Translace

- Překlad genetické informace z mRNA do polypeptidového řetězce probíhá ve směru 5[°]→
 3[°]
- DNA → RNA 4 znaky; proteiny 20 základních aminokyselin ⇒ minimální jednoznačný zápis pro všechny aminokyseliny (AK) je tripletový (42 = 16; 43 = 64) a je jednosměrný

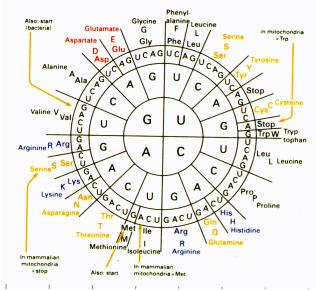
Rozluštění genetického kódu

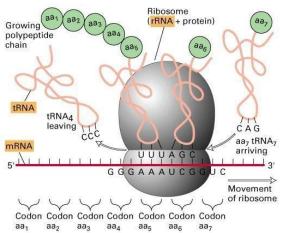
- zásadním objevem bylo rozluštění genetického kódu. K vyluštění přispěl i objev syntézy
 organických látek. Syntetizovaly se stejné nukleové kyseliny a vznikly homopolymery.
 Když se daly do roztoku s bakteriemi, tak vznikly nové oligopeptidy
- Vědci měli možnost syntetizovat RNA, ale v počátcích pouze homopolymery. Pokrokem bylo využití biotechnických metod. Byly připravenay bezbuněčné lyzáty, které byly schopny translatovat in vitro exogenně přidanou RNA.
- začalo se zkoumat, kolika X-pletový je genetický kód. Vědci udělali heteropolymer, kde se střídalo ACACACAC: kdyby byl kód dupletový, tak by se tato sekvence četla po AC nebo CA a do polypeptidu by se řadily neustále stejné AMK. Ale vznikl polypeptid se dvěma různými AMK

 proto musí genetický kód být tripletový
- 1960 1966 Marshall Nirenberg, H. Gobind Khorana, S. Ochoa, Sydney Brenner, Francis Crick a mnozí další rozluštili genetický kód
 - o Nirenberg
 - genetický kód je tripletový
 - 20 zkumavek s radioaktivně značenou AMK, přidali UUU syntéza řezězce AMK a zjistili, co se nasyntetizovalo (Phe)
 - Zopakovali pro A, C (AAA => Lys; CCC => Pro)
 - Rozluštění 50 kodónů
 - spočítali, jaká AMK má jaký poměr nukleotidů v tripletu
 - Khorana
 - rozluštění 11 kodonů (celkem rozluštěno 61)
 - syntéza dlouhých molekul RNA složených z přesného pořadí bází → translace a něco vzniklo
 - (UC)_n Ser, Leu UCU, CUC
 - (UUC)_n Phe, Ser, Leu UUC, UCU, CUU
 - (UUAC), Leu, Tyr, Thr UUA, UAC, ACU

o Brenner

- rozluštil zbývající tři kodony stop kodony mutantní bakteriofágové mají zkrácené polypeptidy změnil jednu bázi a vznikl kodón, ke kterému nelze přiřadit AK
- všimli si, že mnoho translací začíná methioninem iniciační kodón

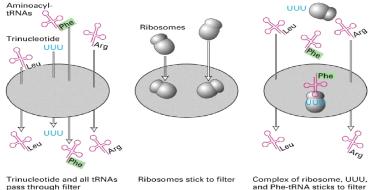




Tato tabulka ukazuje všech 64 možných kodónů a aminokyseliny, které kódují ∦univerzální pro všechny

organismy na světě – neexistuje samostatná tabulka pro koně, myš, bakterie,...) 2. báze U С G UGU (Cys/C)Cystein UUU (Phe/F)Fenylalanin UCU (Ser/S)Serin UAU (Tyr/Y)Tyrosin UGC (Cys/C)Cystein UAC (Tyr/Y)<u>Tyrosin</u> UAA Ochre (*Stop*) UUC (Phe/F)Fenylalanin UCC (Ser/S)Serin U UGA Opal (Stop) UUA (Leu/L)Leucin UCA (Ser/S)Serin UGG UUG (Leu/L)Leucin, Starte UCG (Ser/S)Serin UAG Amber (Stop) (Trp/W)Tryptofan CUU (Leu/L)Leucin CCU (Pro/P)Prolin CAU (His/H)Histidin CGU (Arg/R)Arginin CUC (Leu/L)Leucin CCC (Pro/P)Prolin CAC (His/H)Histidin CGC (Arg/R)Arginin С CUA (Leu/L)Leucin CCA (Pro/P)Prolin CAA (Gln/Q)Glutamin CGA (Arg/R)Arginin CUG (Leu/L)Leucin, Starf CCG (Pro/P)Prolin CAG (Gln/Q)Glutamin CGG (Arg/R)Arginin AUU (Ile/I)Isoleucin, Start² ACU (Thr/T)Threonin ACC (Thr/T)Threonin AAU (Asn/N)Asparagin AGU (Ser/S)Serin AUC (Ile/I)Isoleucin AUA (Ile/I)Isoleucin AAC (Asn/N)Asparagin AGC (Ser/S)Serin ACA (Thr/T)Threonin AAA (Lys/K)Lysin AGA (Arg/R)Arginin AUG (Met/M)Methionin, ACG (Thr/T)Threonin AAG (Lys/K)Lysin AGG (Arg/R)Arginin Start¹ GUU (Val/V)Valin GCU (Ala/A)Alanin GAU (Asp/D)Kys. asparagová GGU (Gly/G)Glycin GUC (Val/V)Valin GCC (Ala/A)Alanin GAC (Asp/D)Kys. asparagová GGC (Gly/G)Glycin GUA (Val/V)Valin GCA (Ala/A)Alanin GAA (Glu/E)Kys. glutamová GGA (Gly/G)Glycin GUG (Val/V)Valin, Start GCG (Ala/A)Alanin GAG (Glu/E)Kys. glutamová GGG (Gly/G)Glycin <u>Kodón</u> AUG kóduje methionin a slouží jako iniciační místo: první AUG v mRNA je místo, kde translace začíná <u>Toto</u> je startovní <u>kodón</u> pouze u některých prokaryot

- Jedna ze tří možností čtení nukleotidové posloupnosti = čtecí rámec
- AMK nejsou schopny rozeznat triplety (kodóny) samy o sobě; *adaptorovou molekulou je tRNA* a molekulárním strojem pro zprostředkování kontaktu mRNA s *aminoacyl-tRNA* a následnou syntézu polypeptidu je *ribozóm*



Experiment: máme vazebně kompetentní látku, která umožňuje navázání tRNA a trinukleotid do ribozómu. Všechny tRNA jsou nabité AMK, pouze jedna je radioaktivně označena. Tento systém se filtruje přes filtry s otvory, které propouští tRNA s AMK, ale nepropouští ribozom. Když přefiltrujeme tento roztok skrz filtr, usadí se nám na něm radioaktivní látka, tak se nám AMK-tRNA navázala na ribozom → takto byly určeny triplety a k nim jejich AMK

Základní charakteristiky genetického kódu

- pravidlo pro převod posloupnosti nukleotidů do posloupnosti AMK = genetický kód
- největší variabilita je na třetím místě kodónu. AMK je nejvíce determinována druhým nukleotidem kodónu (převážně polární AMK – purin, nepolární AMK – pyrimidin)
- některé AMK jsou kódovany pouze 1 tripletem = methionin, tryptofan; jiné AMK jsou kódovány 2 triplety; jiné AMK mají více tripletů = jsou synonymní → genetický kód je degenerovaný.
- Byly objeveny triplety, které jakoby nic nekódovaly (= nonsense). Později se objevilo, že kódují ukončení polypeptidu → jsou to UAA, UGA, UAG = stop-kodóny
- Nadbytek tripletů (kodónů) znamená, že některé kódují stejnou AMK jsou svnonvmní
- Genetický kód je *univerzální* a změny jsou zakázány (odchylky existují např. v mitochondriích)
 - dříve byl společný předek, u kterého byla translace stejná, jakou známe dnes → 0 translační aparát je podobný u archae, bakterií a eukaryot
 - vývoj se musel zastavit v určitém období, kdy by další vývoj vedl k velkému poškození organismů, tj. v období, kdy podstatnou roli začali hrát proteiny
 - kdyby byl vývoj nepřestal, tak by dosud vzniklé proteiny byly poškozené
 - frozen accident theory Crick: DNA se nemůže dál vyvíjet, jinak by všechno zkolabovalo. Není to ale pravda – chloroplastový a mitochondriální DNA se docela
- existují výjimky, kde se translace trochu liší od ostatních organismů
 - mitochondrie mají jednodušší translaci a některé své funkce mají přeneseny do jádra "hostitelské" buňky
 - některé kvasinky mají výjimky v rozpoznávání kodonu a AMK (normálně se za CUG zařazuje leucin, ale ony zařazují serin)
- Všechny nascentní polypeptidové řetězce jsou zahájeny N-formylmetioninem (prokaryota) nebo methioninem (eukaryota) určeným iniciátorovým kodónem AUG resp. výjimečně GUG (prokaryota). GUG uvnitř polypeptidu kóduje valin
- Syntéza polypeptidu je ukončena na nesmyslném (nonsense, terminačním) tripletu:
 - \circ UAA = ochre
 - UAG = amber; výjimečně kóduje pyrolysin
 - UGA = opal; výjimečně kóduje selenocystein
- mezi 20 základních AMK se dnes začínají počítat další 2 AMK: selenocystein a pyrolysin

- základní (přirozené) AMK jsou definovány jako AMK, které se vkládají do
 polypeptidového řetězce během translace (po skončení syntézy polypeptidu probíhají
 posttranslační úpravy, které mění základní AMK na další nestandardní AMK)
- přes cis-element se **selenocystein** vkládá do řetězce polypeptidu; jeho kodónem je UGA; selenocystein se vyskytuje ve všech organismech, ale pouze v málo proteinech
 - Vložení selenocysteinu do polypeptidového řetězce: selenocysteinyl-tRNA, která rozpoznává UGA STOP kodón ve specifických případech.
 - U bakterií ho rozpoznává pouze tehdy, pokud se ve směru 3° od STOP kodonu vyskytuje sekundární struktura selenocysteine insertion (tato struktura je rozpoznána elongačním faktorem, který přináší selenocysteinyl-tRNA do ribosomu a umožní překonat STOP kodon, jinak by translace skončila).
 - O U eukaryot se selenocystein insertion nachází v 3 ' *UTR* a může takhle fungovat pro více STOP kodónů v rámci otevřeného čtecího rámce.
 - Neexistuje speciální selenocysteinyl-aminoacyl-tRNA-syntetasa, ale selenocysteinyl-tRNA je nabíjená seryl-aminoacyl-tRNA-syntetasou. Naváže se tam tedy serin, který je až na RNA modifikovaný na selenocystein.
- u archae byl nalezen **pyrolysin**; jeho kodónem je UAG
 - o existuje *pyrrolysyl-aminoacyl-tRNA syntetasa*
 - o je zařazován ko-translačne místo STOP kodónu
- aspartát -> asparagin podobné jako u selenocysteinu
- když se uprostřed proteinu objeví stop-kodón, tak si buňka pomůže tak, že místo, aby ukončila syntézu proteinu, tak tam vloží nějakou AMK → vznikne trochu pozměněný protein, který ale bude aspoň trochu funkční, než kdyby vznikl krátký a nefunkční protein
- translace polypeptidu má fixní počátek
- dostatečně velký úsek, který a je ohraničen start a stop-kodónem s největší pravděpodobností kóduje nějaký protein = otevřený čtecí rámec

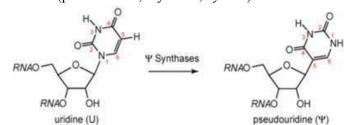
Základní translační aparát

- dělí se na dvě části:
 - o 1) ribozomální část zahrnuje mRNA, tRNA a ribozomy
 - 2) neribozomální část aminoacyl-tRNA-syntetázy, řada dalších faktorů (iniciačních, elongačních, terminačních) a proteinů, které nabijí tRNA aminokyselinami (neribozomální fáze translace musí být správně spárovaná AK a tRNA)
- Aminoacyl-tRNA nese trojici bází komplementární ke kodónu = *antikodón*
- Počet druhů tRNA v buňce není 61 (eukaryota cca 45, bakteria cca 40, chloroplasty 30, mitochondrie obratlovců 22, některé organismy až 100). To je možné díky někdy značným modifikacím bází na první pozici antikodónu a díky kolísání párování bází (wobble)
- Aminoacyl-tRNA-syntetázy jsou enzymy, které katalyzují vazbu AMK na odpovídající tRNA = aktivace aminokyselin jejich vazbou na tRNA.
- Ribozóm je supramolekulární útvar složený z rRNA a řady proteinů katalyzující přenos
 informace z posloupnosti bází v nukleových kyselinách do posloupnosti AMK v
 polypeptidech.
- Sekvence kódující > 100 základních molekul překladatelského aparátu (tRNA, rRNA, proteiny) zabírají cca 5 % bakteriálního genomu.

Struktura a funkce tRNA

- primární struktura
 - Dlouhé typicky 74 až 95 b, číslování ve směru od 5' k 3', na 3'konci ukončeny sekvencí -C-C-A3'OH, 5 až 20 % minoritních bází
- sekundární struktura

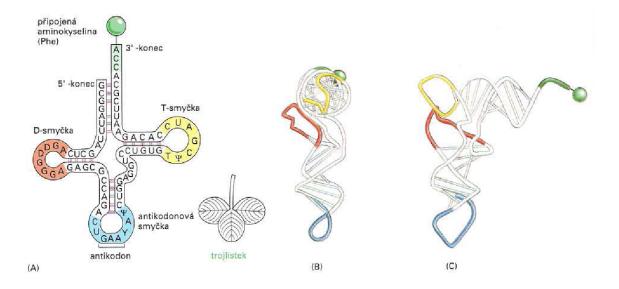
- Struktura jetelového listu tvořená 4 + 1 ramenem. Všechny kromě akceptorového ramene jsou vlásenky sestávající z příslušného stonku a smyčky:
 - akceptorové rameno obsahuje 5' i 3' konec a v "nabitém stavu" nese navázanou příslušnou AMK
 - *D (dihydrouridinové) rameno (D smyčka, D loop)* obsahuje invariantní (neměnící se) bázi dihydrouridin
 - antikodónové rameno nese antikodónový triplet ve středu antikodónové smyčky
 - TψC rameno (T loop, T smyčka) obsahuje invariantní triplet TψC, kde ψ je pseudouridin (pseudouridin, thymidin, cytidin)



- variabilní smyčka dlouhá obvykle 4 až 5 bází (tRNA třída I. 75 % všech tRNA), někdy 13 až 21 bází (třída II.)
- Variabilita v délce tRNA je způsobena variabilitou v délkách D ramene a variabilní smyčky.

• terciální struktura

- "L struktura"; akceptorové a pseudouridinové rameno tvoří dvoušroubovici a jednu stranu písmena L, D a antikodónové rameno tvoří společně též dvoušroubovici a druhou stranu písmena L
- struktura L je tvořena W-C i non-W-C párováním a je silně stabilizována vrstvením bází ("stacking"); invariantní báze jsou především zahrnuty při vzniku terciární struktury
- T-smyčka interaguje s D-smyčkou a vzniká s akceptorovym ramenem dvojitá helix, hodně neWatson-Crickovského párování
- tRNA je posttranskripčně modifikována (bylo nalezeno až 100 modifikací);
 modifikace jsou nejčastěji na pseudouridinu a dihydrouridinu (chyby v
 pseudouridinylaci vedou k závažným chorobám)



- 5' GCGGAUUUAGCUC<mark>AGDDGGGA</mark>GAGCGCCAGA<mark>CUGAAYAYC</mark>UGGAGGUCCUGUG<mark>TYCGAUC</mark>CACAGAAUUCGCACCA 3'
 (D) antikodon
 - Molekula tRNA. Na sérii těchto obrázků je zachycena různými způsoby tRNA specifická pro fenylalanin (Phe).
 - O (A) Struktura jetelového listu používaná pro demonstraci komplementárního párování bází (červené čáry), které vytváří dvoušroubovicové úseky. Antikodon je sekvence tří nukleotidů, které se párují s kodonem v mRNA. Aminokyselina, určená daným kodon/antikodonovým párem, je připojena na 3′-konec tRNA. Molekuly tRNA často obsahují atypické báze, které vznikají chemickou modifikací hotové tRNA. Báze označené jako Ψ (pseudouridin) a D (dihydrouridin) jsou odvozeny od uracilu.
 - (B) a (C) Skutečný L-tvar tRNA podle rentgenostrukturní analýzy (X-ray diffraction).
 - (D) Lineární nukleotidová sekvence tRNA, barevně označené sekvence odpovídají úsekům na obrázcích A, B a C.

funkce

- adaptor umožňující a určující přesné přiřazení určité AMK k určitému tripletu bází
- pravidlo o kolísání párování na 1. pozici antikodónu a třetí kodónu (wooble) umožňuje snížit počet nezbytných druhů tRNA molekul v buňce

obsazení 1. pozice antikodónu	možné párování na 3. pozici antokodónu
G	U nebo C
U	A nebo G
I (inosin)	U, C, A
5-metoxyuridin nebo uridin-5-oxyoctová kyselina	A, G, U

- o nukleotid na pozici 34 je modifikován *zde dochází ke kolísání párování bazí a k evoluci genetického kódu*
- Další modifikace a varianty jsou možné ⇒ existuje více způsobů jak sestrojit sadu tRNA rozeznávajících všech 61 smysluplných kodónů.
- Aplikace základního pravidla o kolísání (G, U v první pozici antikodónu) znamená teoretickou potřebu minimálně 31 tRNA + 1 iniciátorová. Reálně má ale buňka pro častěji se vyskytující kodóny více tRNA
- tRNA má dále další funkce, které umí opravovat mutace → počet tRNA navyšuje na 61. Změna pyrimidinu za pyrimidin na 3 pozici kodónu neznamená změnu kódované aminokyseliny.

Odchylky od universálního genetického kódu mají tendenci zasahovat především čtení terminačních kodónů:

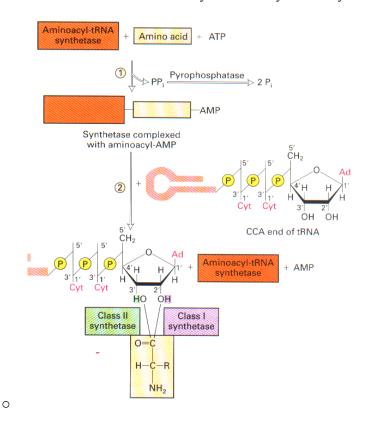
Kodón	Universální kód	Odchylka	Výskyt
UGA	STOP	Trp	Mycoplasma, Spiroplasma, mitochondrie
UAA a UAG	STOP	Gln	Acetabularia, Tetrahymena,
UGA	STOP	Cys	Euplotes
UAG	STOP	sense	Candida
CUG	Leu	Thr, Ser	mitochondrie u hub

mitochondrie obratlovců

o větší změny v genetickém kódu spolu s dalším zjednodušením (jediná tRNA rozeznává všechny členy kodónové rodiny a UAA, UAG + AGA a AGG jsou STOP kodóny) ⇒ 22 druhů tRNA

• vlastnosti tRNA z hlediska funkce

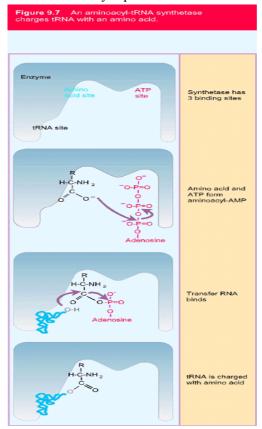
- o společné: rozeznatelné ribozómem (A a P místa), rozeznatelné elongačními faktory (EF-Tu, eEF-1), iniciačními faktory (IF-2, eIF-2)
- o rozdílné: rozeznávané rozdílnými aminoacyl-tRNA-syntetázami

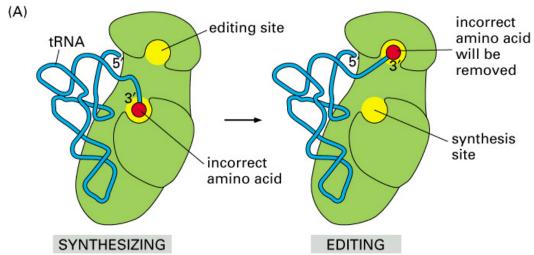


Aminoacyl-tRNA-syntetázy

- Aminoacyl-tRNA-syntetázy = enzymy zásadně zodpovědné za přesnost překladu a "stabilitu" genetického kódu.
 - Strukturně i sekvenčně značně heterogenní skupina: mono-, di- i tetramery; MW
 40 až 110 kD.
 - O Dvě hlavní skupiny lišící se uspořádáním domén a způsobem interakce s tRNA.
- syntetáza proto, že spotřebovává energii z ATP
- Mají tři vazebná místa: 1) pro ATP, 2) pro AMK, 3) pro tRNA
- Syntéza probíhá ve 2 krocích
 - o aktivace aminokyseliny: AMK + ATP \Rightarrow aminoacyladenylát + P \sim P
 - o $aktivace\ tRNA: AMK~AMP + tRNA \Rightarrow AMK~tRNA + AMP$
- Jedna syntetáza rozeznává jedinou AMK + celou sadu příslušných tRNA (tzv. izoakceptorových).

• AMK může být připojena jak na 3' (II. skupina), tak i na 2'-OH (I. skupina) ribózy koncového adenylu příslušné tRNA.





- Figure 6–59 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.
- Přesnost syntézy aminoacyl-tRNA je zajištěna podobně jako v případě syntézy nukleových kyselin nebo při ribozomální fázi překladu *specifitou vazebných míst a opravnou postsyntetickou aktivitou enzymu ("proofreading")*
 - opravná aktivita je možná ve dvou krocích buď po syntéze aminoacyladenylátu nebo po syntéze aminoacyl-tRNA; v obou případech je obvykle vyžadována vazba správné tRNA
 - rozlišení správné tRNA je usnadněno změnou konformace aminoacyltRNA-syntetázy a následným značným urychlením reakce tRNA s AMK~AMP (nejdřív je rozpoznaná správná AMK, ta je pak aktivovaná ATP,

- vzniká *aminoacyl adenylát (= aminoacyl AMP)*, E vazby mezi AMK a AMP je využitá k vzniku aminoacyl-tRNA).
- Špatná tRNA nezpůsobí změnu konformace a tím je více času na její disociaci od enzymu.
- když dojde k poškození tRNA, buď je tRNA degradována, nebo je enzymem tRNAnukleotidyl-transferázou dosyntetizováno příslušné poškození; tím se udržuje určitý počet tRNA; upravuje se CCA konec, aby byla tRNA funkční
- každá chyba, kterou amino-acyl-tRNA-syntetáza udělá, vede k poškození polypeptidu
- o přesnost aminoacyl-tRNA-syntetasy určuje maximální přesnost translace
- Každá tRNA rozeznává jednu aminokyselinu + ty mRNA, který mají příslušný antikodon

Přesnost syntézy tRNA ^{lle} závisí na dvou krocích – měřeno podle ne	správné inkorporace valinu
aktivace valinu na Val-AMP ^{IIe}	1/225
241159664. uvolnění Val-tRNA ^{II}	1/270
celková chyba syntézy 1/225 x 1/270 = 1/	

- chybovost určuje velikost proteinu aby byly proteiny větší, musí se chybovost při translaci zmenšit
- o tRNA musí být rozpoznána celým aparátem v ribozomální části. Musí mít:
 - *podobné rysy*, aby byly rozpoznány prvním místem na ribozomu, elongačními a iniciačními faktory
 - musí být specifické, aby byly rozpoznány různými amino-acyl-tRNAsyntetázami a navázaly na sebe různé AMK
- tRNA, které přenáší stejnou AMK, mají nejvíce konzervovaný antikodon a akceptorový konec
- o amino-acyl-tRNA-syntetáza se orientuje hlavně pomocí akceptorového konce a antikodónu

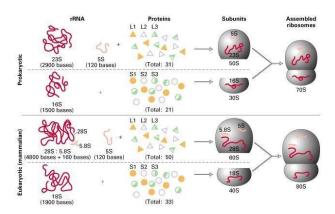
Ribozom

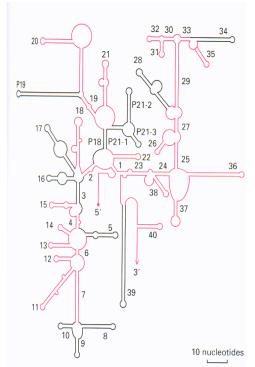
- tvořeny rRNA a ribozomálními proteiny; rRNA je tam daleko více než proteinů; jsou složeny z malé a velké podjednotky
- bakteriální ribozomy jsou menší než eukaryotní
- Archae jsou více podobné eukaryotům; byla u nich nalezena 5,8 S rRNA
- počet ribozomálních proteinů narůstá od bakterií, přes archae k eukaryotům = B < A < E
- kompletní ribozom má jinou hodnotu sedimentace, než je sedimentace u jednotlivých podjednotek
- 3 základní stavební "druhy" funkčních, hotových ribozomů:
 - a) celé, nedisociované ribozomy
 - o b) translatující ribozomy v komplexech
 - o c) ribozomy disociované na podjednotky

SI	ožei	ní r	ibo	ZO	mů	

	obsah rRNA	podjednotky	rRNA	proteiny
Prokaryota = 70S	66 %	50S	23S (2904 b)	31
(E. coli)			5S (120 b)	
		30S	16S (1542 b)	21
Eukaryota = 80S	60 %	60S	28S (4718 b)	49
(savci)			5,8S (160 b)	
,			5S (120 b)	
		40S	18S (1874 b)	33

Organely = ribozomy připomínají prokaryotický ribozom; velikost 60 až 70S; obsah rRNA velice variabilní – od 70 % po méně než 30 %





- bakteriální 16S rRNA
- hlavní úpravy rRNA
 - o oblasti úprav jsou rozpoznávány pomocí komplementarity k malým jadérkovým RNA snoRNA, které se vyskytují v ribonukleových partikulích (snoRNP)
 - o *metylace* (hlavně 2'-OH a metylace nukleotidů)
 - jedna z forem onemocnění disceratis congenita je způsobena mutací discerinu = pseudouridin-syntáza
 - protein, který interaguje s snRNA
 - je-li mutace v tomto proteinu, nastává problém s modifikací rRNA
 - tyto mutace dále vedou ke snížené schopnosti ribozomů překládat mRNA tvořící proteiny, které hrají hlavní roli při apoptóze nebo při proliferaci → zvýšený výskyt nádorových onemocnění
 - o pseudouridinilace
 - CD box, H/ACA box
 - v sekundární struktuře dochází k dokonalému párování s výjimkou nespárovaného uridinu, který je pak isomerizován na pseudouridin (dyskerin se tady taky účastní, jinak se podílí na modifikaci telomerasové RNA)
- vazebná místa na ribozomu

- o [A] místo (aminoacylové) = oblast vstupu aminoacyl-tRNA, vazba tRNA na antikodón
- o [P] místo (peptidylové) = oblast vazby peptidyl-tRNA
- o [E] místo (výstupní) = místo, odkud opouští ribozom "vybitá" tRNA
- Peptidyltransferasová doména = katalytické místo peptidyltransferasy (syntéza peptidové vazby)
- o A- a P-místo jsou tvořeny malou a velkou podjednotkou
- o E- místo a peptidyltransferasová doména jsou součástí velké podjednotky
- o pohyb ribozomů podél mRNA je provázen rychlou vazbou nabitých a uvolněním vybitých tRNA spolu s cyklickým uvolňováním elongačních faktorů
- kanál, kudy prochází nově vytvořený polypeptid, je tvořen tak, aby polypeptid procházel rovný (teprve po uvolnění se polypeptid stáčí do svého správného tvaru); kanál je proto úzký a mohou se na něj vázat různé inhibitory

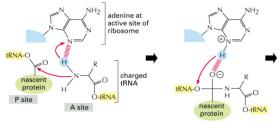


Figure 6-70 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition

Fáze translace

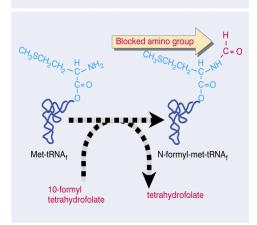
- *iniciace* = sestavení iniciačního komplexu z mRNA, obou podjednotek ribozomu, iniciační tRNA; relativně pomalá fáze
- *elongace* = prodlužování peptidu; nejrychlejší fáze, nejméně regulovaná (je zde výrazně méně regulačních možností, také je zde méně iniciačních faktorů, zvláště u eukaryot)
- terminace = disociace ribozomu, mRNA, polypeptidu
- vznik peptidové vazby
 - o je důležitý konec tRNA v P místě, tRNA je zodpovědná za syntézu peptidové vazby. Ribosom pouze umožňuje ty dva substráty přiblížit k sobě, zvýšit rychlost translace. *Ribosom je vlastně katalyzátor*.

Prokaryotický typ překladu

- Ribozomy jsou v buňce jednak volné, jednak vázané.
- Volné ribozomy se nacházejí v kompletované formě (70S) a jako volné podjednotky (30S + 50S), mezi těmito dvěma stavy existuje dynamická rovnováha. Regulátorem je iniciační faktor IF-3
- 5 % genomu bakterií je vyhrazeno pro translační aparát; 90 % energie metabolismu, který bakterie tvoří, je využito na proteosyntézu
 - → většina antibiotik je zacílena na translaci; dalším důvodem tohoto zacílení je, že bakteriální translace je hodně rozdílná od eukaryotní translace (antibiotika viz dále)
- 1) iniciace
 - o 3 hlavní iniciační faktory:
 - IF1 brání vstupu iniciační tRNA do A místa
 - IF2 GTPáza, interaguje s fMet-tRNA, IF1 a 30S podjednotkou
 - **IF3** umožňuje disociovat ribozom na 2 podjednotky, translace je totiž zahajovaná malou ribosomální podjednotkou

- o translace je zahajovaná iniciátorovou *N-formyl-methionyl-tRNA*: methionin je takhle blokovaný na N-konci
- první a základní věc společná pro všechny organismy: běžný typ translace je vždy zahajován malou ribozomální podjednotkou v komplexu s různými translačními iniciačními faktory
- volné podjednotky a složené ribozomy jsou v buňce v jakési dynamické rovnováze, to znamená, že mohou být, především u bakterií, asociovány a disociovány
- o zahájení translace malou ribozomální podjednotkou je jedna z možností regulace celkové úrovně proteosyntézy v buňce
- o rovnováha směrem k disociaci se převádí změnou podjednotek
- bakterie to dělají tak, že pozmění malou ribozomální podjednotku navázáním (interakcí) translačního iniciačního faktoru 3 (IF-3)
- u eukaryot je to komplikovanější, tam se váží tyto faktory jak na velkou tak na malou ribozomální podjednotku
- iniciační komplex = 30S podjednotka, iniciační faktory [IF-1 (stabilizace komplexu), IF-2 (vazba iniciační fMet-tRNAf), IF-3 (vazba 30S na mRNA)]

Figure 6.9 The initiator N-formyl-methionyl-tRNA (fMet-tRNA₁) is generated by formylation of methionyl-tRNA, using formyl-tetrahydrofolate as cofactor.



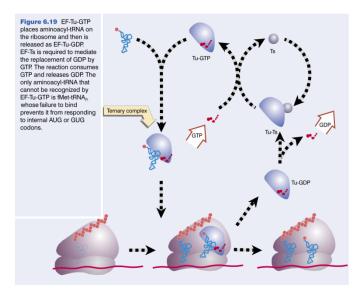
- Iniciátor N-formyl-methionyl-tRNA (fMet-tRNA_f) je tvořen formylací methionyl-tRNA za použití formyl-tetrahydrofolátu jako kofaktoru.
- Iniciační fMET-tRNA_f rozeznává kodóny AUG (správný iniciační kodón, který je signálem pro zahájení syntézy polypeptidů) a méně často GUG nebo UUG
 - rozpoznává jej na základě komplementárního párování mezi určitým úsekem na mRNA a částí na 3'konci 16S ribozomální RNA na malé ribozomální podjednotce
 - u bakterií a částečně i archae iniciace probíhá na principu jakéhosi komplementárního párování
- Posloupnost dějů

- 1) IF-3 + 30S se váže na mRNA
- 2) IF-1 se váže na tento komplex a stabilizuje jej
- 3) za přítomnosti IF-2 se naváže GTP a iniciační tRNA nasedne do částečného P místa na 30S podjednotce → vzniká ternární komplex (IF-2 + N-formyl methionyl tRNA + GTP)
 - iniciační tRNA kóduje methionin, u bakterií N-formyl methionin
 - iniciační tRNA je jiná než normální methionyl tRNA, má sice stejný antikodón (rozpoznává také AUG), ale je rozpoznávána jinými, tzv. *translačními iniciačními faktory*, zatímco normální

- methionyl tRNA, která kóduje methionin uvnitř polypeptidu, je rozpoznávána elongačními faktory, které se účastní průběhu elongace (průběhu vnitřní syntézy polypeptidu)
- bakteriální IF-2 zajišťuje funkci několika iniciačních faktorů u eukaryot, poměrně komplikovaný faktor
- ternární komplex rozpoznává komplex malé ribosomální podjednotky na mRNA
- Malá ribosomální podjednotka zatím rozpoznala místo, kde dochází k iniciaci translace. Takové místo je rozpoznáno párováním 3' konce 16S konce ribosomální RNA a konkrétní sekvence -7/-10 nukleotidů daleko od iniciačního kodónu AUG na mRNA => tahle sekvence se nazývá Shine-Dalgarno sekvence
- 4) když je N-formyl-methionyl-tRNA navázána v P místě, dochází k rozpoznání velké ribozomální 50S podjednotky, která se naváže, hydrolyzuje se GTP na GDP + P a uvolní se iniciační faktory -> uvolnění A místa
- o 30S podjednotka se váže do RBS (ribozome binding site), jehož součástí je iniciační kodón a tzv. Shine-Dalgarno sekvence.
 - Konsensus <u>Shine-Dalgarno</u> sekvence (cca -10 b od AUG)
 5' AGGAGG 3'
 je komplementární k části konzervované sekvence na 3' konci 16S rRNA
 3' -UCCUCC -5'
 - funkce Shine-Dalgrano: kvůli polycistronním jednotkám, díky tomu, že je to na základě komplementarity, nemusí ribozom skenovat RNA a hledat nějakou sekvenci, která má být přepisovaná
- o u bakterií, nikoliv však u archae, je po aktivaci *iniciační* (někdy se značí *Fmet tRNA I*) *tRNA* je methionin blokován na N-konci, takže je méně reaktivní → vyznačuje N-konec polypetidu
- o iniciační tRNA se nazývá *N-formyl iniciátorová tRNA* právě podle té skupiny
- aby mohla být za iniciátorový kodón AUG připojena další aminokyselina, musí iniciátorová tRNA rozpoznávat AUG kodón v P místě malé ribozomální podjednotky → musí zůstat spojení dvou podjednotek a A místo musí zůstat volné
- o iniciační tRNA je jediná aktivovaná tRNA, která do ribozomu přichází do P místa
- podle toho, jaký je další kodón na mRNA, tak první další amino-acyl tRNA přichází do A místa, přenesení peptidu na tuto další amino-acyl tRNA je vlastně prvním elongačním krokem
- 2) elongace

- o elongující tRNA přichází v ternárním komplexu bílkoviny, elongačního faktoru Tu (thermal unstable) a GTP
- "Nabité" amino-acyl tRNA přináší do A místa ribozomu elongační faktor EF-Tu; EF-Tu se aktivuje navázáním GTP; recyklován je pomocí faktoru Ts; (EF-Tu tvoří cca 5 % celkového proteinu buňky, cca 70 tisíc molekul / buňku, EF-Ts = cca 10 tisíc molekul / buňku, tj. přibližně molární množství elongačního faktoru Ts by mělo odpovídat zhruba počtu ribozomů)
- o řada regulačních bílkovin má vždycky dva stavy lišící se podle toho, jestli mají na sobě navázaný GTP nebo GDP
 - vazba GTP nebo GDP je velmi obecná, buňkami používaná pro změny stavu bílkovin
 - skoro vždy s takovýmto systémem souvisí další bílkovina, v tomto případě je to elongační faktor Ts (EF-Ts), který je tzv. GTP-GDP výměnný protein
- o má vyšší afinitu pro EF-Tu, nemá tRNA a je v té formě s GDP

- Syntéza peptidyltransferasa 50S podjednotky (23S RNA jako katalytické centrum)
- o Translokace vyžaduje EF-G a hydrolýzu GTP na GDP + P
- Ribozom nemůže vázat najednou EF-Tu a EF-G ⇒ nutnost cyklického střídání obou faktorů (fázi); struktury ternárního komplexu EF-Tu připomíná strukturu EF-G/GTP (kompetice o místo?)
- GTP aktivovaný EF-Tu je schopen rozpoznat amino-acyl tRNA → opět vzniká ternární aktivovaný komplex amino-acyl tRNA, EF-Tu, GTP, který je schopen vázat se do A místa ribozomu
- o po správném zařazení správné AMK dojde k hydrolýze GTP na GDP a P, změní se konformace elongačního faktoru TU, ten již není schopen vázat aminoacyl-tRNA, uvolní se z A místa, dojde k syntéze peptidové vazby a k navázání elongačního faktoru EF-G ve formě GTP, který zprostředkuje za hydrolýzy GTP translokaci a přenos peptidyl-tRNA z A místa na P místo
- TU a GDP je recyklován
- o faktor TS umožní vazbu TU a GTP (recykluje GDP na GTP)
- o po vazbě ternárního komplexu dochází k rozpoznávání, jestli kodón a antikodón páruje správně → další místo, kde se určuje přesnost syntézy
- vazba aminoacyl-tRNA i translokace jsou vlastnosti ribozomu urychlené (katalyzované) elongačními faktory
- rychlost a síla, s jakou je schopen párovat kodón a antikodón, určuje, jestli dojde k uvolnění elongačního faktoru Tu a k hydrolýze GTP na GDP a usazení amino-acyl tRNA uvnitř ribozomu, nebo jestli dojde k uvolnění celého komplexu
- o vzniká vazba mezi AMK a polypeptidem → tRNA se přesune na P-místo
- NH skupina AMK atakuje C-konec peptidu na P-místě a vznikne peptidová vazba;
 aktivní místo je tvořeno 23S rRNA v ribozomu; nejblíže aktivnímu místu je adenin
 2451 moderuje přenos peptidylu
- o vědci připravili ribozom, který má mutaci v tomto adeninu a nic se nestalo → tento adenin je důležitý pro fungování místa, ale není esenciální
- je-li mutace v 2'-OH skupině, která se účastní přenosu skupin, aktivita peptidyltransferázové domény klesne až 106 krát
- tRNA je aktivním hráčem v této doméně rozpoznává kodón, dříve se účastnila i přenosu AMK na peptidy
- když dojde k přenou peptidylu na amino-acyl tRNA, tak je třeba, aby ribozom změnil vůči sobě své postavení o jeden triplet
- o toho se účastní *elongační faktor G* (EF-G, GTP-GDP vazebný protein)
- EF-G v podstatě soutěží o P místo s ternárním komplexem
- P místo vypadá pokaždé trochu jinak v závislosti na tom, co se v tu chvíli dělo na ribozomu → vždycky je výrazně vyšší pravděpodobnost, že se tam váže buď EF-G nebo ternární komplex
- o takto dochází k postupnému střídání elongačních faktorů v P místě
- buď dochází k vnášení nové aminokyseliny do peptidového zbytku a nebo k translokaci ribozomu po mRNA
- jiná situace nastane ve chvíli, kdy se na mRNA objeví některý ze stop kodónů, který nemá proti sobě příslušnou amino-acyl tRNA



EF-Tu-GTP umísťuje aminoacyl-tRNA do ribozomu a poté je uvolněn jako EF-Tu-GDP. EF-Ts je vyžadován ke zprostředkování náhrady GTP za GDP. Reakce spotřebovává GTP a obnovuje GDP. Jediná aminoacyl-tRNA, která nemůže být rozpoznána EF-Tu-GTP, je fMet-tRNAf, jejíž nemožnost vazby chrání před odpovědí na vnitřní AUG

nebo GUG kodony

• 3) terminace

- STOP kodón nemá tRNA na konkrétní STOP kodón, ale má release faktory (RF1, RF2, RF3 se váže na oba dva RF – GTP/GDP vazebný protein), uvolnění ribosomu za hydrolýzy GTP
- terminace zprostředkována RF ("release") faktory:
 - RF-1 rozpoznává UAA a UAG
 - RF-2 rozpoznává UAA a UGA
 - RF-3 je GTP vazebný protein podobný EF-G a spolupracuje s RF-1 nebo RF-2
 - jeho změna za přispění hydrolýzy GTP na GDP vede k rozpadu celého komplexu (mRNA, obou ribozomálních podjednotek nebo celého ribozomu, tRNA) a především k hydrolýze polypeptidu z peptidyl tRNA
- stop kodóny znamenají ukončení růstu polypeptidů, disociaci ribozomu mRNA a polypeptidu
- release faktor pozmění funkci peptidyl transferasy, takže katalyzuje adici vody místo aminokyseliny na peptidyl tRNA -> hydrolýza, uvolnění C konce (-COOH funkční skupina polypeptidu) z tRNA a následně z ribosomu
- o jestliže nemá stop-kodón proti sobě příslušnou amino-acyl tRNA, tak v P místě soutěží s EF-Tu a EF-G další bílkovinné faktory RF-1 nebo RF-2
- o ve výjimečných případech, jestliže se stop kodón vyskytne uprostřed genu, umožní buňce nasyntetizovat alespoň část těchto proteinů
- o další výjimkou je, když je stop kodon rozpoznáván za nějakým účelem, za supresorovou DNA a nebo kdy je tam zařazován selenocystein
- o ribozom se po ukončení translace rozpadá na dvě podjednotky

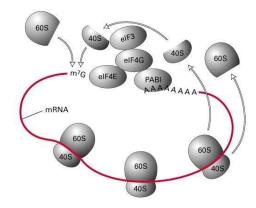
Eukaryotický typ překladu

- velmi podobné prokaryotům s výjimkou iniciace
- eukaryotní mRNA je specifická a je naprosto rozdílná od všech bakteriálních a archaeálních mRNA

- o jednak má polyA konec na 3' konci a jednak má methylovou čepičku na 5' konci
 - tato čepička je zásadní pro translaci naprosté většiny eukaryotních mRNA → musí tam být něco zvláštního, nějaký jiný komplex iniciačních faktorů, který umí rozpoznat tuto speciální strukturu a umí přitáhnout celý ten pre-iniciační komplex malé ribozomální podjednotky a ternárního komplexu
- o dále má eukaryotní mRNA dost často, hlavně u vyšších eukaryot, poměrně dlouhé 5' i 3' nepřekládané sekvence, tzv. untranslated region
 - tyto sekvence mají dost často regulační funkci, umožňují, že se na ně naváže celá řada bílkovin, a umožní buď zvýšit / snížit účinnost translace nebo zvýšit / snížit stabilitu mRNA nebo umožní mRNA aby byla transportována někam jinam v buňce
- energetická náročnost translace u eukaryot se pohybuje okolo 5 až 10 %
- eukaryota produkují dlouhý prekurzor -*-----pro-rRNA, ten se štěpí a dále upravuje metylací, atd.
 - o těchto pochodů se účastní snRNA
 - v jadérku se tvoří rRNA, vznikají ribozomy a probíhá zde jejich maturace a modifikace
 - o ribozomální proteiny přechází z cytoplazmy do jadérka pro syntézu ribozomů: pre-ribozom se rozdělí na pre-malou a pre-velkou podjednotku; tyto pre-podjednotky přechází z jadérka do jádra, kde proběhne další syntéza
 - o pak přechází tyto téměř hotové podjednotky z jádra do cytoplazmy
- 1) iniciace
 - o tRNA má u eukaryot jinou strukturu než u prokaryot (kvůli cappingu a polyA)
 - 5' cap je rozeznávána komplexem faktorů EIF4, 3' konec je rozeznáván polyA vazebou bílkovinou => tenhle komplex dohromady je schopný asociovat zvyšuje to efektivní koncentraci iniciačních komplexů v blízkosti 5' konce
 - navlékací mechanismus; pravděpodobně chybí přímá interakce 18S rRNA s mRNA, pro migraci 40S podjednotky k AUG je třeba ATP
 - *preiniciační komplex* (malá ribozomální podjednotka a všechny ty různé faktory), se váže pomocí dalších faktorů na 5' konec před čepičku
 - pak se musí nějak dostat přes nepřekládanou oblast = skenování
 - komplex rozpozná čepičku, 5' terminus mRNA, a jede (skenuje)
 po té mRNA až narazí na AUG iniciační kodón
 - obvykle to bývá první iniciační kodón, ale není to pravidlo, může to být nějakým způsobem regulováno, až je vybrán ten správný iniciační kodón, který umožní syntézu polypeptidu
 - -> malá podjednotka se neváže komplementárně, ale skenuje oblast – hraje roli v regulaci genové exprese
 - o mRNA monocistronní (obvykle)
 - o iniciační aminoacyl-tRNA není formylována = Met-tRNAi
 - o více iniciačních faktorů, z hlediska funkce: eIF-2 \approx EF-2
 - o vazba na "cap" zprostředkována eIF-4...
 - o spotřeba ATP i GTP
 - o účast poly(A) konce
 - 3' polyA konec je obsazen polyA vazebnými proteiny, které interagují s některými iniciačními faktory rozpoznávajícími 5' konec, konkrétně s komplexem eIF4F a eIF-3
 - přes polyA konec a polyA vazebný protein může interagovat 5′ a 3′ konec

- množství polyA vazebných proteinů může zvyšovat efektivní koncentrace preiniciačních komplexů
- zvýšená koncentrace těchto faktorů umožní vyšší a častější zahájení translace na 5' konci
- čím je delší polyA konec, tím je mRNA lépe překládána
 - u eukaryot se ukázalo, že když chybí polyA konec, tak řada těchto mRNA je slabě nebo vůbec překládána, a nebo je odsouzena přímo k degradaci – záleží na tom, v jakém kontextu v jaké buňce se vyskytují
 - o např. v oocytech, ve chvíli kdy zde neprobíhá transkripce, regulace polyadenylace maternálních mRNA, které tam jsou ještě od matky, je často závislá na regulaci polyadenylace těchto konkrétních mRNA → pokud je tady nějaká polyadenylovaná mRNA, tak to vede k její vyšší translaci
- v průběhu každého cyklu translace je polyA řetízek o něco málo zkrácen
 - u eukaryot je polyA řetízek dlouhý třeba 200 zbytků kyseliny adenylové, u kvasinek je to třeba 60
 - pořád je dostatečně dlouhý, protože jeden polyA vazebný protein obsadí přibližně 15 – 20 nukleotidových zbytků
 - když dojde k určitému zásadnímu zkrácení polyA, tak se to stává signálem pro enzym "Decapping" komplexem ("odčepičkovací enzym"), který ustřihne tuto strukturu
 - jediná nukleáza, která je v buňce schopná rozpoznat čepičku a odštěpit ji
 - degradace odštěpením čepičky vede k degradaci celé mRNA
 - u eukaryot majoritní dráha degradace mRNA je přes 5' konec
 - tomuto modelu, který byl dokázán elektronmikroskopicky, se říká **model uzavřené smyčky**
- o pro iniciaci důležité i okolí AUG konsensus Kozakové (ACCAUGG)
 - podstatné je, že u eukaryot je sekvence (konsensus Kozakové), která zvyšuje pravděpodobnost, že konkrétní AUG bude rozpoznáno preiniciačním komplexem a bude použito pro zahájení syntézy
 - faktory, které jsou unikátní pro eukaryota a které rozpoznávají čepičky, jsou tzv. faktory skupiny 4, to znamená eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF4B, celkově se ta skupina nazývá eIF (eukaryotní iniciační faktor) 4F
 - tento komplex, rozpoznávjící čepičku, umožňuje navázání tohoto preiniciačního komplexu a umožňuje zahájení skenování, až je nalezen první AUG kodón
 - vlastní syntéza začíná rozpoznáním 5° konce a skenováním RNA celou řadou faktorů, malá ribosomální podjednotka skenuje 5° UTR až k prvnímu AUG kodónu, který je ve vhodný sekvenci – právě Kozakové sekvence
 - po rozpoznání AUG kodónu dochází k navázání iniciačního komplexu faktoru IF2 – GTP, methionyl-tRNA
 - IF 5 spojení velké a malé podjednotky a zahájení translace
- RNA není žádná tyčka, ale je to jakási struktura, která velmi snadno páruje i
 intramolekulárně a nejen Watson-Crikovsky, zvláště guanosin umí párovat s "kde s
 čím"

- může se stát, že 5' nepřekládaná oblast je velmi strukturně bohatá, zvlášť když je oblast mezi 5' koncem a AUG kodónem je dlouhá
 - taková průměrná délka u kvasinek je něco kolem 60 nukleotidů, u některých genů vyšších eukaryot je to ale třeba 300, 1000 nebo 1200 nukleotidů
 - proto jsou součástí 4F komplexu proteiny 4A, 4B, což jsou helikázy, a dále protein, který rozpoznává čepičku
 - helikáza umožňuje skenujícímu ribozomu rozmotávat za spotřeby ATP tu případně složitou strukturu na 5' nepřekládané oblasti
 - zároveň si můžeme v tuto chvíli představit, že to, jak moc
 je 5' nepřekládaná oblast strukturovaná, tak to už je
 určitým regulačním prvkem pro konkrétní mRNA jak
 intenzivně bude překládaná, jak účinně, jak moc dobře se
 bude skenovat



- model uzavřené smyčky
- 2) elongace

0

- Z hlediska funkce: EF-1 $\alpha \approx$ EF-Tu, EF-1 $\beta \gamma \approx$ Ts, EF-2 \approx EF-G
- 3) terminace
 - o Pouze jeden terminační faktor pro všechny STOP kodóny eRF1 + eRF3 (GTPasa)

Archeální typ překladu

- translační iniciační faktory archae a eukaryot jsou si velmi podobné
- IF-2 je složený ze tří podjednotek alfa, beta a gama (archae i eukaryota) a přináší ternární komplex
 - o u bakterií se navíc ještě účastní spojení velké a malé ribozomální podjednotky a svoji strukturou spíše připomíná eukaryotní eIF-5B, stejně jako archaeální aIF-5B, které se u eukaryot a u archae podílejí na spojení ribozomálních podjednotek
- řada mRNA u archae obsahuje Shine-Delgarnovovu sekvenci nebo něco jí podobného → není tam čepička, nejsou tam faktory skupiny 4F
- bakterie a archae mají společné alespoň z části zahajování translace pomocí komplementárního párování v Shine-Delgarnovově sekvenci
- naopak RNA malé ribozomální podjednotky je schopna párovat v blízkosti iniciačního kodónu u archae s mRNA, je to vlastně analogie Shine-Delgarna
- u části archae je velká část mRNA (až 50 %) polycistronní a je úplně jiná než jak ji známe z bakterií a eukaryot tyto mRNA jsou bez jakékoliv nepřekládané oblasti
- na 5' konci je AUG kodón a žádná modifikace, prostě jenom AUG kodón
- jak je rozpoznáván takovýto konec a jak je zde zahajována translace, které faktory se toho účastní, se v současné chvíli neví

Rychlost a energetika překladu (E. coli)

- cca 20 AMK / sekundu
- zařazení 1 AMK = 4 makroergní vazby (2 z ATP aktivace amino-acyl tRNA, 2 z GTP) + po 1 z GTP na iniciaci a terminaci překladu ⇒ na připojení jedné AMK (energie vazby ≈ 21 kJ) se spotřebuje cca 30,7 x 4 = 122,8 kJ
- regulační energie, která je použita pro přestavby a posun po ribozomu je z GTP
- energie na syntézu peptidové vazby je z ATP, protože ta byla použita už při aktivaci tRNA amino-acyl tRNA syntetázou
- proteosyntéza spotřebuje až 90 % biosyntetické energie rychle rostoucí bakteriální buňky
- jakýkoliv zásah do proteosyntézy vede k zborcení celé řady klíčových dějů a okamžitě k smrti buňky nebo minimálně k zastavení růstu

Přesnost překladu

- průměrná přesnost překladu nemůže být nikdy vyšší než přesnost amino-acylace tRNA na amino-acyl tRNA syntetázách
- průměrná přesnost překladu je cca 5 x 10⁻⁴
- průměrné polypeptidy v buňce, ať už bakteriální nebo eukaryotní, mohou být jenom tak velké, aby se v nich nehromadily chyby
- nesprávný triplet s 2 stejnými bázemi je rozeznáván pouze 10⁻¹ až 10⁻² méně účinně než správný ⇒ nutný vliv i jiných mechanismů než jen párování kodón antikodón
- vliv ribozomu, ribozomálních proteinů (S12 x streptomycin, S4, S5), rRNA (hypometylace, mutace např. 5S rRNA u kvasinek), translačních faktorů (EF-Tu ...), změny konformace a mutace v aminoacyl-tRNA, primární a sekundární struktura mRNA na přesnost překladu
- "proofreading" degradace nesprávného polypeptidu (např. "nonsense mediated decay")
- dosahovaná přesnost překladu je kompromisem mezi rychlostí, přesností a energetickou náročností
- hledal se gen (příčina) rezistence na streptomycin a ukázalo se, že za to je zodpovědná bílkovina malé ribozomální podjednotky S12 (předpona S značí malou ribozomální podjednotku, L značí velkou ribozomální podjednotku)
- čím více se získávaly kmeny, které byly rezistentní vůči vyšším dávkám streptomycinu, tím víc mutací se hromadilo v genu kódující bílkovinu S12
- nejzajímavější bylo, že když se získaly kmeny, které byly rezistentní na opravdu vysoké dávky streptomycinu a daly se na agarovou půdu bez streptomycinu, tak naprostá většina těchto kmenů nerostla
- zjistilo se, že streptomycin zvyšuje chybovost syntézy, zvyšuje chybovost translace
- mutace v bílkovině, která je v cílovém místě pro streptomycin a mutace v bílkovině S12 naopak zvyšuje preciznost ribozomu, ale zároveň snižuje rychlost ribozomu → takovéto kmeny, které byly schopny normálně růst při vysokých dávkách streptomycinu, byly přeneseny na normální médium, tak měly tak přesné ribozomy, ale zároveň v uvozovkách tak pomalé ribozomy, že skoro nesyntetizovaly proteiny a nebylo to slučitelné s životem buňky → tak jak dnes vypadají translační aparáty, tak dosahovaná přesnost překladů je kompromisem mezi přesností a rychlostí
- když se snižovaly dávky streptomycinu, tak se začaly hromadit mutace v dalších ribozomálních proteinech, konkrétně mutace v proteinech S4 a S5, které jakoby naopak snižují přesnost translace a zvyšují rychlost

Degradace vadné mRNA a jejího produktu

Prokaryota

- např. při výskytu vyskytne nečekaně končící mRNA (nekončí stop kodónem)
- využívá se tzv. transferová messenger RNA (tmRNA)

- speciální RNA, která je aktivovaná aminokyselinovým zbytkem alaninu, je to alanyl tRNA
- o je přenesena do A místa a umožní přenos peptidylu na tmRNA
- tmRNA zároveň uvnitř kóduje kratičký polypeptid, který je normálně přeložen a kóduje i konec tohoto polypeptidu, to znamená dojde k normálnímu rozpadu komplexu a dojde k degradaci špatné, chybné původní mRNA
- dojde k označení toho nedokončeného, špatného polypeptidu značkou, která je značkou pro
 proteolytickou inaktivaci vzniklého nového polypeptidu a vede k jeho degradaci

Eukaryota

- komplikovanější, každá část syntézy mRNA i jejího využití je pod dohledem
- nonsense-mediated decay znamená, že se někdy vyskytne nonsense nebo stop kodón a vyskytne se někde, kde neměl původně být
- exon junction komplex (EJC) je část proteinu, která zůstane po sestřihu mRNA
- kousek od 5' exon-intronového spojení zůstává jakýsi proteinový komplex, který označuje, kde došlo ke spojení exonů a intronů
- buňka tím pádem na mRNA, která je exportována ven z jádra, pozná, kde došlo ke spojení jednotlivých exonů, (má tato jednotlivá místa tímto označená)
- EJC je odstraněn v průběhu translace, v průběhu syntézy ribozomem
- EJC není odstraněn z celé mRNA v případě, že se náhle objeví stop kodón a je předčasně ukončena syntéza polypeptidu
- mRNA, která na sobě dlouho nechává tyto EJC komplexy je rozpoznána dalšími faktory, které umožní říct: "tady na této RNA je zřejmě něco špatného, nepřekládá se celá, půjde do degradace"
- v případě, že mRNA nemá stop kodón (nonstop decay), musí nastat její degradace
- ribozom dojede na konec, zastaví se, nemůže dojít k uvolnění tohoto komplexu RNA, transferyl peptidyl tRNA a ribozomů
- takovýto zastavený ribozom je rozpoznán skupinou faktorů, které umožní uvolnění těchto komplexů a degradaci této špatné RNA

Kotranslační a posttranslační úpravy

- Vytvořené nebo někdy ještě se tvořící polypeptidy jsou různým způsobem modifikovány a upravovány.
- deformylace N-koncového methioninu specifickou deformylasou (prokaryota)
- odštěpení N-koncového methioninu aminopeptidasou
- *chemická modifikace konců i různých AMK zbytků uvnitř řetězce* (acylace, metylace, hydroxylace, glykosylace, myristilace, prenylace, ADPribosylace, fosforylace...)
- *štěpení peptidu* (např. prepropeptidu při sekreci)
- vytváření sekundární, terciární a kvarterní struktury, vazba prostetických skupin, interakce s dalšími biopolymery a tvorba supramolekulárních celků atd.

Skládání proteinů do terciální struktury - "folding"

- Některé proteiny samy zaujmou funkční finální konformaci *samoorganizace*, některé vyžadují pomocné proteiny:
- a) chaperony
 - o hlavní chaperony patří do rodin "heat shock proteinů" Hsp70, Hsp60, Hsp90
 - o Hsp70 na počátku vzniku proteinu (E. coli DnaK, eukaryota BiP)
 - vyskytují se u všech organismů (u kvasinek je jich asi 14) a všude jsou v mitochondriích, v chloroplastech, cytosolu, jsou v ER
 - O BIP v lumen ER se postupná váže na nově vznikající polypeptid a jednak vede (tj. pomáhá skládání polypeptidu) a jednak převádí rovnováhu směrem k translokaci, to znamená směrem k syntéze peptidu dovnitř

- Hsp60 později; velký komplex ve tvaru oboustranně otevřeného barelu (E. coli GroEL), funkční spolu s Hsp10 (E. coli GroES)
- o chaperony ovlivňují nejen skládání do terciární struktury, ale i oligomerizaci

• b) proteinindisulfidizomeráza a peptidylprolylizomeráza

- o *proteindisulfidizomeráza (PDI)* vliv na vytváření S-S můstků v endoplazmatickém retikulu
- o peptidylprolylizomeráza (PPI) vliv na konverzi cis konformace prolinu na trans

Posttranslačnní lokalizace proteinů

- V buňce jsou proteiny po anebo již během translace směrovány do míst jejich pozdější funkce nebo míst, kde jsou dále modifikovány. Složitá situace je zvláště v eukaryotické buňce vzhledem k její kompartmentaci.
- Proteiny lze hrubě rozdělit na cytosolické a membránově vázané.
 - Místo určení syntetizovaných proteinů je determinováno specifickou sekvencí
 AMK lokalizačním signálem (např. N-koncový pro mitochondrie, chloroplasty,
 ER, sekreci ven z buňky; C-koncový pro peroxisomy; interní pro jádro atd.).
- Cytosolické a organelové proteiny jsou syntetizovány na "volných" cytoplasmatických ribozomech. Proteiny směrované do membrán organel *posttranslační translokace*.
- Proteiny cytoplasmatické membrány (CM), ER, Golgi ... a sekretované proteiny jsou syntetizovány na drsném ER *kotranslační translokace*.

Posttranslační translokace – eukaryota

- V organelách syntetizováno relativně málo proteinů: mitochondrie cca 10, chloroplasty cca 50
- základní dráha importu proteinů do mitochondrií: translace → "folding" → translokace přes vnější i vnitřní membránu do matrix (receptor, kanál, Hsp70...) → "folding" popř. i oligomerizace (Hsp60...) → případný přenos zpět do vnitřní membrány nebo lumen
- Díky různému prostředí může být struktura proteinu v cytosolu a v mitochondrii různá

Kotranslační translokace – eukaryota

- kotranslační translokace, protože pro translokaci bílkoviny skrze membránu ER je využívána částečně energie translace a dochází k tomu přenosu ve stejné chvíli, kdy je příslušná bílkovina překládána
- N-terminální signální sekvence 15 až 30 AMK (hydrofóbní jádro)
- základní dráha importu proteinů do ER:
 - o 1) start translace
 - 2) po syntéze cca 70 AMK (signální sekvence ven z ribozomu + cca 40 AMK uvnitř) dochází k vazbě SRP na signální sekvenci a dochází k zastavení nebo k zpomalení syntézy polypeptidu na ribozomu (SRP = "signal recognition particle", 5-6 x 23-24 nm, 11S, 6 proteinů + 7S RNA [305 b])
 - o 3) vazba SRP na receptor (SR α + SR β)
 - o 4) přenos ribozomu na Sec61, resp. Sec61/TRAM komplex
 - u bakterií jsou Sec proteiny součástí cytoplasmatické membrány
 - u eukaryot se Sec-systém najde jak u translokónů pro posttranslační translokaci bílkovin na ER, ale najde se třeba i v chloroplastech
 - o 5) translokace přes membránu
 - o 6) štěpení signální peptidasou
 - o 7) "folding", glykosylace a další modifikace

Prokaryota využívají kotranslační i posttranslační translokaci

 Na nascentní protein se váže chaperon SecB → vazba na membránový protein SecA a transmembránový SecY → translokace a odštěpení signálního peptidu

- většina bílkovin u bakterií je translokována posttranslačně, nicméně v menší míře mají bakterie i kotranslační systém a dokonce lze u nich najít i ribonukleproteinové partikule, které také obsahují RNA a vážou se na ribozom
- analog SRP = ribonukleové partikule s 4,5S RNA, nezastavují proteosyntézu
- energie pro translokaci bílkovin je využívána štěpením ATP ATPázou

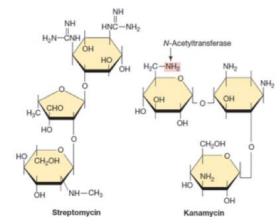
Degradace proteinů

- lysosomy, vakuoly, proteasom
- místa masivní degradace bílkovin musí být odlišena od zbytku buňky, aby nedocházelo k poškozování funkčních bílkovin, které jsou uvnitř buňky
- jednou z hlavních značek, která určuje, které bílkoviny budou degradovány je navázání malého všudypřítomného polypeptidu ubiquitinu, který se váže na tu danou bílkovinu
- proteasom = supramolekulární komplex ≈ 700 kD, degraduje proteiny s navázaným polyubiquitinem na jejich ₹ -Lys (ubiquitin pospojován přes C-terminal Gly a Lys46)
- umožňuje rozštěpení bílkovin a recyklaci jednotlivých aminokyselin
- po degradaci proteinu je ubiquitin recyklován

Antibiotika

- některá antibiotika jsou cílená proti všem jednotlivým částem translace
- další zacílení antibiotik je na syntézu bakteriální stěny

Streptomycin



- struktura: aminoglykosid (aminocukr spojený glykosidickou vazbou)
- producenti: Streptomyces
- mechanismus váže se do malé ribosomální podjednotky (30S) a zapříčiňuje špatné párování kodon-antikodon
- působí na přesnost proteosyntézy podobně jako některá aminoglynosidová antibiotika

Rifampicin

• blokuje funkci bakteriální RNA Pol

Puromycin

- především antibiotikum, které se využívá ve vědě a při studiu translace a které mimikuje CCA konec amino-acyl tRNA
- zastaví proteosyntézu tak, že se váže do A místa, umožní přenesení peptidylu na puromycin a uvolnění a rozpad celého translačního komplexu ribozomu → výsledkem je, že máte v buňce spoustu zkrácených polypeptidů, které mají na C konci puromycin → buňka velmi rychle energeticky vyčerpá své energetické zdroje a nesyntetizuje nové bílkoviny

Erythromycin

- makrolidové antibiotikum
- producenti: Streptomyces
- dobrá prostupnost tkáněmi
- blokují výstupní kanál pro nově vznikající polypeptid (vazba na 50S podjednotku) -> zastavení translace
- fungují na velké ribozomální podjednotce blokují ten poměrně dlouhý úzký kanál (zhruba pro 30 – 40 aminokyselinových zbytků), kterým nesbalený polypeptid opouští ribozom

Tetracyklin

- blokuje A místo v malé ribosomální podjednotce (30S)
- producenti: Streptomyces
- brání navázání amino-acyl tRNA do A místa ribozomu

Aminoglykosidová antibiotika

- blokují translokaci
- významné karamicin, deptamicin

Penicilin, ampicilin, cefalosporinová antibiotika

• betalaktamová ATB, blokujou transpeptidázu při syntéze peptidoglykanu

Trimethoprim

• blok dihydrofurát reduktázy v syntéze tymidinu (blok syntézy prekursorů replikace)

Thiostrepton

- působí na translokaci
- je zacílen na více míst, jedna z jeho funkcí je ta, že blokuje vnitřní GTPázovou aktivitu EF-G

• EF-G kompetuje s ternárním komplexem (EF-Tu + amino-acyl tRNA + GTP) o A místo na ribozomu, které ovšem vypadá pokaždé trochu jinak. Ve chvíli kdy toto místo není úplně prázdné, tak se tam váže EF-G za štěpení GTP na GDP, fosfát umožní translokaci toho ribozomu. Jestliže nedojde ke štěpení GTP na GDP a fosfát, dojde k zastavení proteosyntézy v translokačním kroku a ribozomy zůstávají stát s nerozpadlým komplexem, proteosyntéza se zastavuje