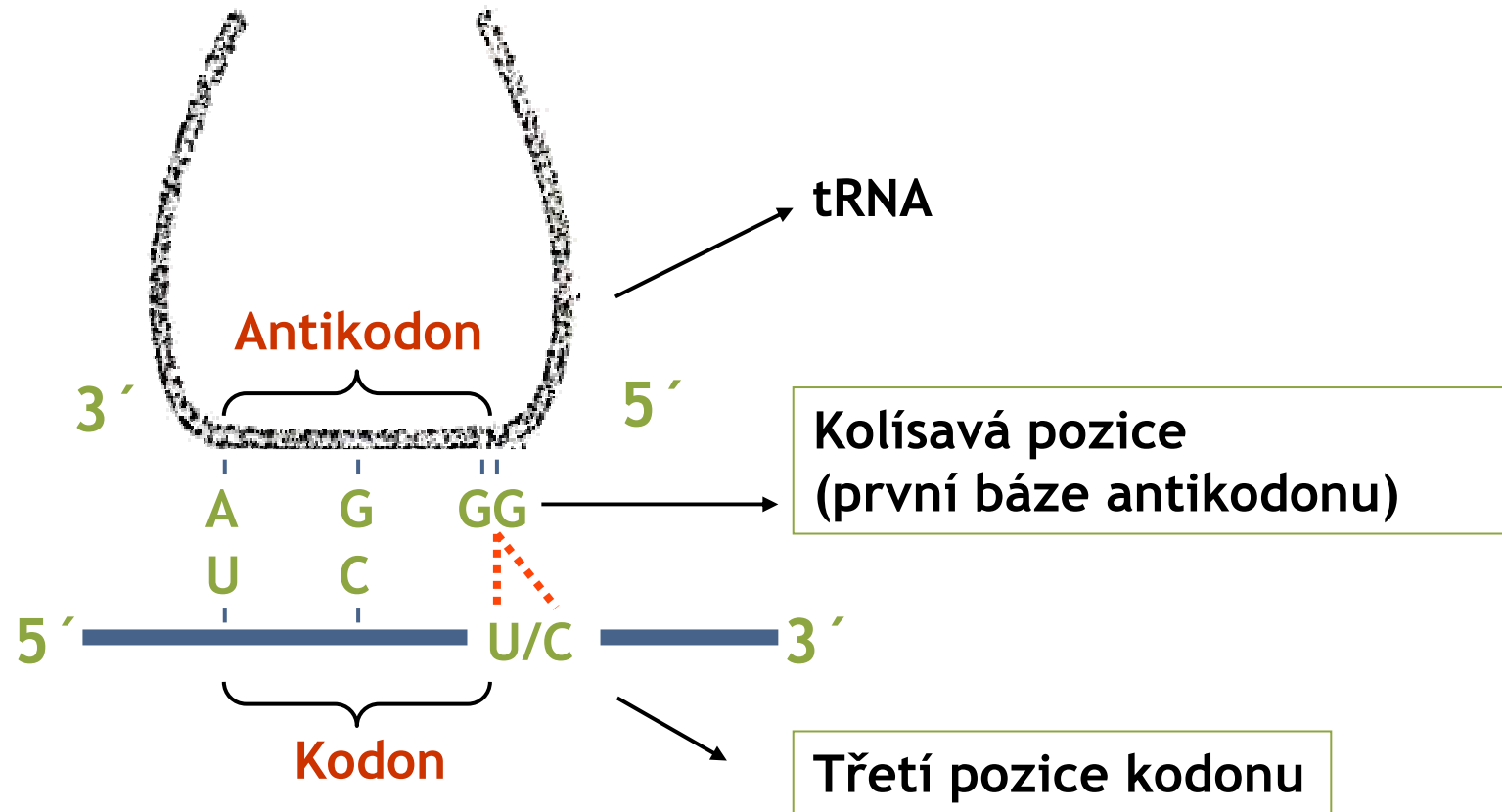
22-45 molekulárních druhů tRNA (tj. antikodonů)



61 kodonů se smyslem



Kolísavé párování bazí na 5' antikodonu tRNA

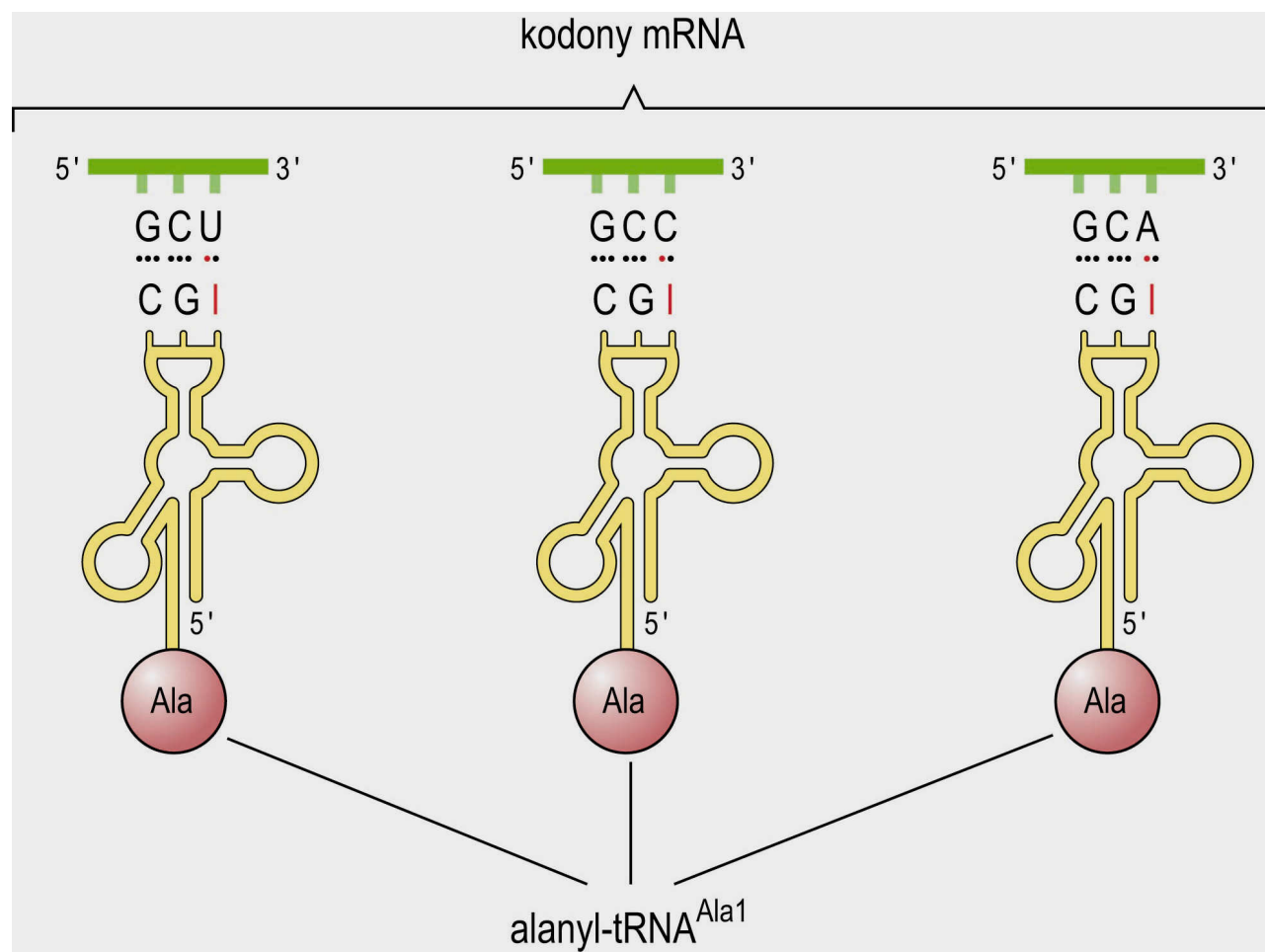


Možnosti čtení třetího nukleotidu podle pravidel kolísavého párování bází

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 aa

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	
Met	140 130		28 76		Lys	106 44	Arg		→ 1 17
G	Val	192 108 41 66 119 48 83 123	Ala	173 87 48 178 119 107 129 149	Asp	116 183 204 106 333 210 106 98	Gly	226 124 174 140 → 4 42 → 14 66	U C A G

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.

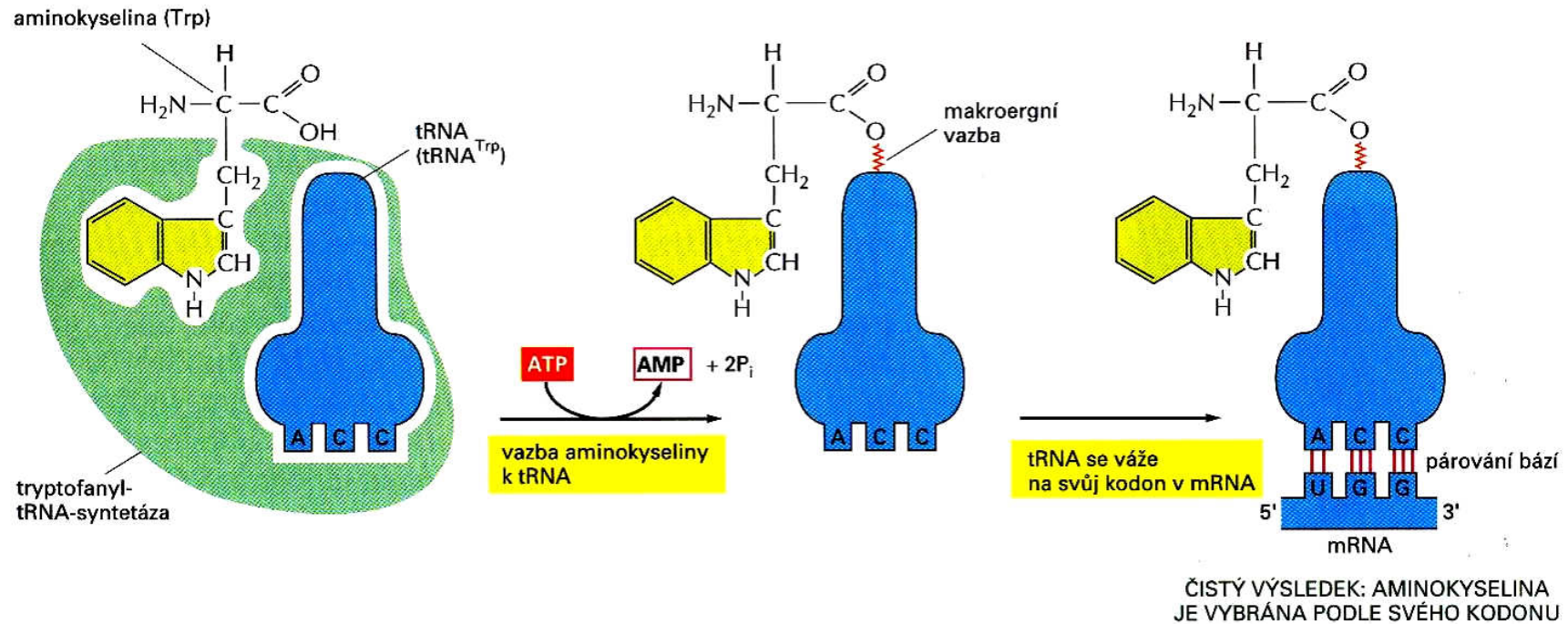
Klasifikace aminoacyl-tRNA-syntetáz

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

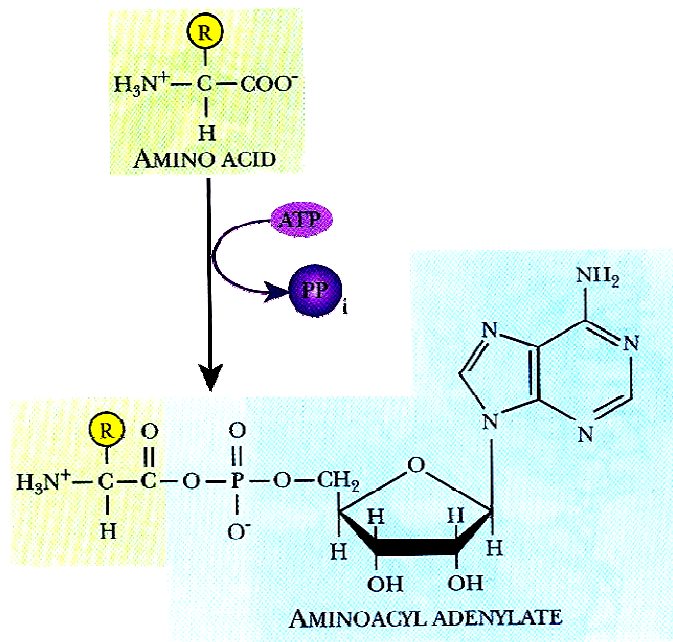
Přenos aminokyseliny molekulou tRNA na kodon mRNA



Nabíjení tRNA aminokyselinou

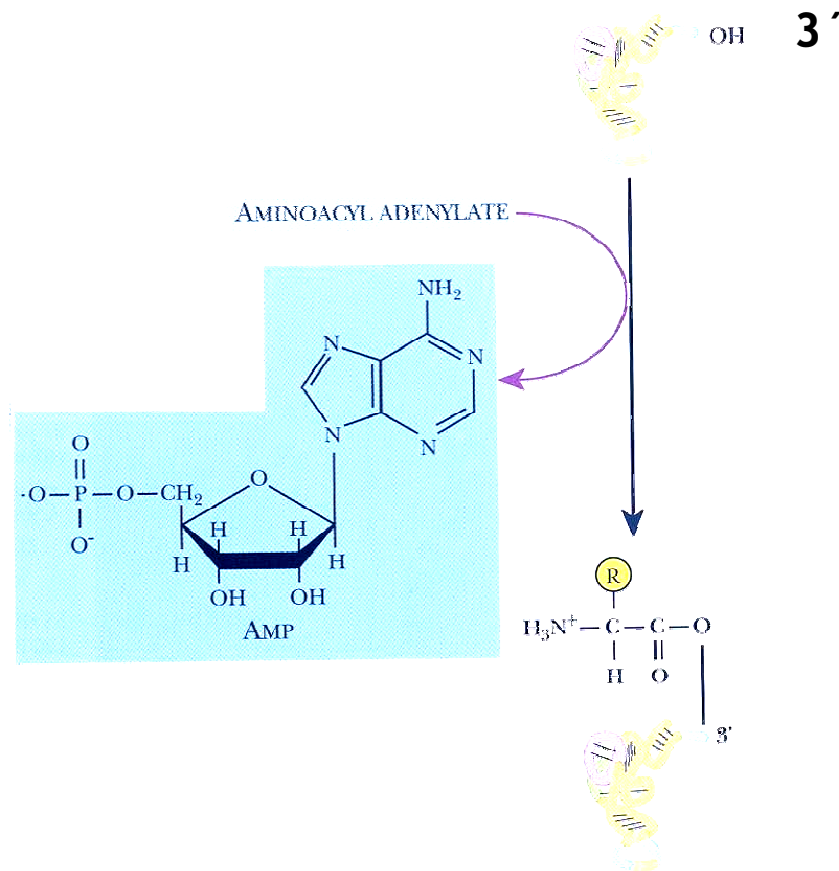
1. Vytvoření aminoacyladenylátu

aa + ATP → aminoacyl-AMP + PP_i

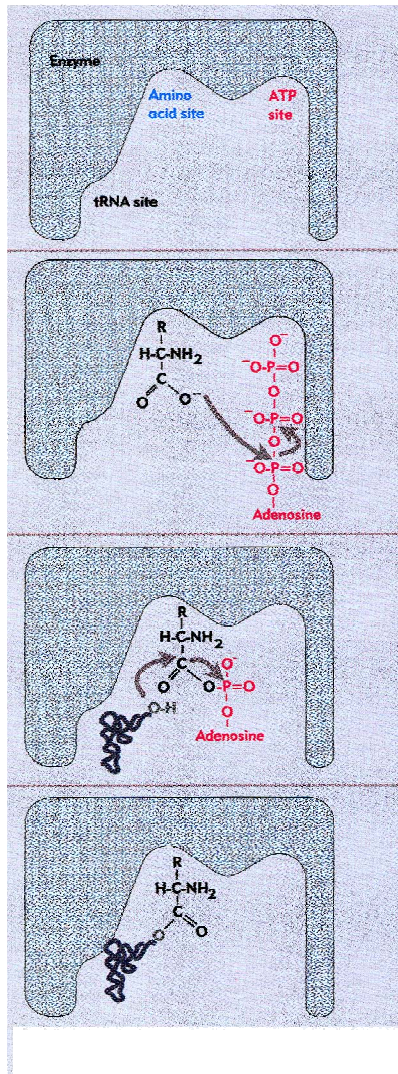


2. Přenos aminokyseliny na tRNA

aminoacyl-AMP + tRNA → aminoacyl-tRNA + AMP



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

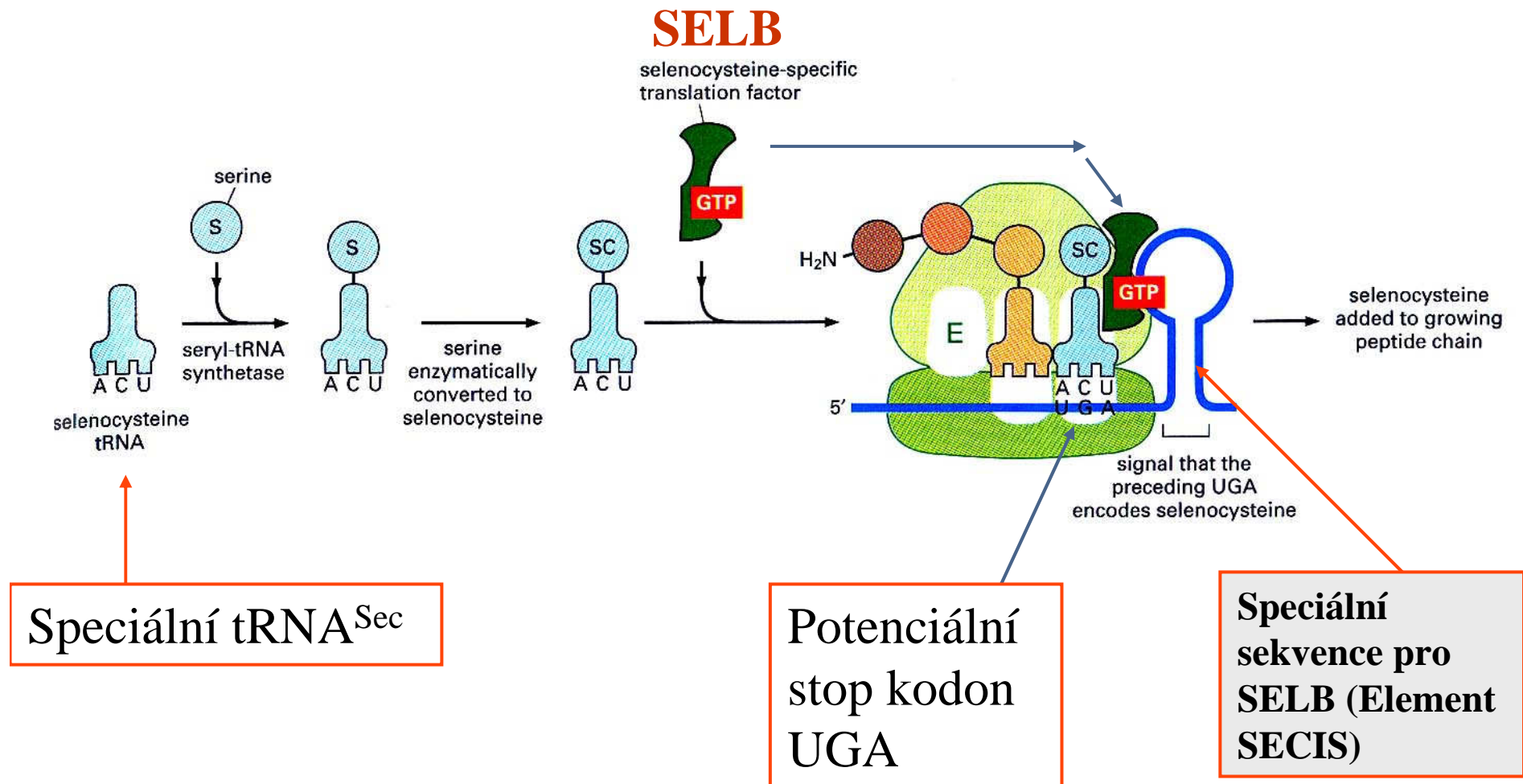
2. aa-AMP + tRNA
vznik aa-tRNA

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.

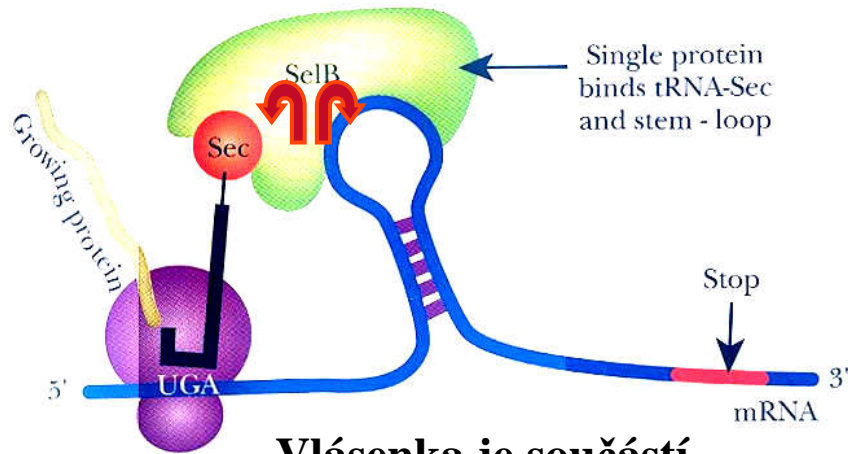
Přenos na ribozom

Inkorporace selenocysteinu do polypeptidového řetězce



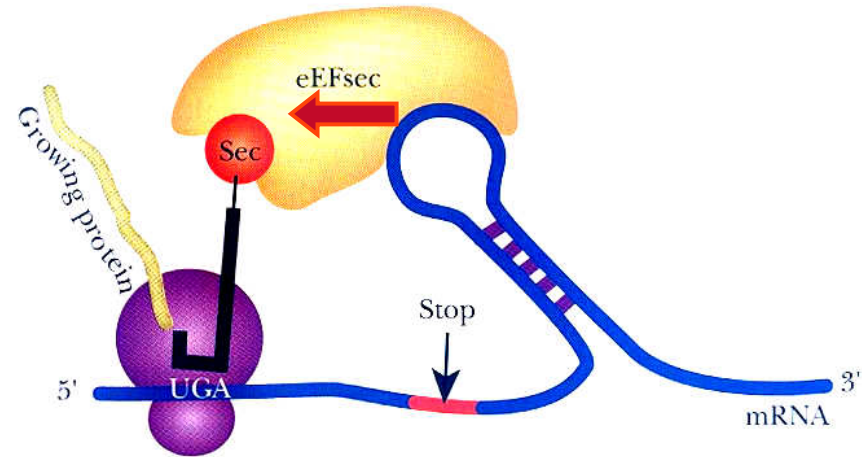
Vnášení tRNA-sec na vnitřní stop kodon UGA

a) U bakterií

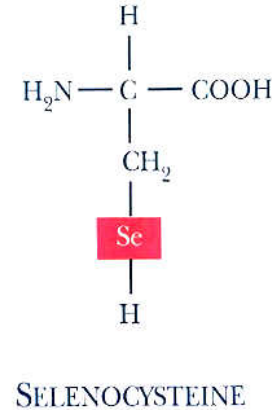
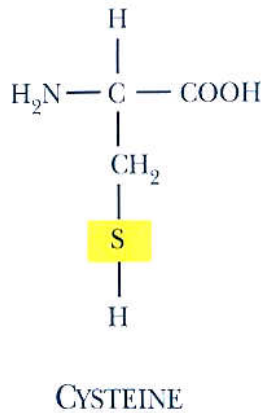
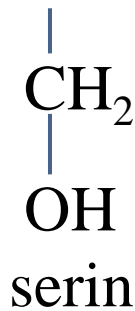


Vlásenka je součástí kódující sekvence mRNA

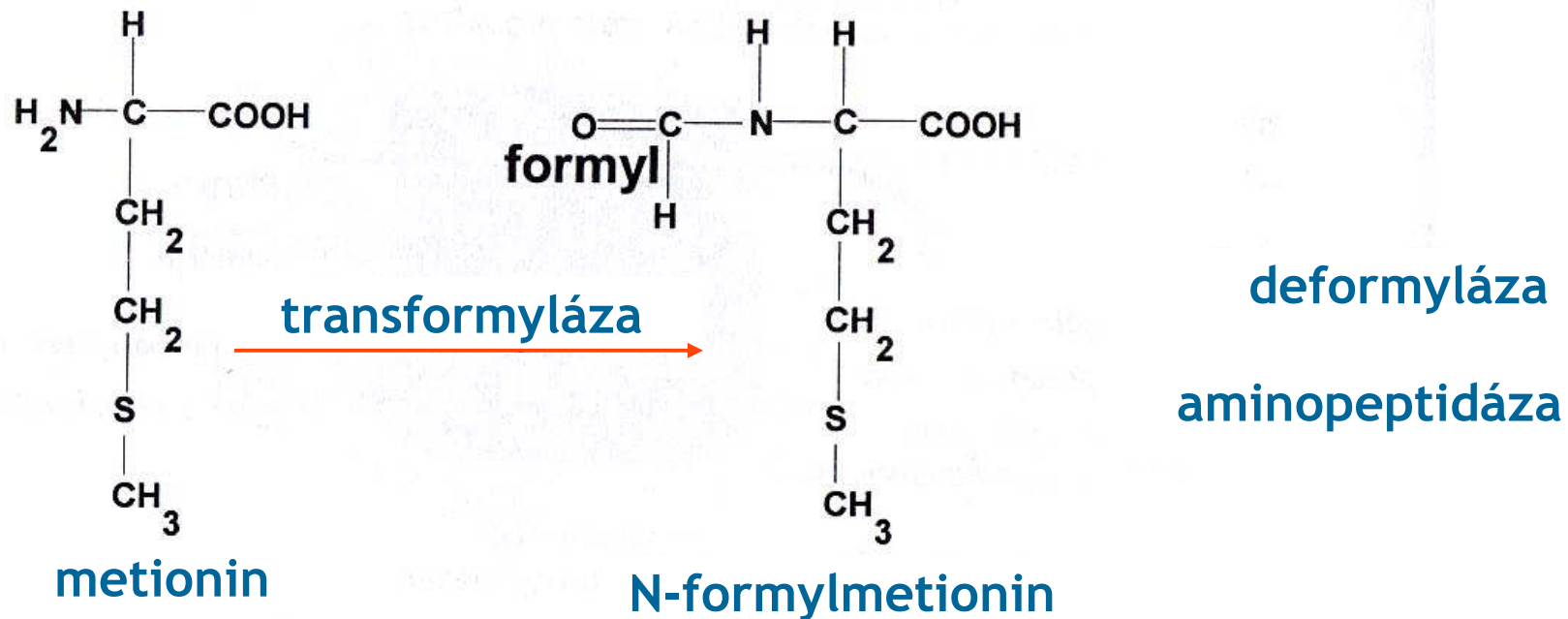
b) U savců



Vlásenka je součástí 3' netranslatované mRNA

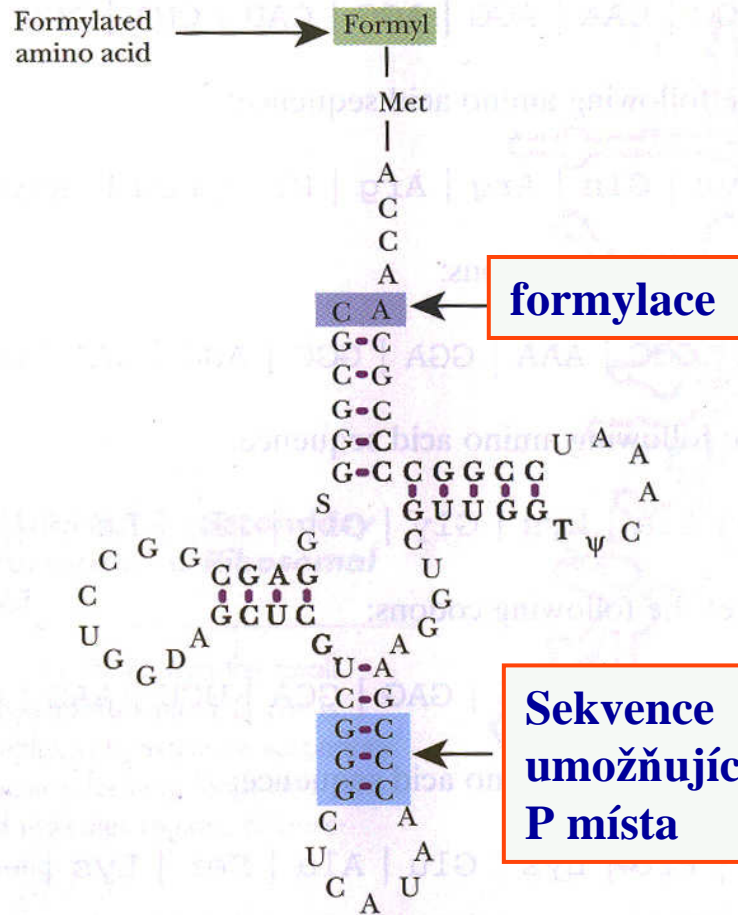


Metionin je po vazbě na fmet-tRNAi formylován na formylmetionin, který je po začlenění do polypeptidu deformylován na metionin, který může být následně z N-konce polypeptidu odstraněn

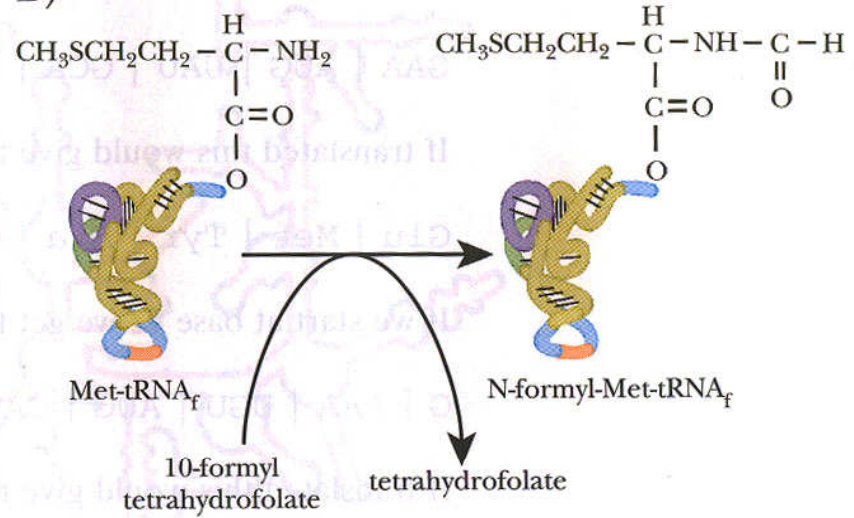


Formylace metioninu na iniciátorové tRNA

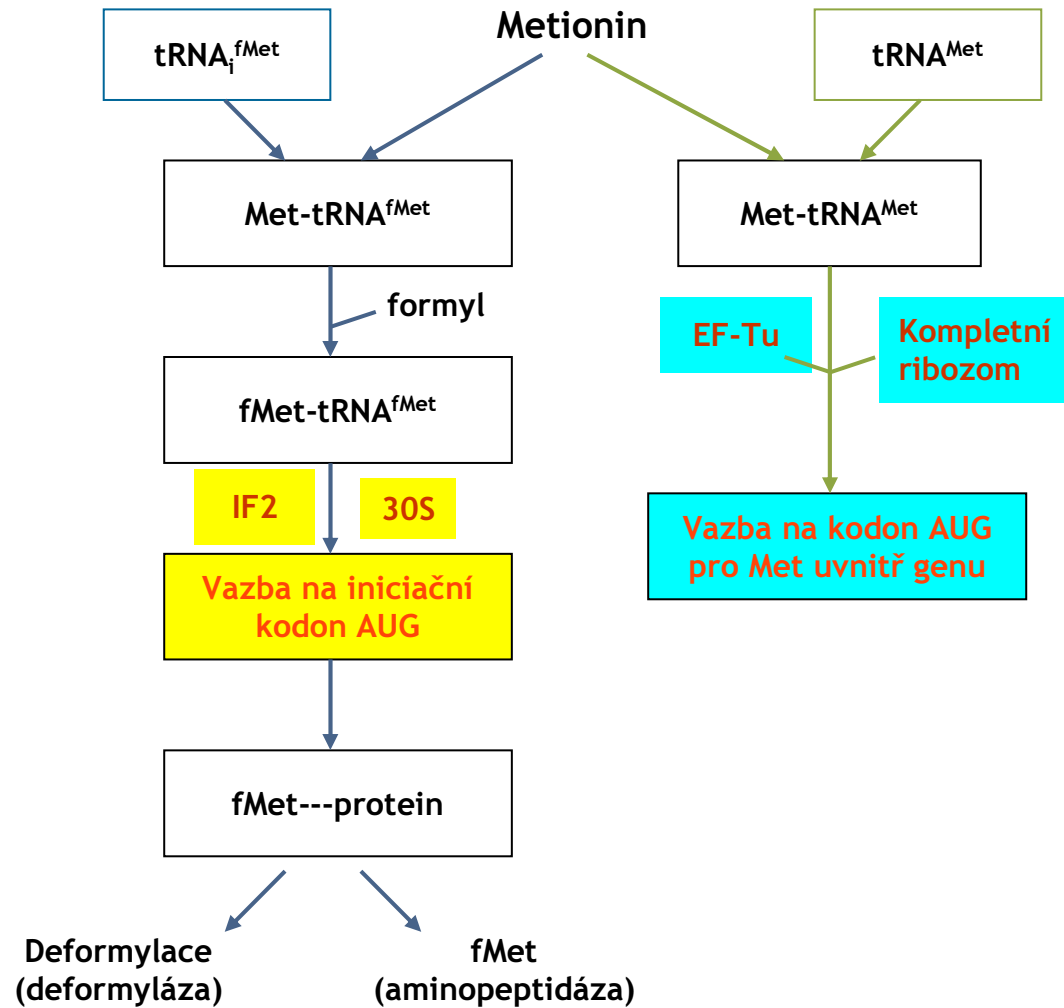
A) Struktura iniciátorové tRNA



B)



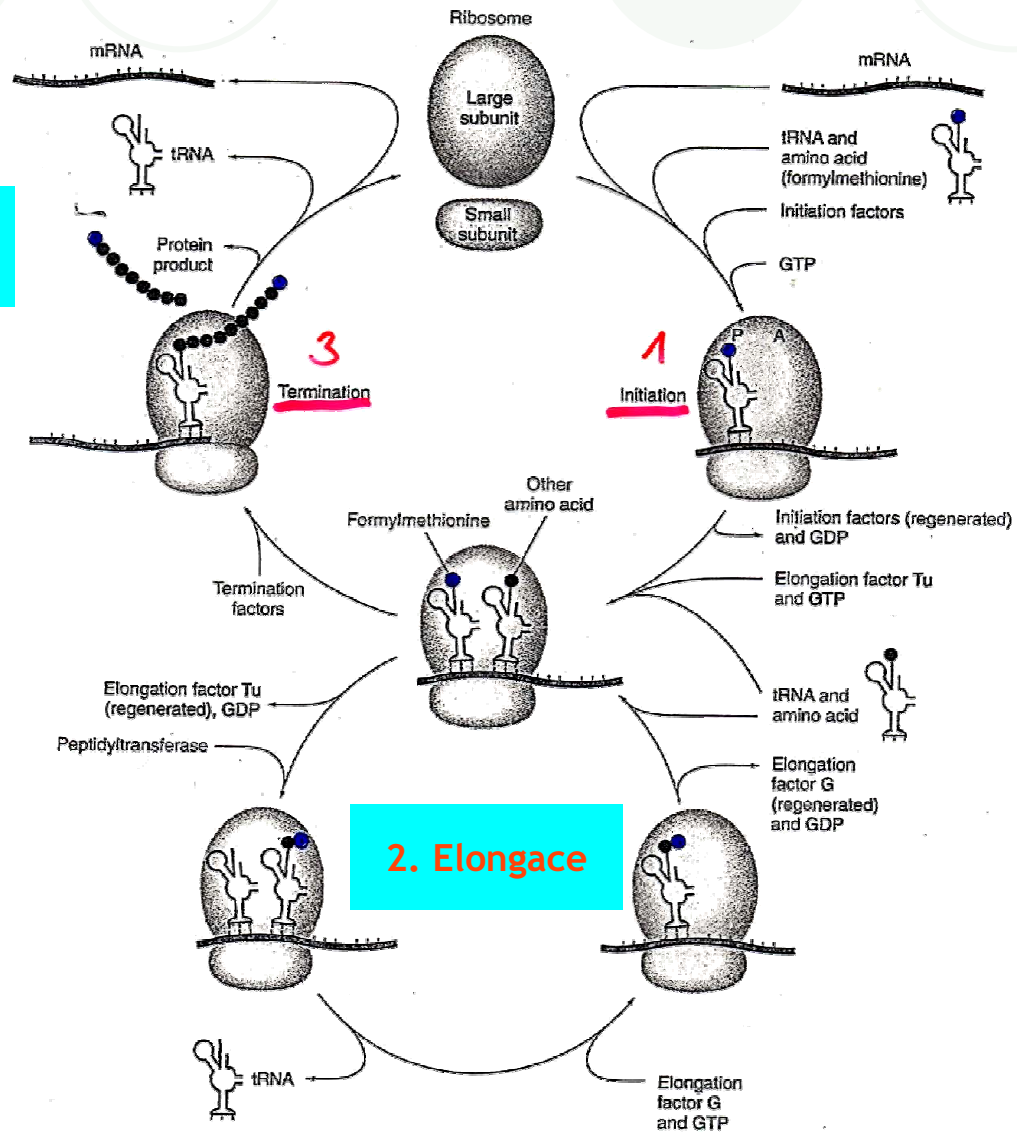
Zařazování metioninu do polypeptidu během iniciace translace a během její elongace



Fáze translace u prokaryot

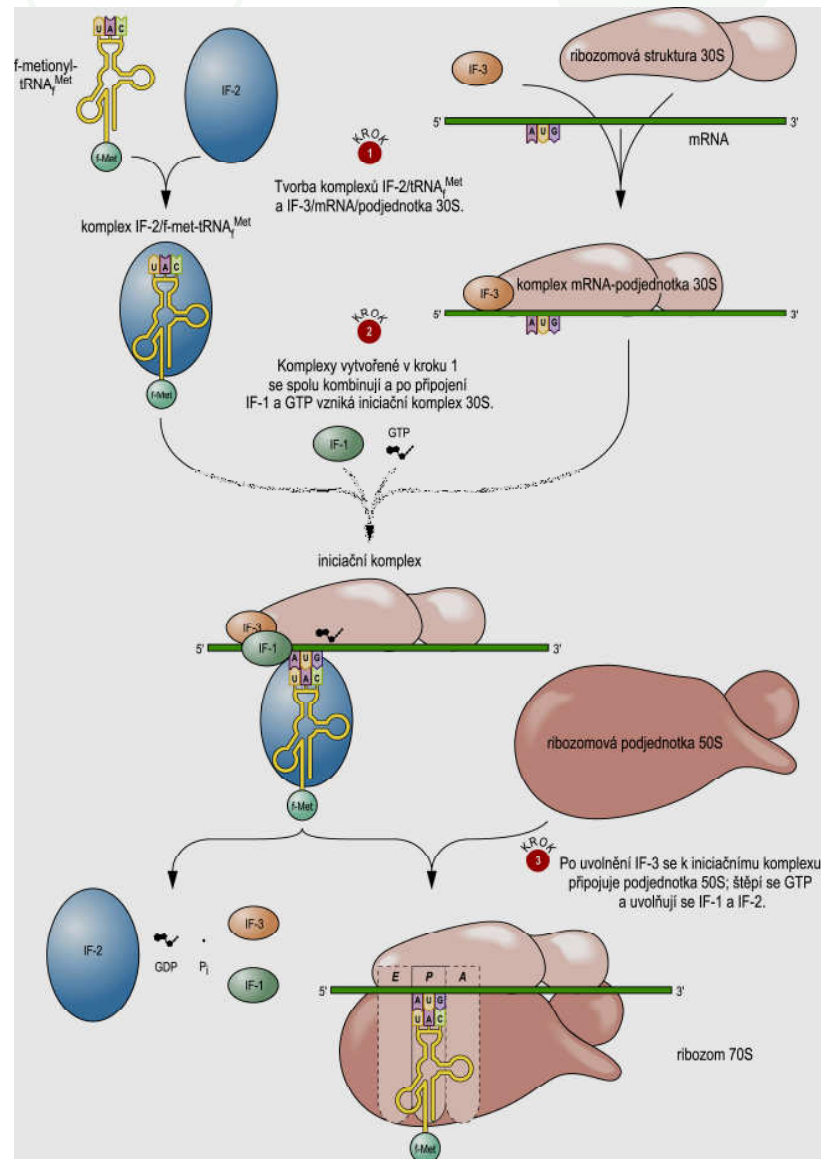
3. Terminace

1. Inicijace

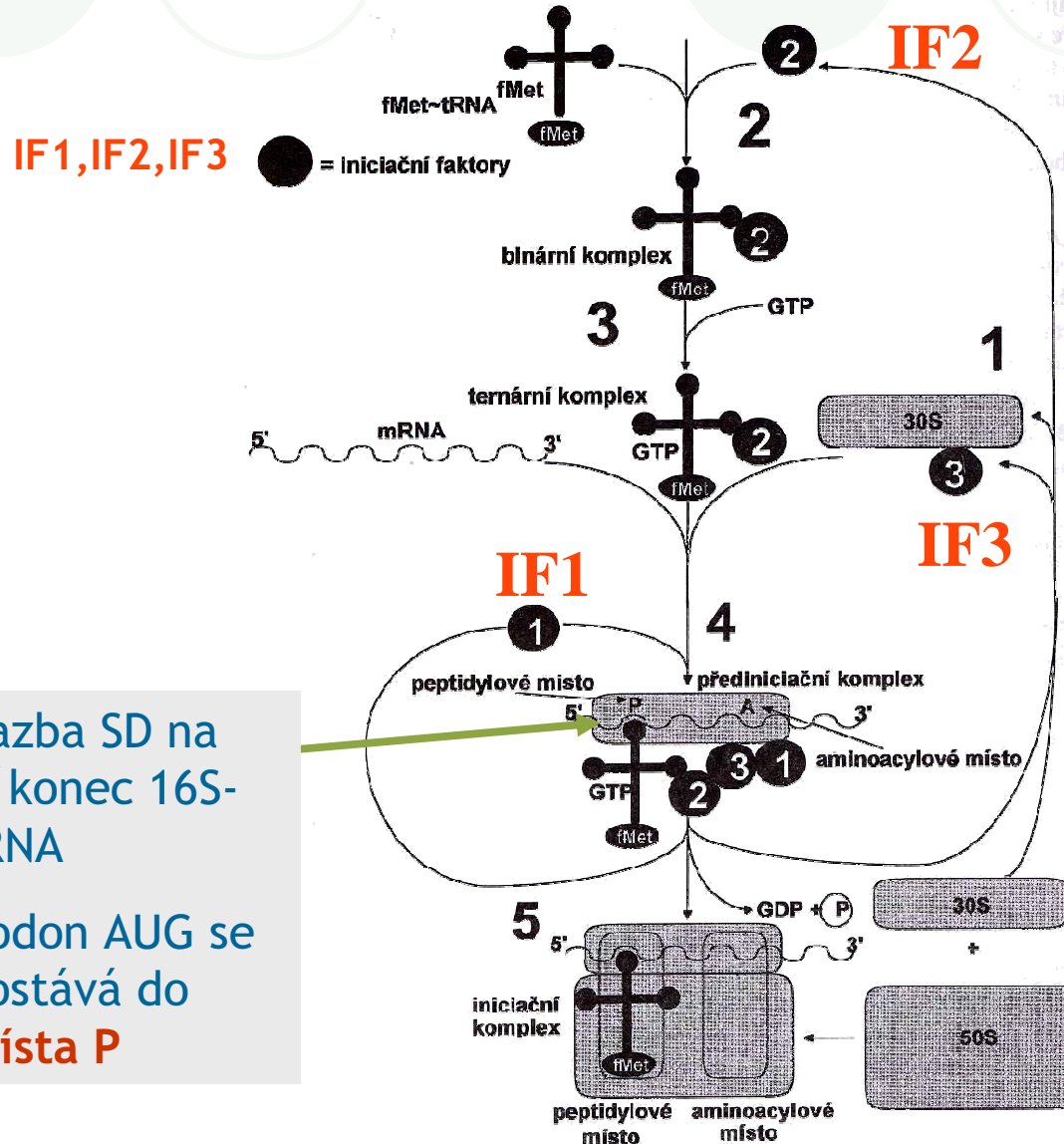


2. Elongace

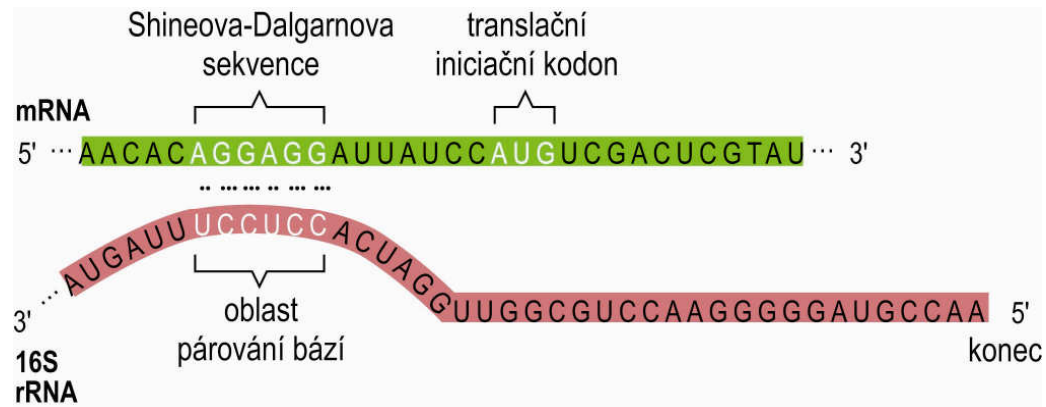
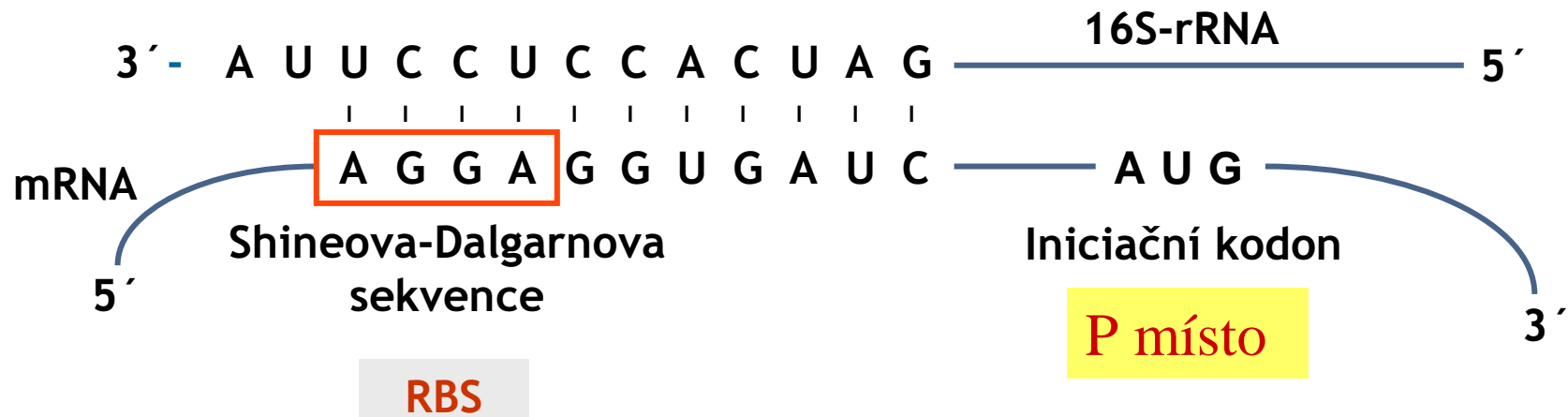
Iniciace translace u prokaryot (*E. coli*)



Iniciační fáze translace u prokaryot

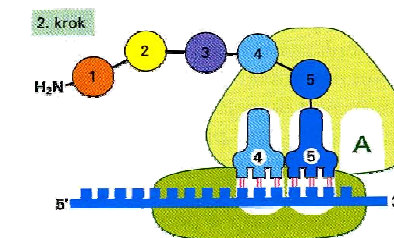
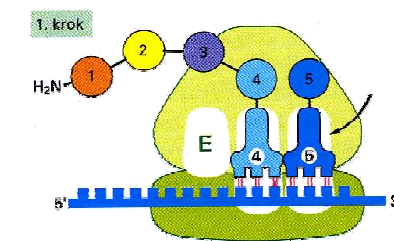
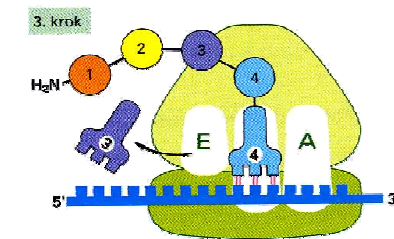
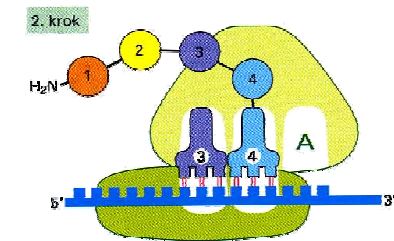
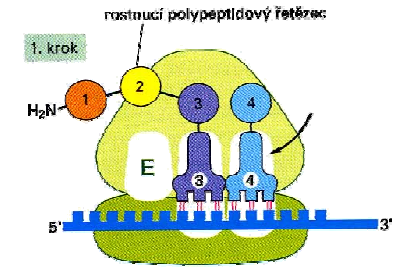


Vazba mRNA na 16S-rRNA



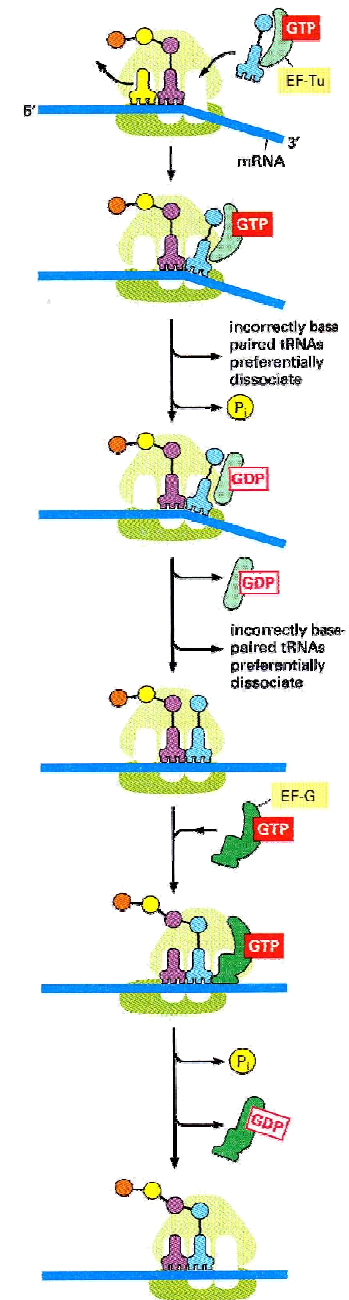
Elongační fáze translace

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

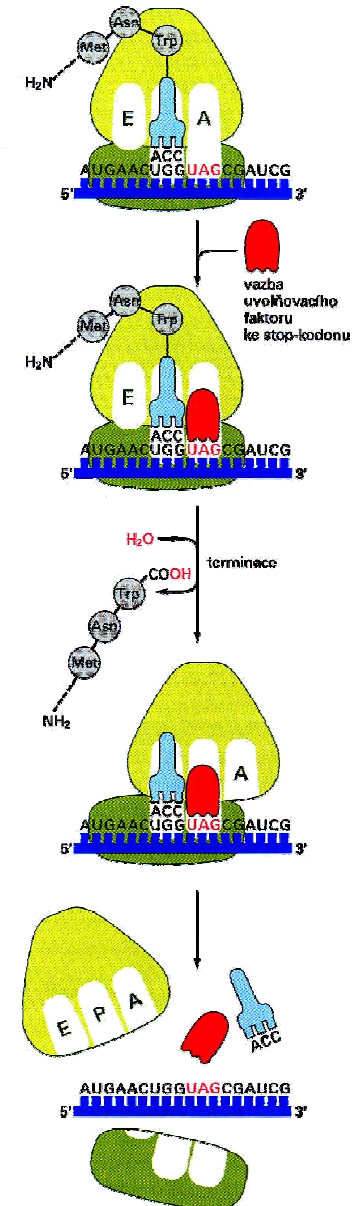
1. aa-tRNA pevně vázaná na EF-Tu se přechodně váže s kodonem v A-místě 30S.
2. aa-tRNA se nachází v hybridním místě, párování kodon-antikodon vede k hydrolýze GTP navozené EF-Tu. Chybné zařazení tRNA zpomaluje hydrolýzu a aa-tRNA tak může opustit ribozom ještě před vytvořením peptidové vazby.
Časový 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**.



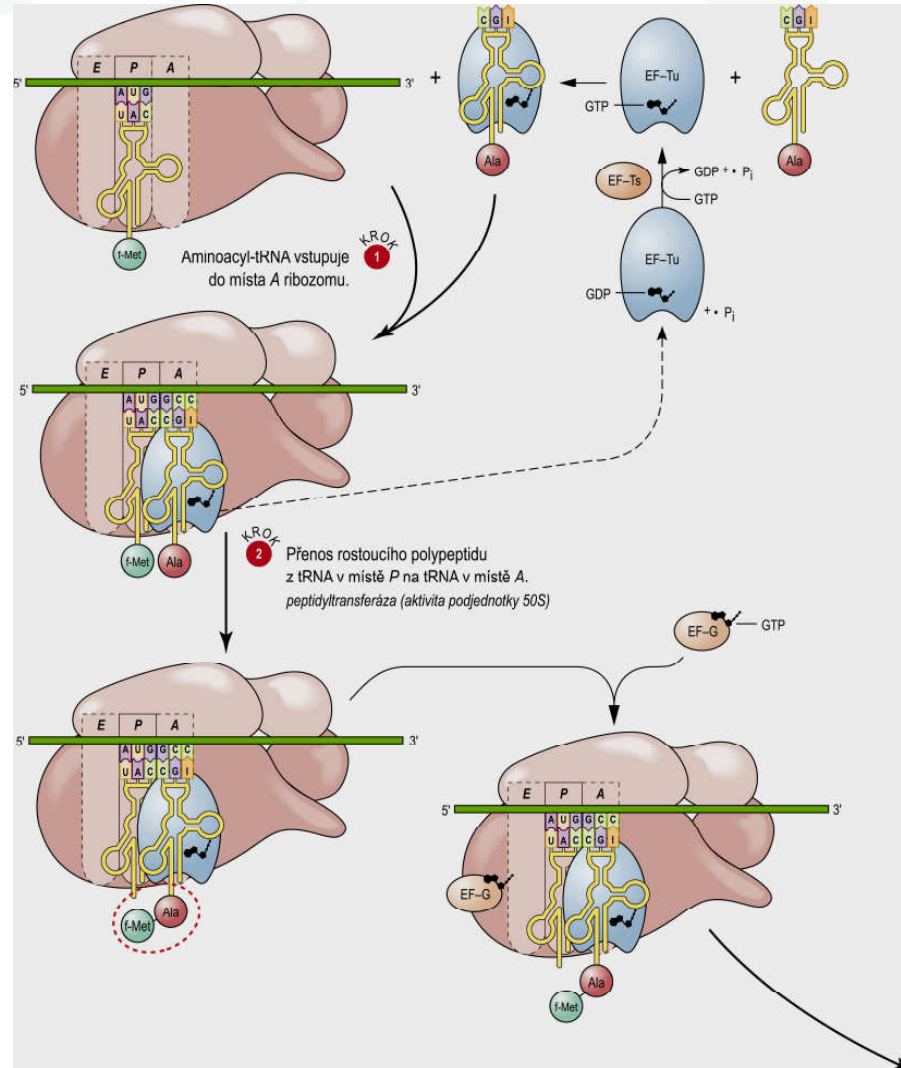
Rychlost syntézy: 2-20 aminokyselin/sec

Terminace translace

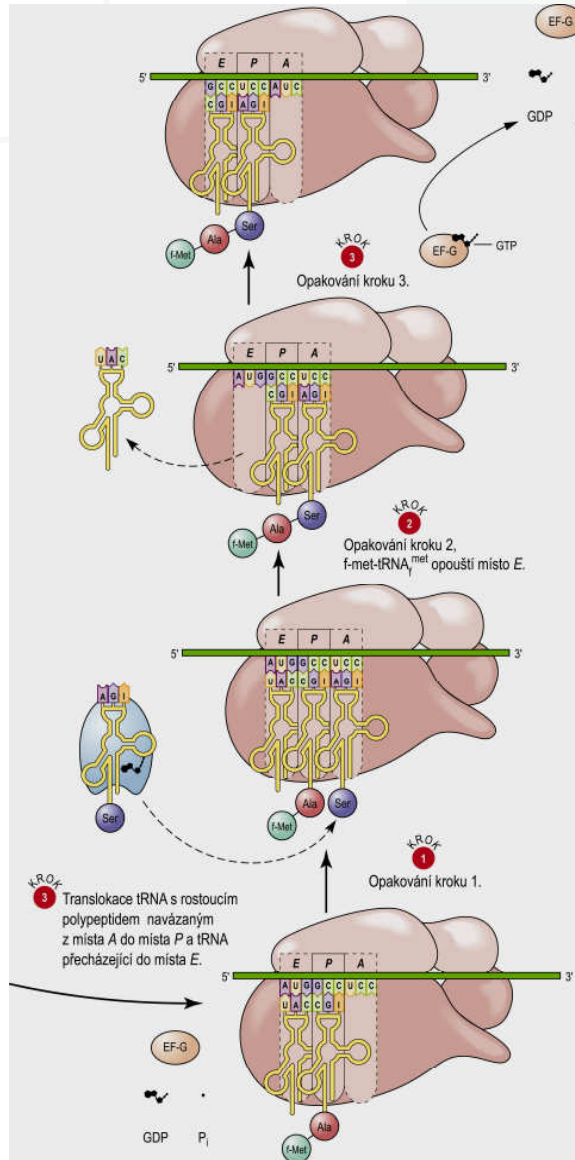
1. Do místa A se dostává terminační kodon na mRNA
2. V místě A se na terminační kodon váže terminační (uvolňovací) faktor (RF1, RF2 n. RF3)
terminační faktory = molekulární mimikry
3. Změna aktivity peptidyltransferázy vede k uvolnění karboxylového konce peptidového řetězce z P místa, volná tRNA se přesouvá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



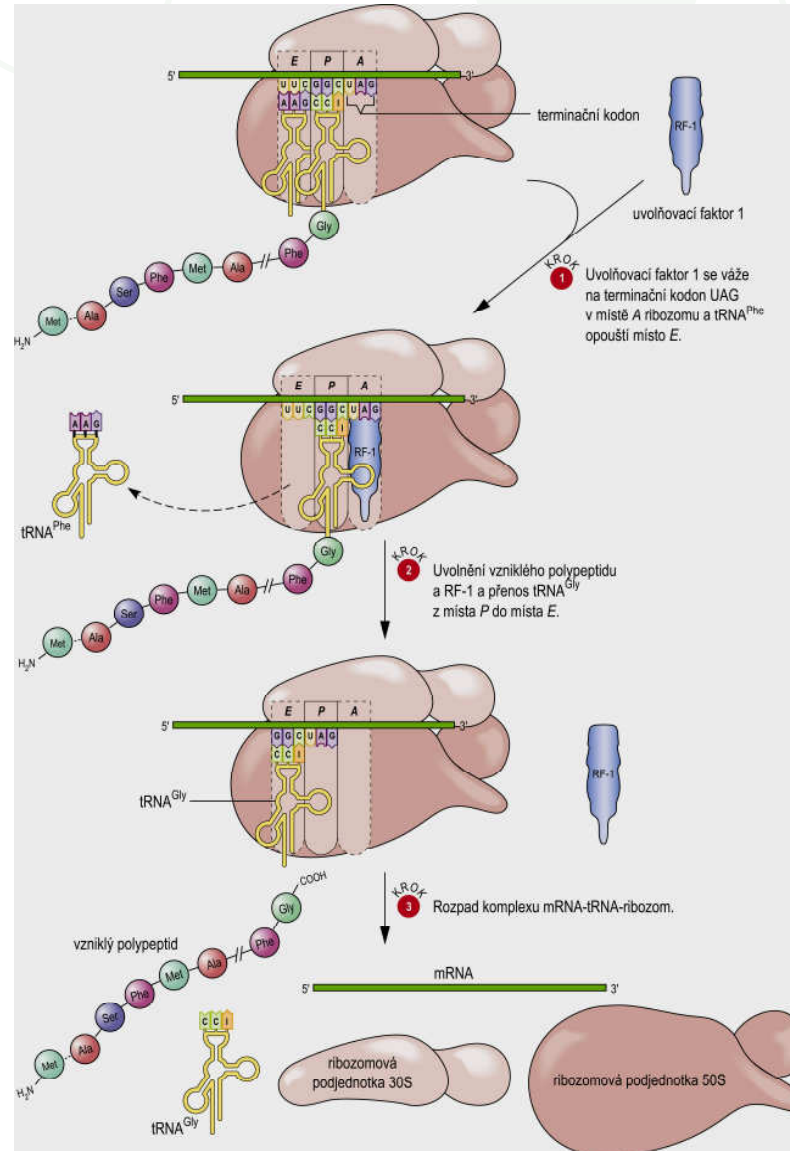
Elongace polypeptidového řetězce (1)



Elongace (2)



Terminace polypeptidového řetězce

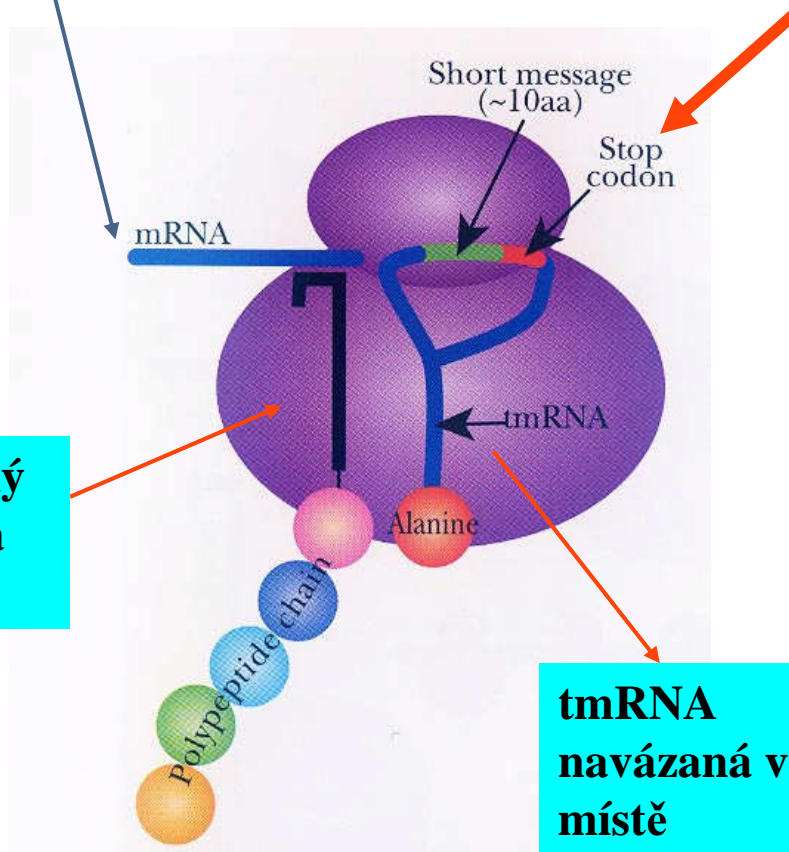


Zakončení translace molekulou tmRNA

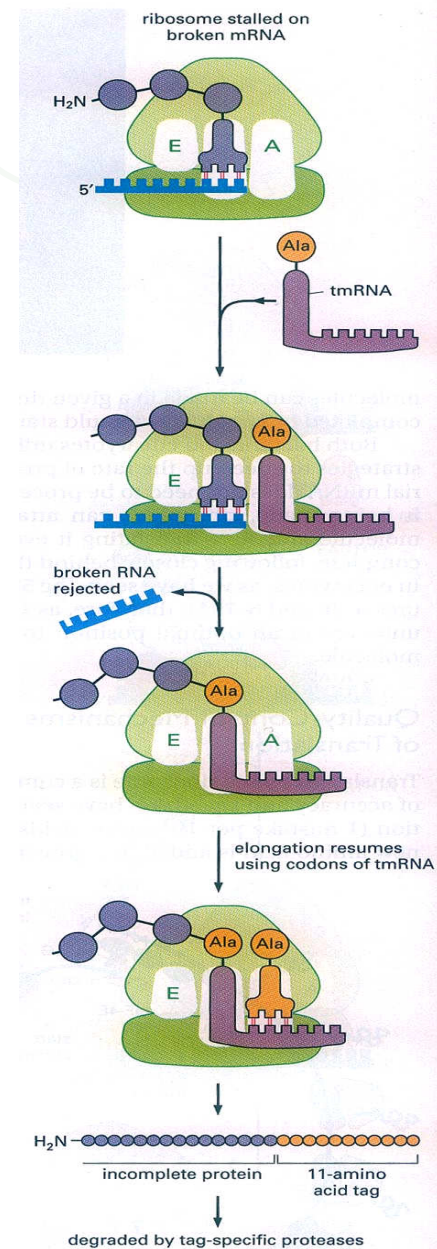
tmRNA (transfer/messenger)

mRNA s neúplnou délkou

Pozastavený ribozom na mRNA

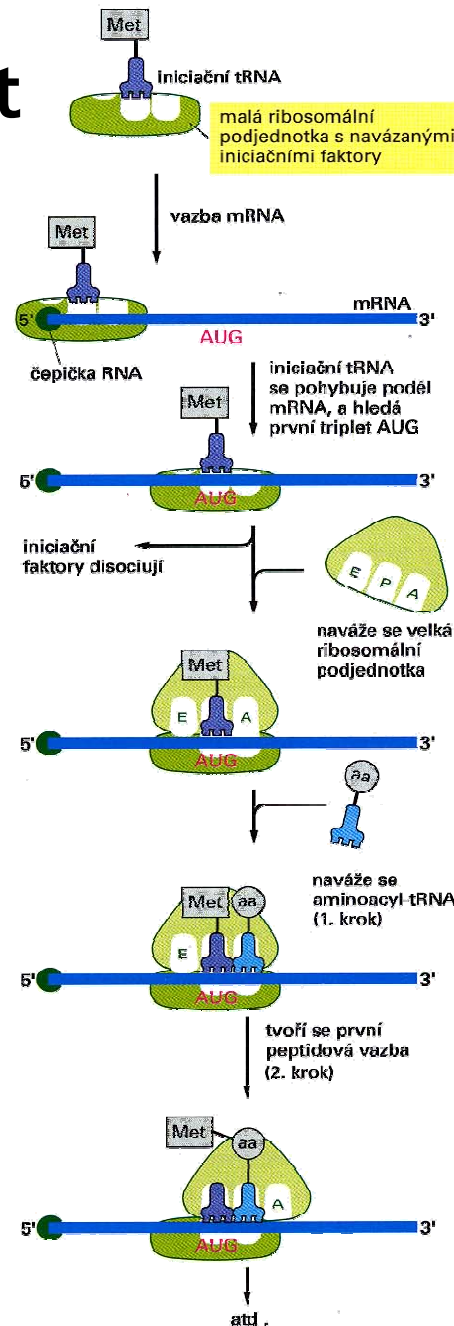


tmRNA navázaná v A místě



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)



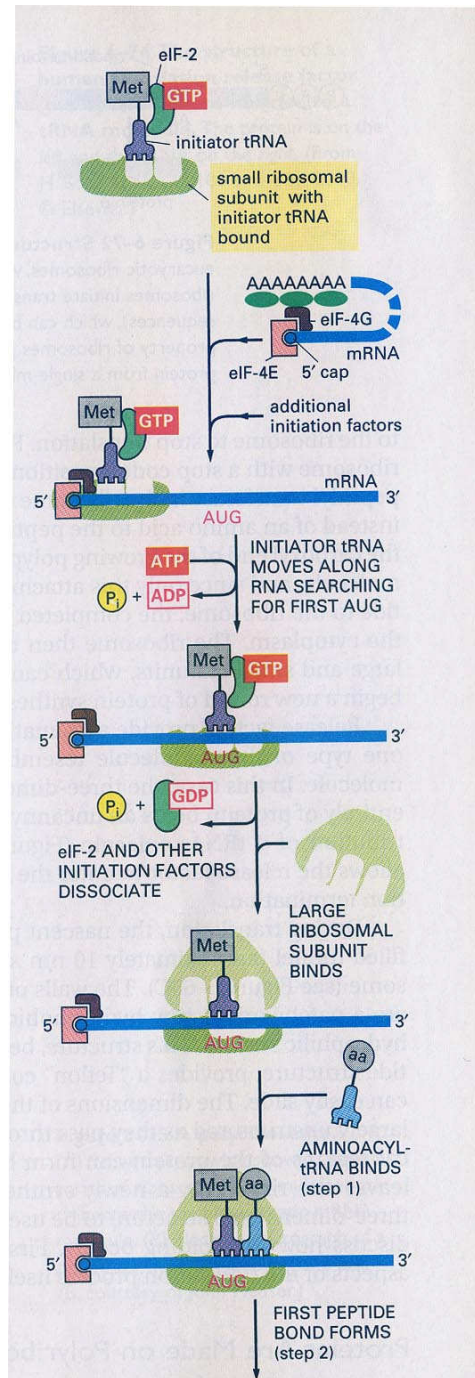
eIF4A a B se podílejí na rozmotání sekundární struktury mRNA

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 mRNA a na eIF-4E = translatovány budou jen mRNA s úplnou délkou



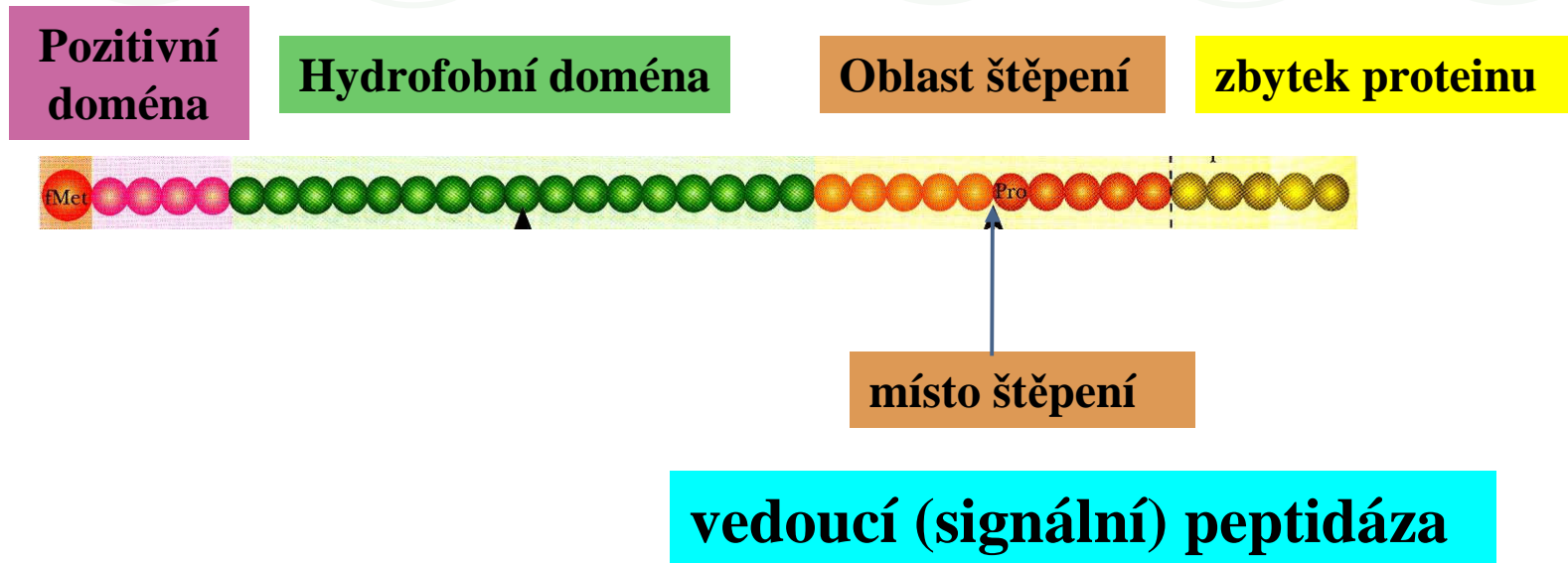
Struktura lidského terminačního faktoru eRF1 a jeho podobnost s molekulou tRNA

eRF1

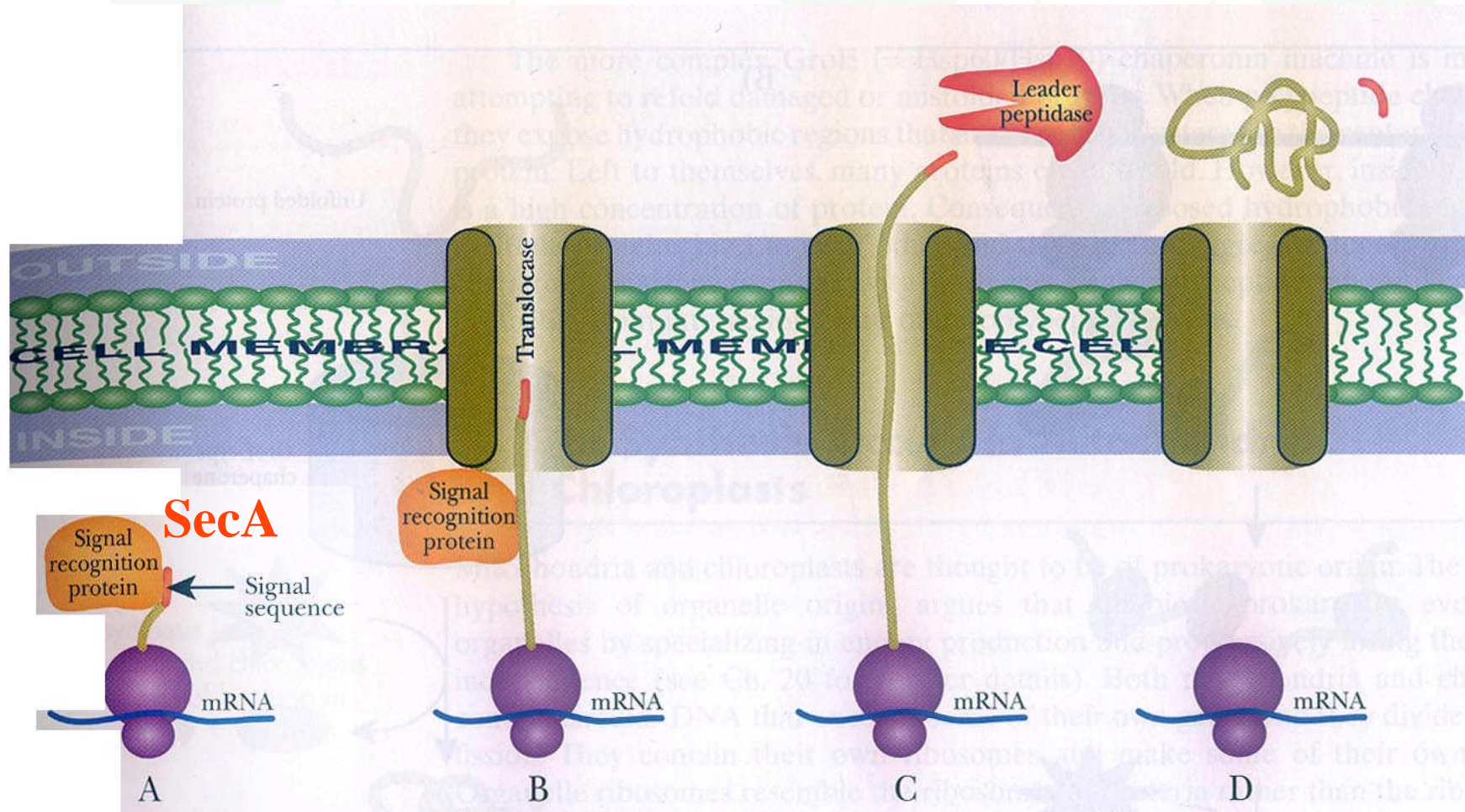
tRNA



Standardní **signální sekvence** exportovaných proteinů

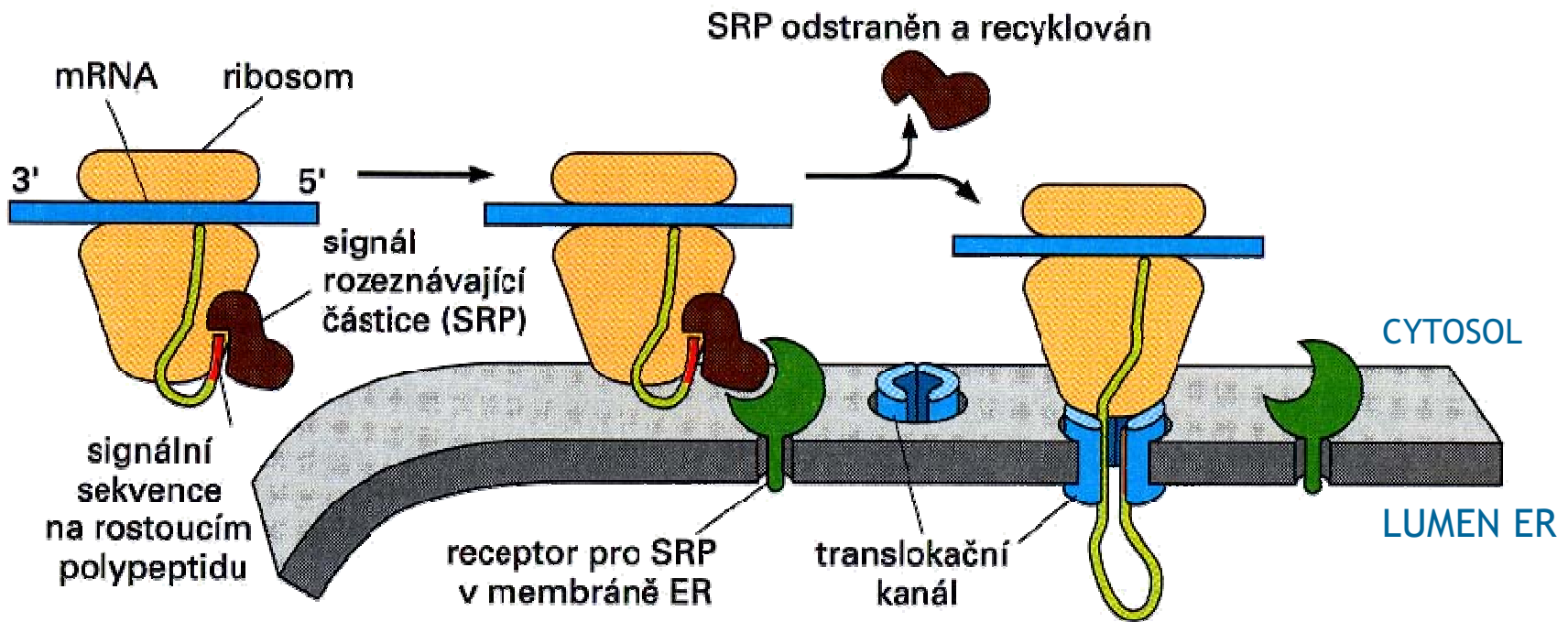


Kotranslační export proteinů u bakterií

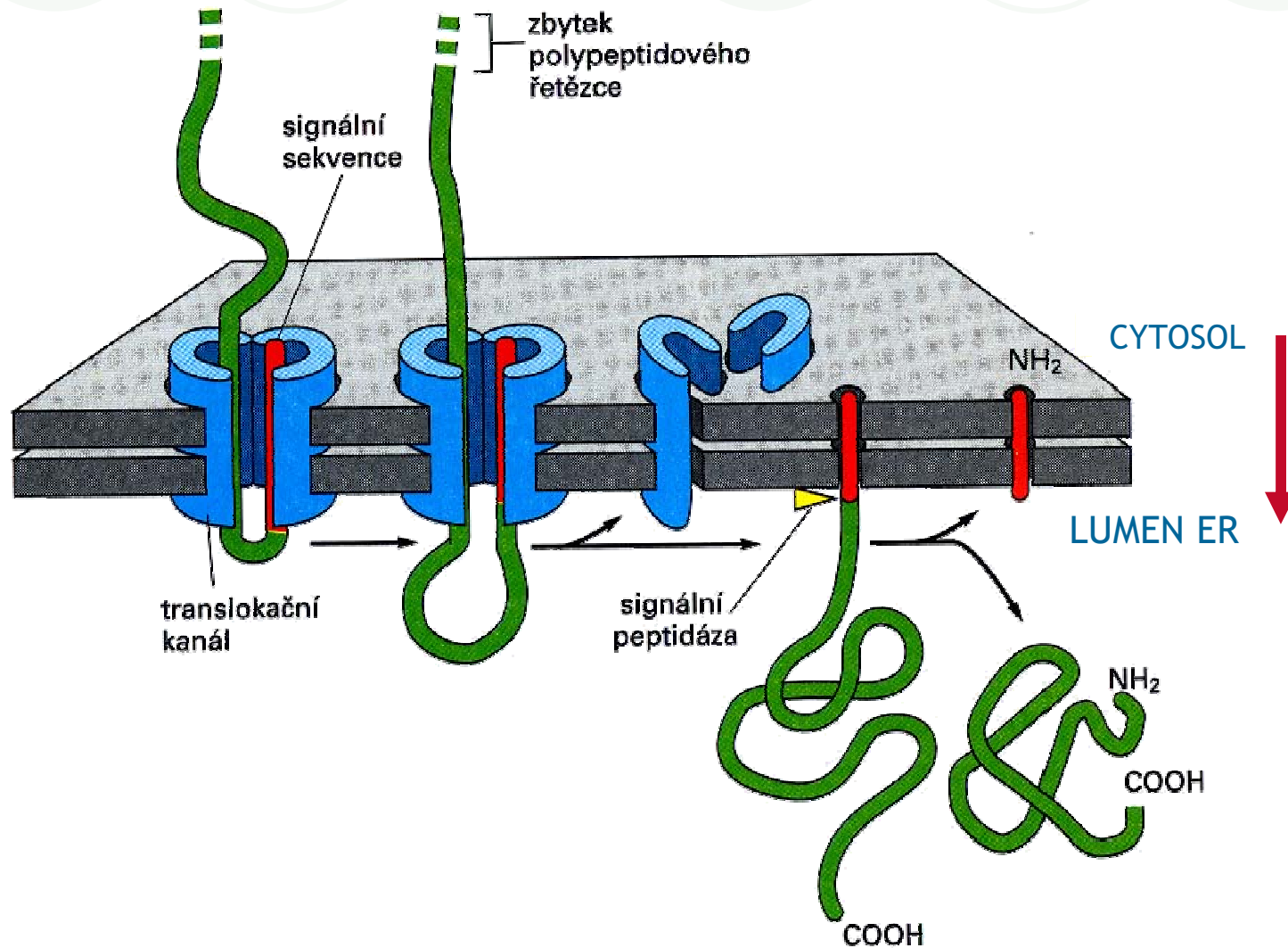


Syntéza extracelulárních a membránových proteinů

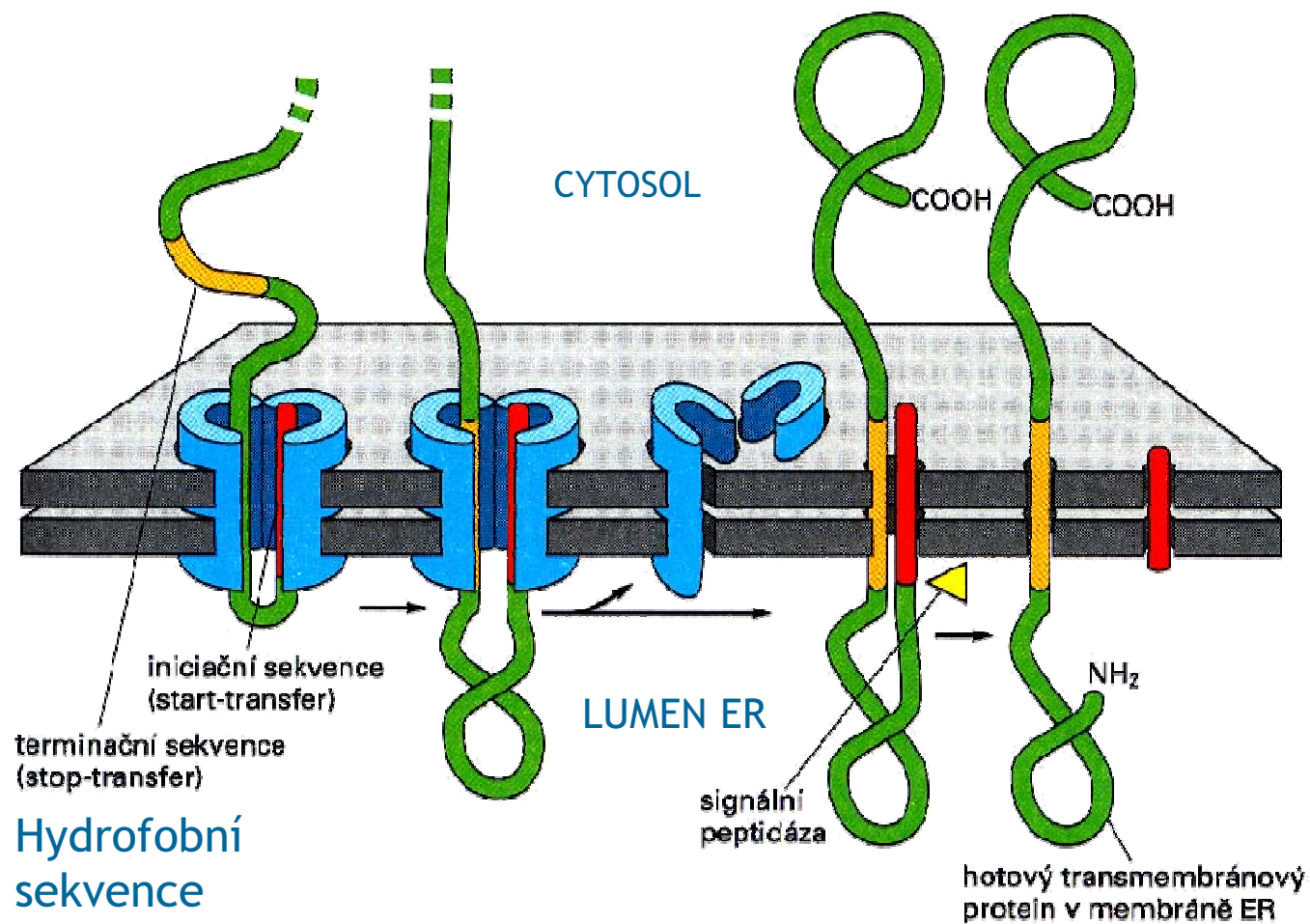
preprotein = polypeptid se signálním peptidem na N-konci



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)

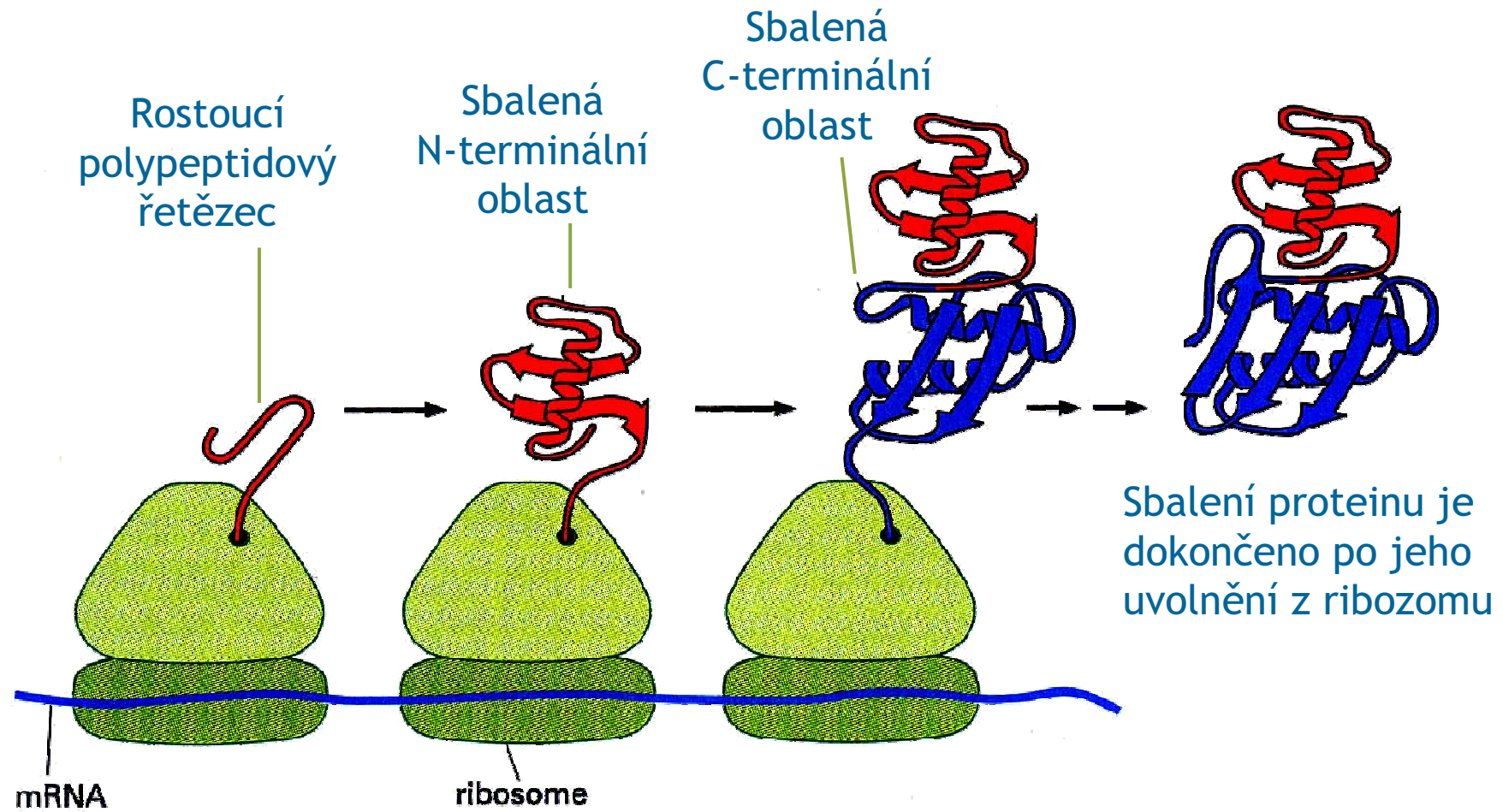
Mnohé modifikační enzymy se nacházejí v ER a Golgiho aparátu, někdy však dochází ke změnám až mimo buňku.

**Mikrozosomální
frakce**

Průběh vzniku funkčního proteinu

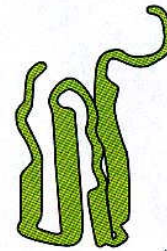
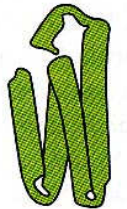
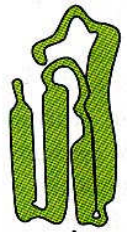
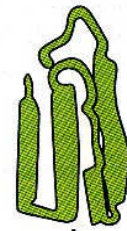
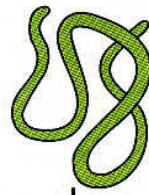


Kotranslační sbalování proteinu



Sbalování proteinů za účasti chaperonů

Nesbalený protein

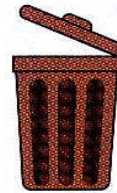


chaperone catalysis



chaperone catalysis

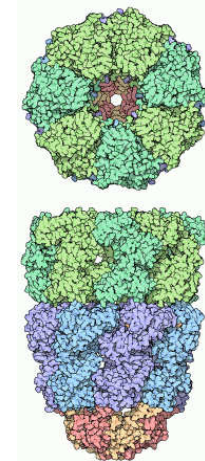
protease pathway



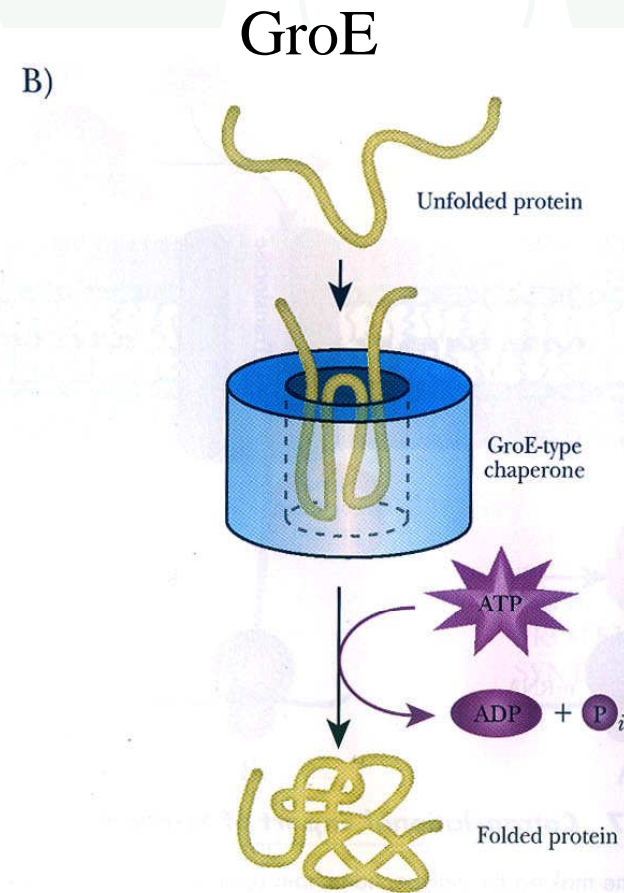
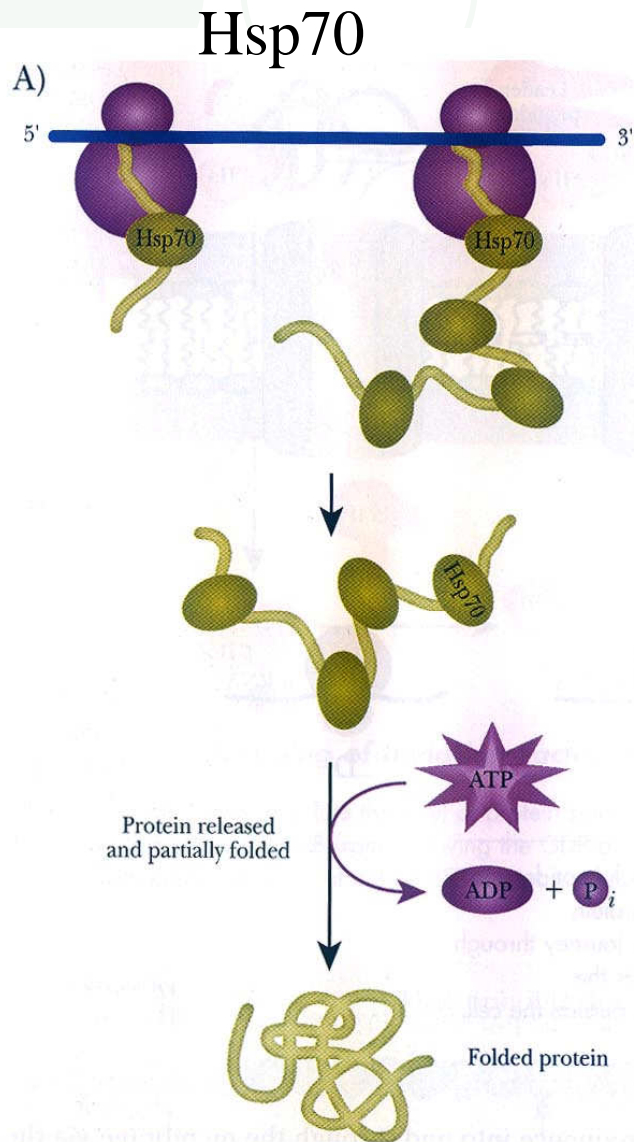
Správně sbalený protein

Molekulární chaperony/chaperoniny

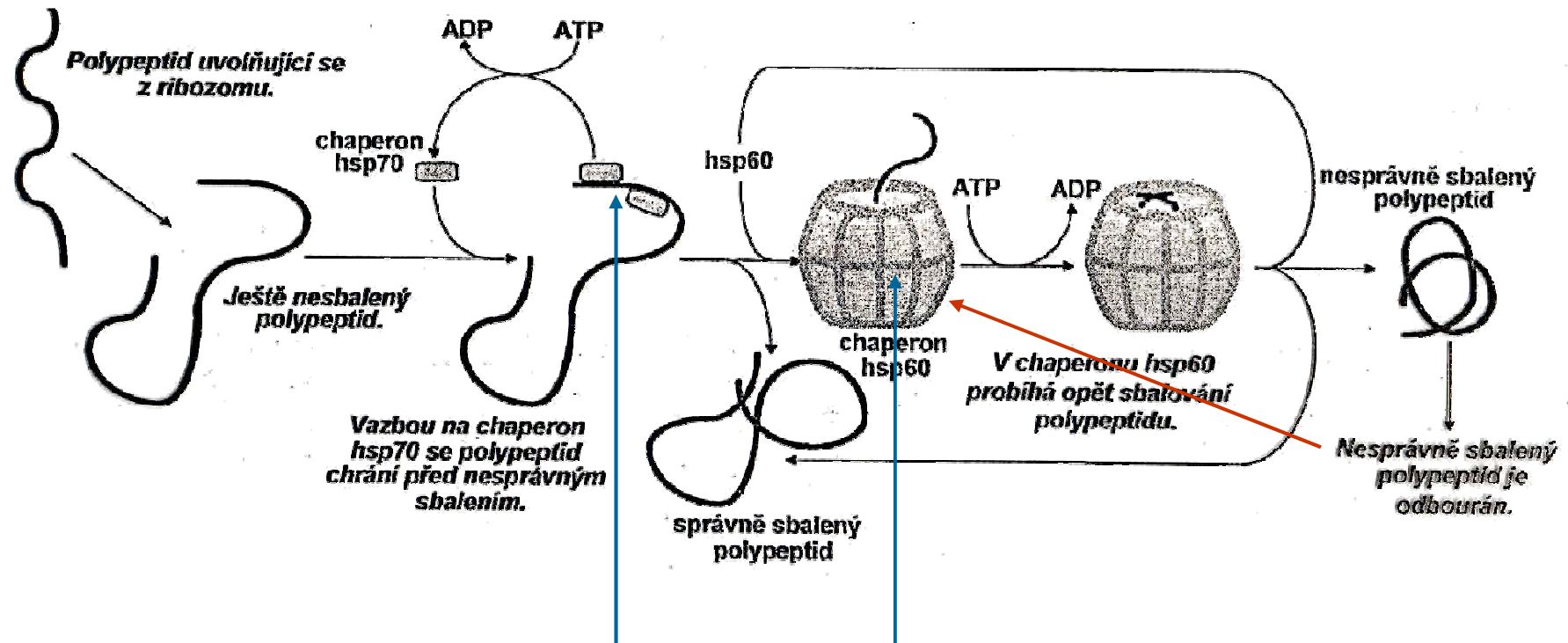
- speciální skupina proteinů podílejících se na sbalování polypeptidů (**zabraňují chybnému sbalování**)
- **hlavní rodiny chaperonů:** proteiny hsp60 a hsp70
 - **hsp70:** rozpoznávají krátké úseky polypeptidu tvořené hydrofobními aminokyselinami během jeho syntézy na ribozomu
 - **Hsp60 (GroE; Hsp60/Hsp10):** 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.

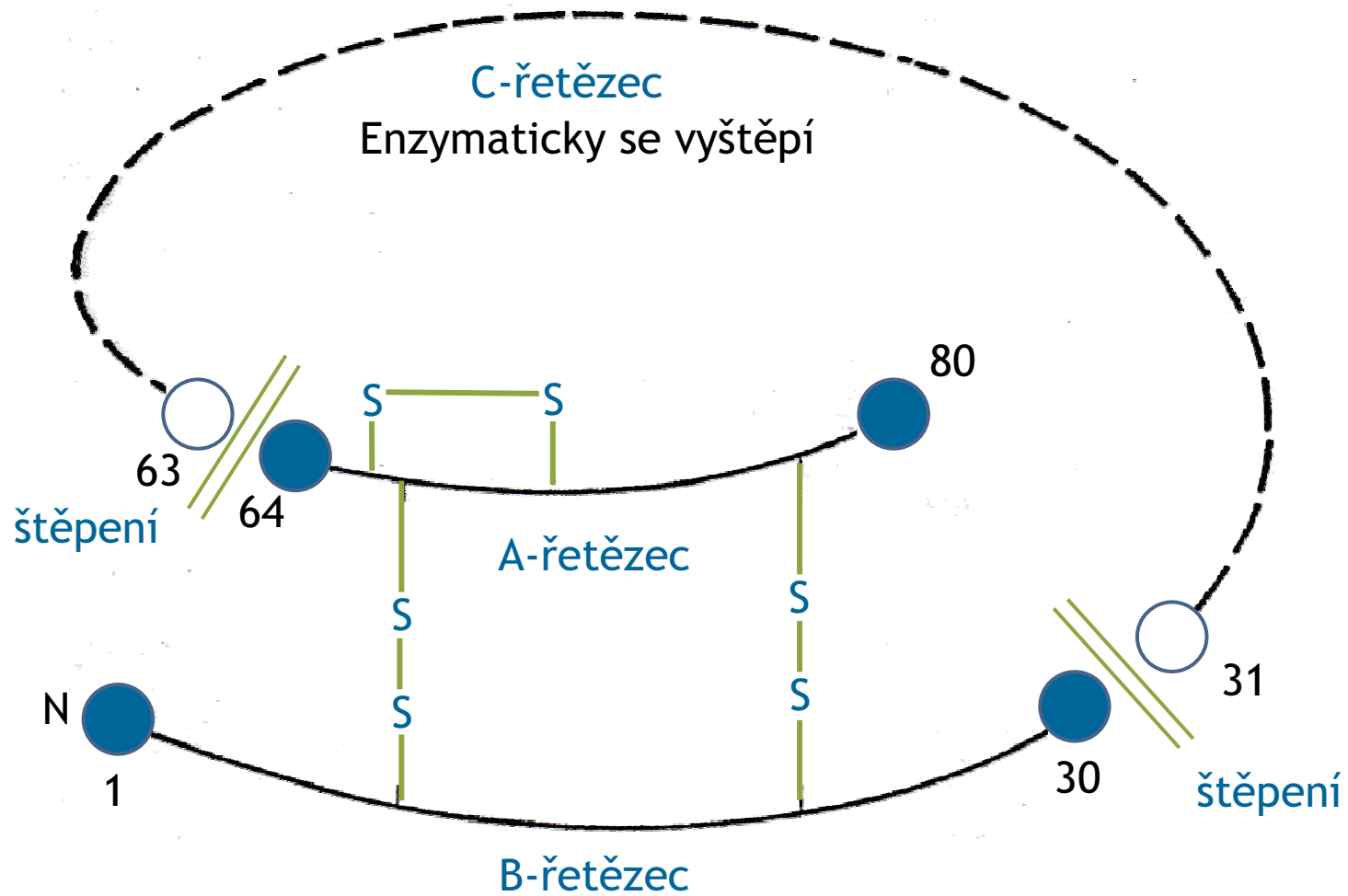
Další úlohy:

- transport
- disagregace denaturovaných proteinů (např. Hsp60)

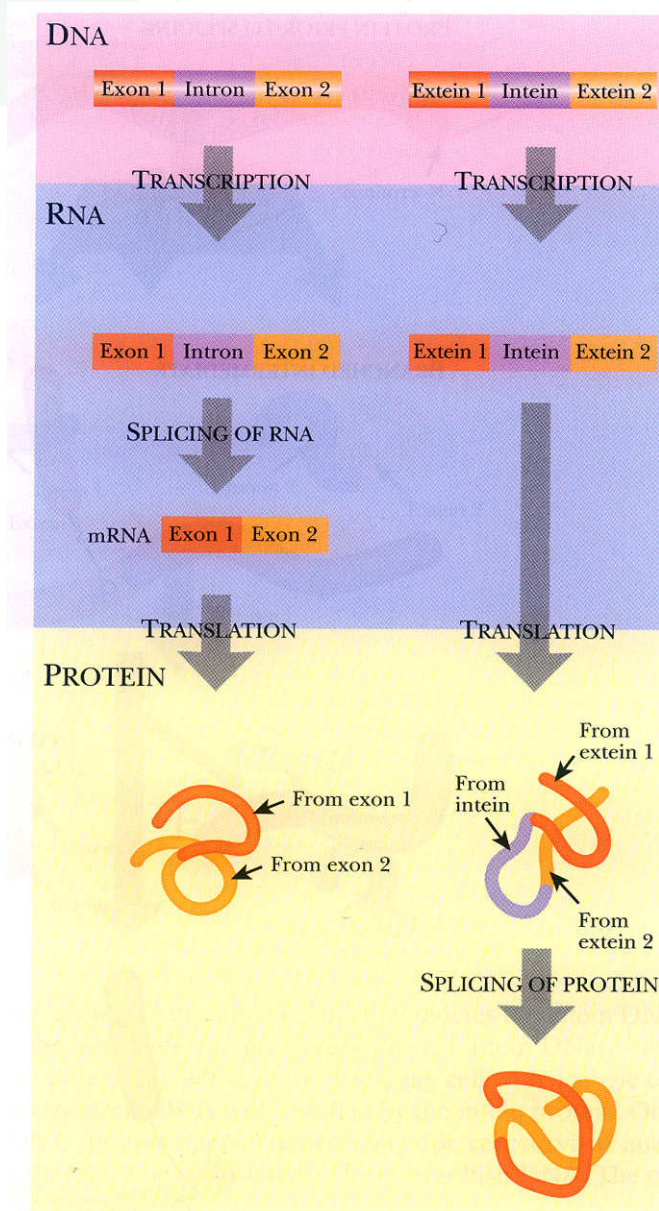
(GroEL, GroES)

hsp = heat shock protein

Posttranslační úprava proinzulínu

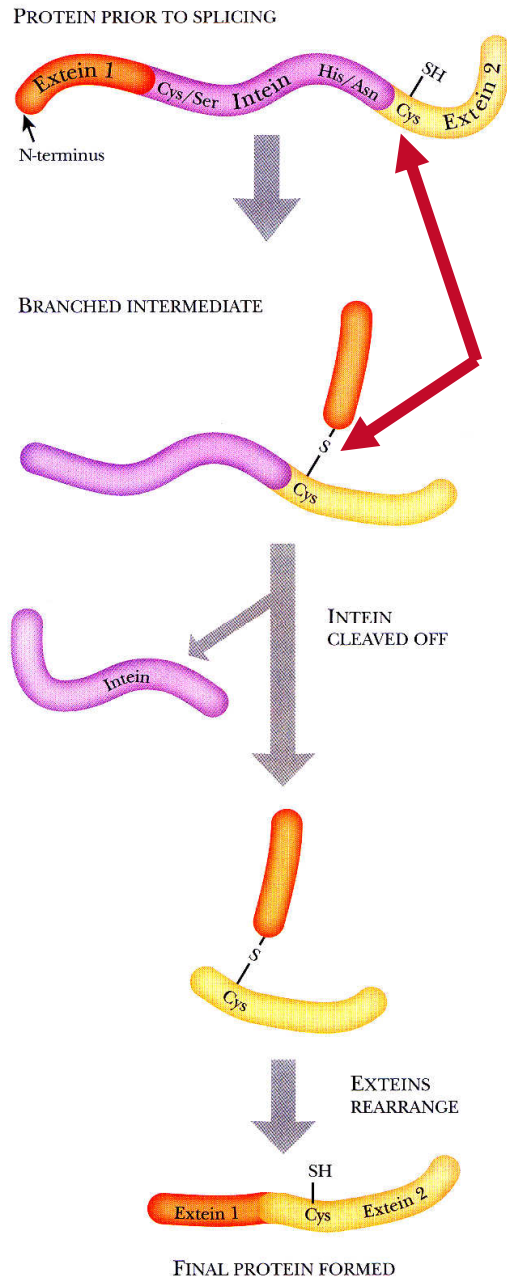


Srovnání způsobů odstraňování intronů a inteinů



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

Intein katalyzuje své vlastní vyštěpení



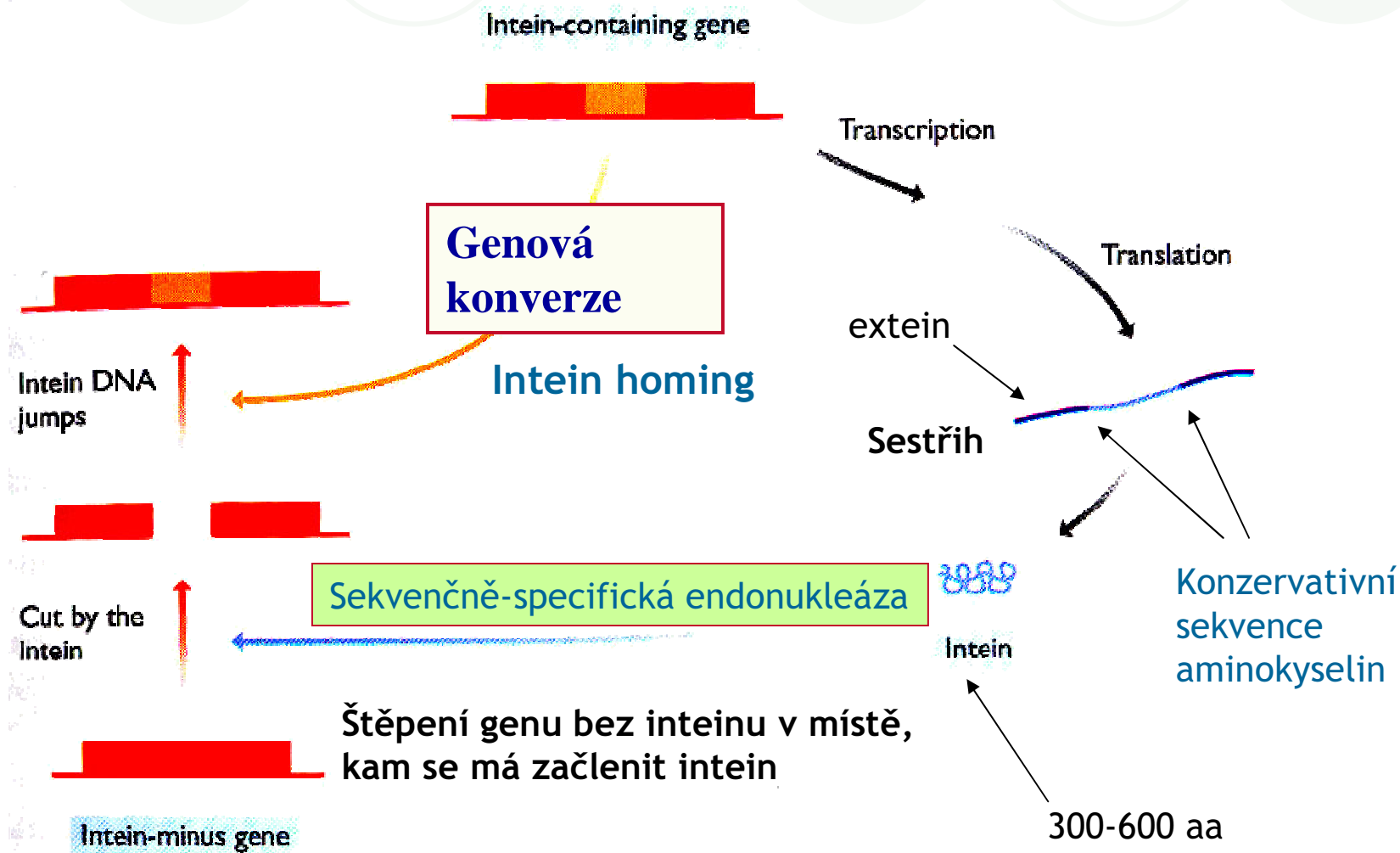
Průběh sestřihu inteinu

- probíhá ve dvou krocích

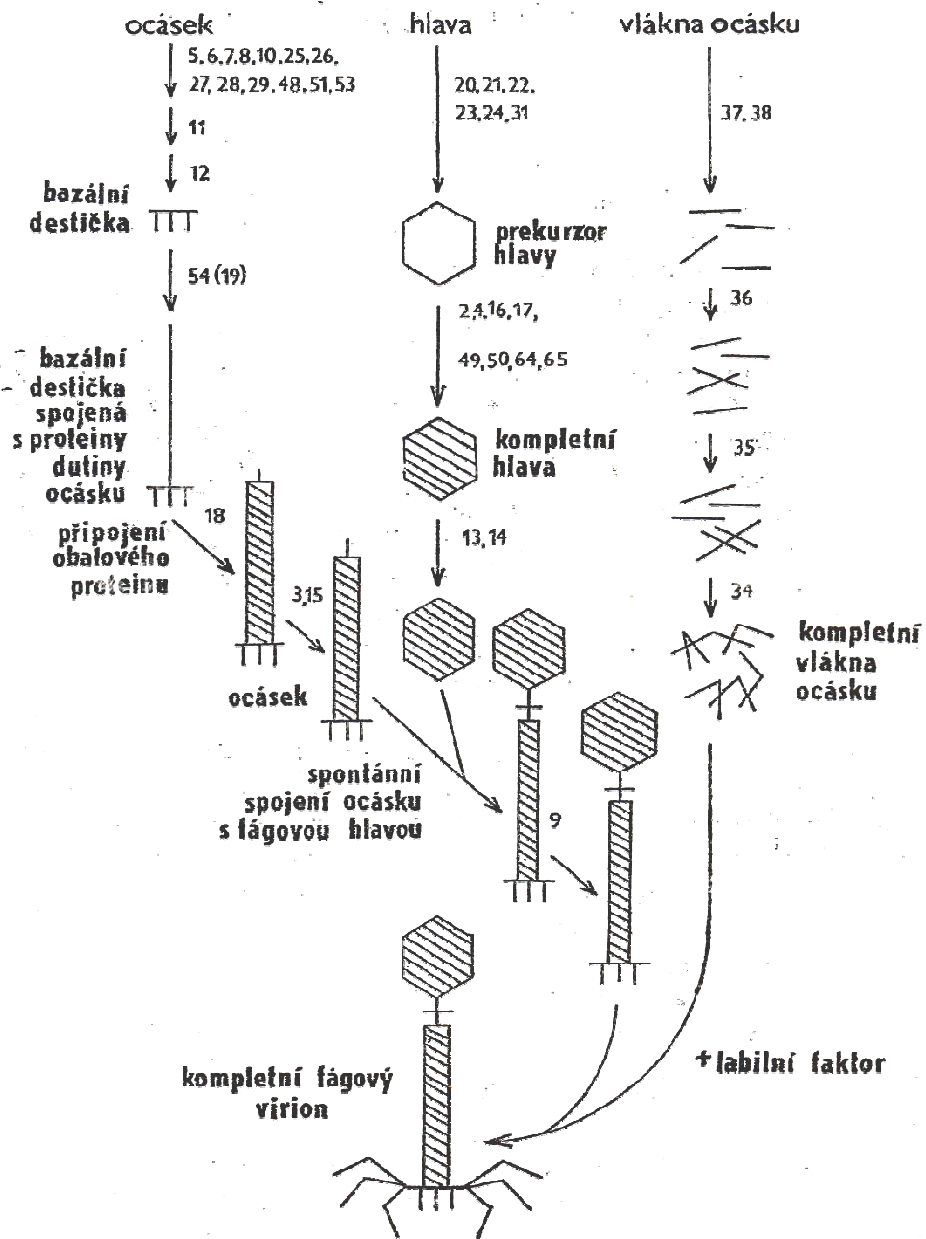
1. Extein 1 je uvolněn a připojen k cysteinu exteinu 2 – vzniká větvený intermediát
2. Inteín je vyštěpen a oba exteiny se spojí do zralého proteinu

Inteins are currently known in more than 50 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)

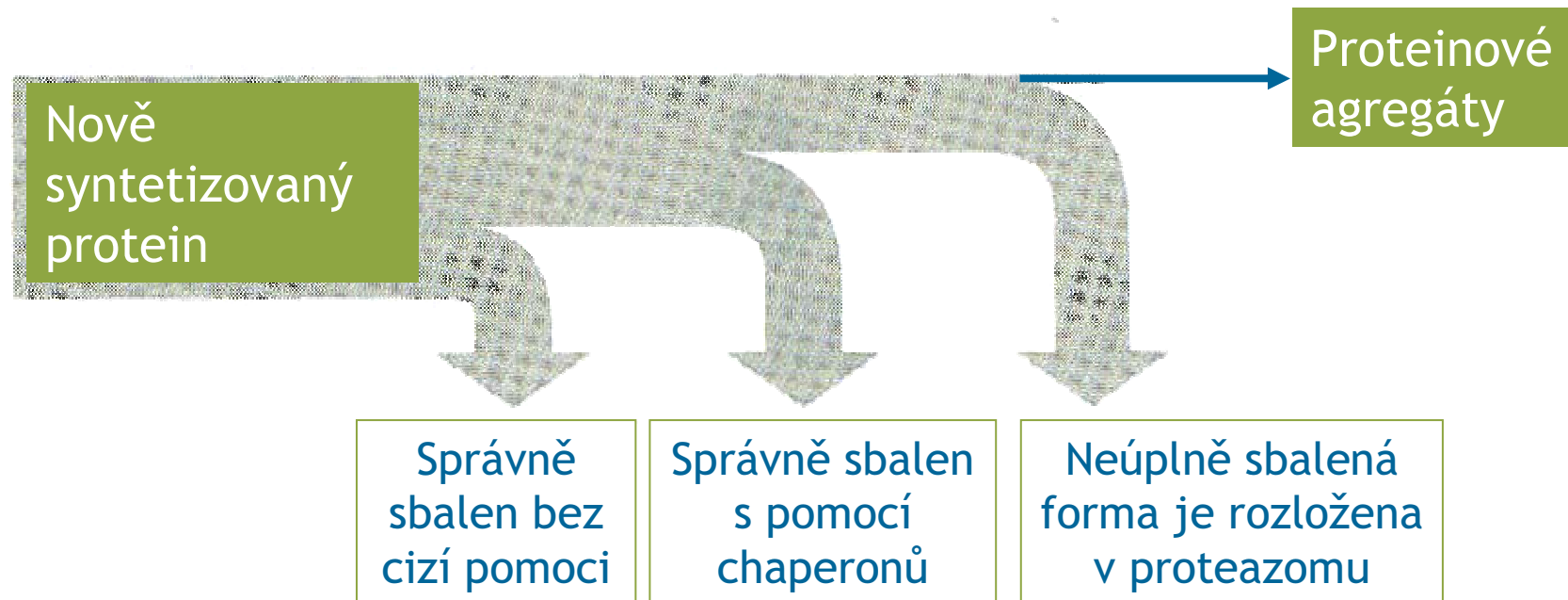


TŘI SESTAVOVACÍ ŘADY



Čísly jsou označeny
strukturní geny,
kterými jsou kódovány
proteiny fága

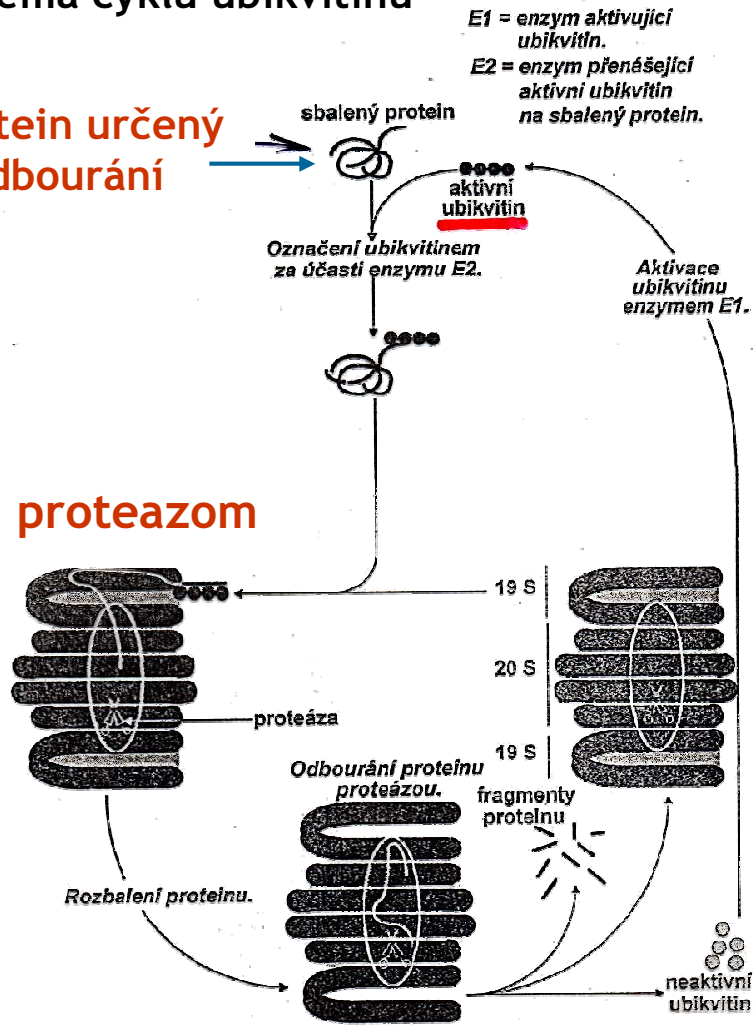
Buněčné mechanismy monitorující kvalitu proteinů po translaci



Odbourávání proteinů v proteazomech (eukaryota)

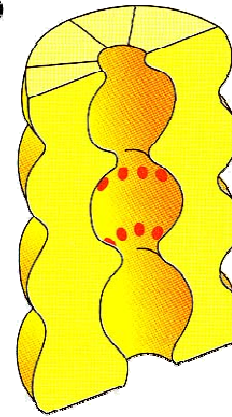
Schéma cyklu ubikvitinu

Protein určený k odbourání



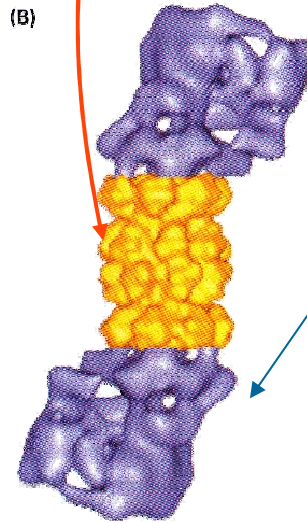
E1 = enzym aktivující ubikvitin.
 E2 = enzym přenášející aktivní ubikvitin na sbalený protein.

(A)



centrální cylindr
 aktivní místa proteáz

(B)



19S „cap“
 - váže označené proteiny

