

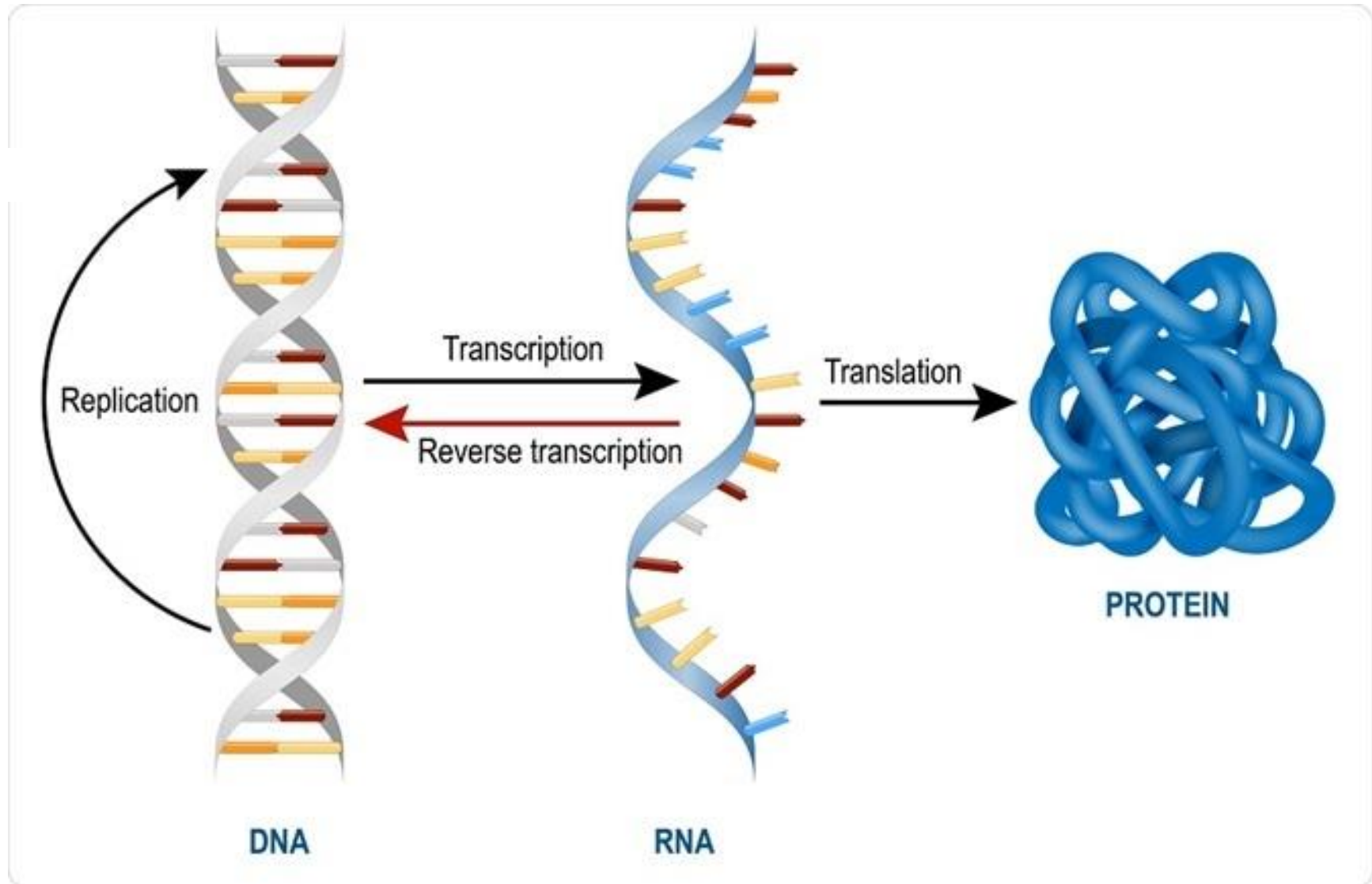
Translace

RNDr. Jana Soukupová, Ph.D.

jana.soukupova@lf1.cuni.cz

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK

Translace – ústřední dogma molekulární biologie



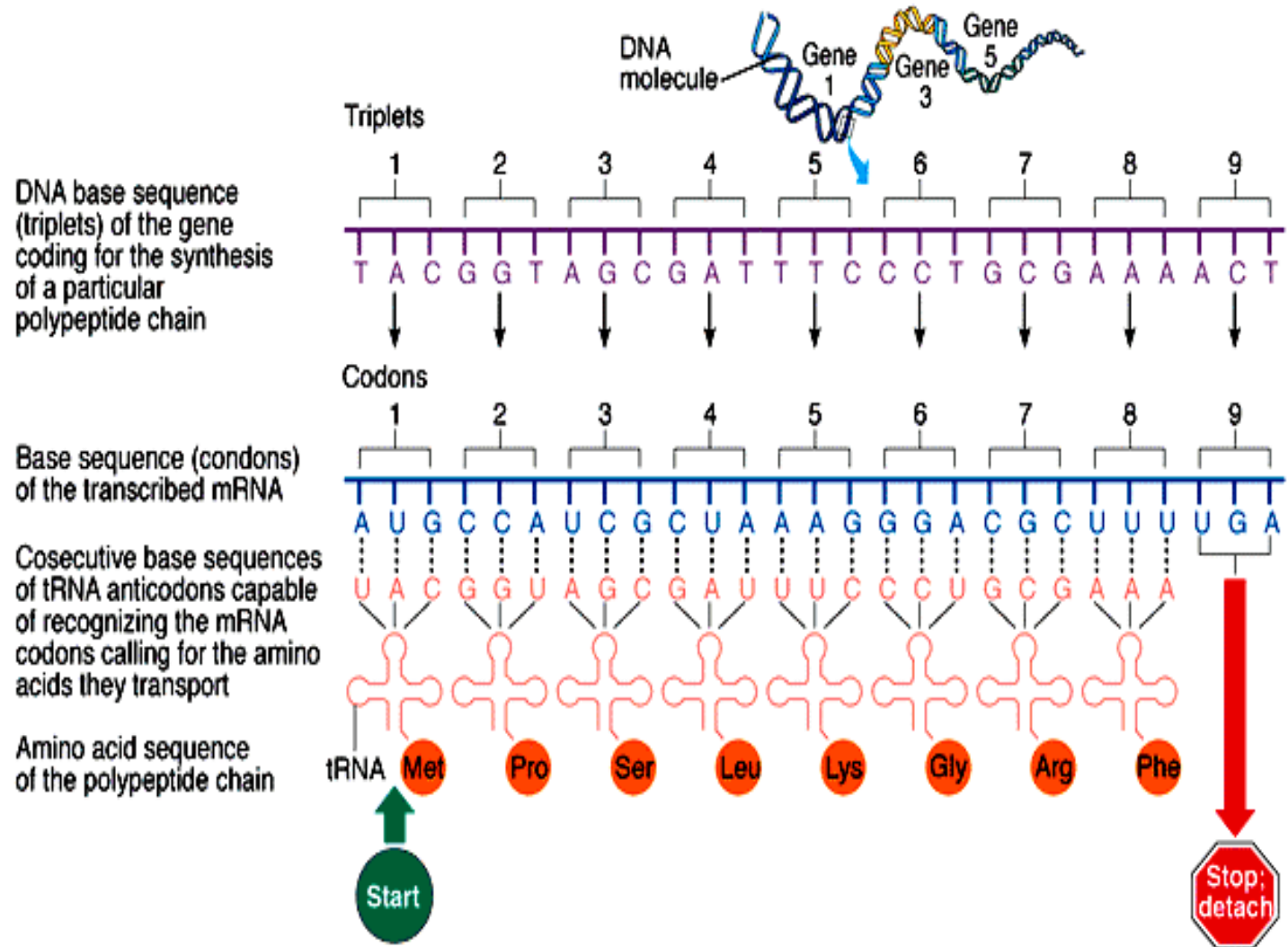
Genetický kód

Určuje pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci

Báze v DNA
(G, A, C, T)



20 proteinogenních
aminokyselin



Genetický kód

Tripletový – 4³ kombinací

Degenerovaný – 20 AMK x jednoznačný

Nepřekrývající se

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU UUC UUA UUG Phenyl-alanine Leucine	UCU UCC UCA UCG Serine	UAU UAC UAA UAG Tyrosine Stop codon Stop codon	UGU UGC UGA UGG Cysteine Stop codon Tryptophan	U C A G
	C	CUU CUC CUA CUG Leucine	CCU CCC CCA CCG Proline	CAU CAC CAA CAG Histidine Glutamine	CGU CGC CGA CGG Arginine	U C A G
	A	AUU AUC AUA AUG Isoleucine Methionine; start codon	ACU ACC ACA ACG Threonine	AAU AAC AAA AAG Asparagine Lysine	AGU AGC AGA AGG Serine Arginine	U C A G
	G	GUU GUC GUA GUG Valine	GCU GCC GCA GCG Alanine	GAU GAC GAA GAG Aspartic acid Glutamic acid	GGU GGC GGA GGG Glycine	U C A G
						Third letter

Genetický kód

Sekvence DNA:

5' – **TTACGAAGGTTATTG** – 3'

↓ *Transkripce do mRNA:*

5' – **UUA CGA AGG UUA UUG** – 3'

Triplet1Triplet2Triplet3Triplet4Triplet5

↓ *Translace do proteinu:*

N–**Leu** **Arg** **Arg** **Leu** **Leu**–C

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU Phenyl-alanine UUC UUA Leucine UUG	UCU Serine UCC UCA UCG	UAU Tyrosine UAC UAA Stop codon UAG Stop codon	UGU Cysteine UGC UGA Stop codon UGG Tryptophan	U C A G
	C	CUU Leucine CUC CUA CUG	CCU Proline CCC CCA CCG	CAU Histidine CAC CAA Glutamine CAG	CGU Arginine CGC CGA CGG	U C A G
	A	AUU Isoleucine AUC AUA AUG Methionine; start codon	ACU Threonine ACC ACA ACG	AAU Asparagine AAC AAA Lysine AAG	AGU Serine AGC AGA Arginine AGG	U C A G
	G	GUU Valine GUC GUA GUG	GCU Alanine GCC GCA GCG	GAU Aspartic acid GAC GAA Glutamic acid GAG	GGU Glycine GGC GGA GGG	U C A G

Genetický kód

Sekvence DNA:

5' – **TTACGAAGGTTATTG** – 3'

↓ *Transkripce do mRNA:*

5' – **UUA CGA AGG UUA UUG** – 3'

Triplet1Triplet2Triplet3Triplet4Triplet5

↓ *Translace do proteinu:*

N–**Leu Arg Arg Leu Leu**–C

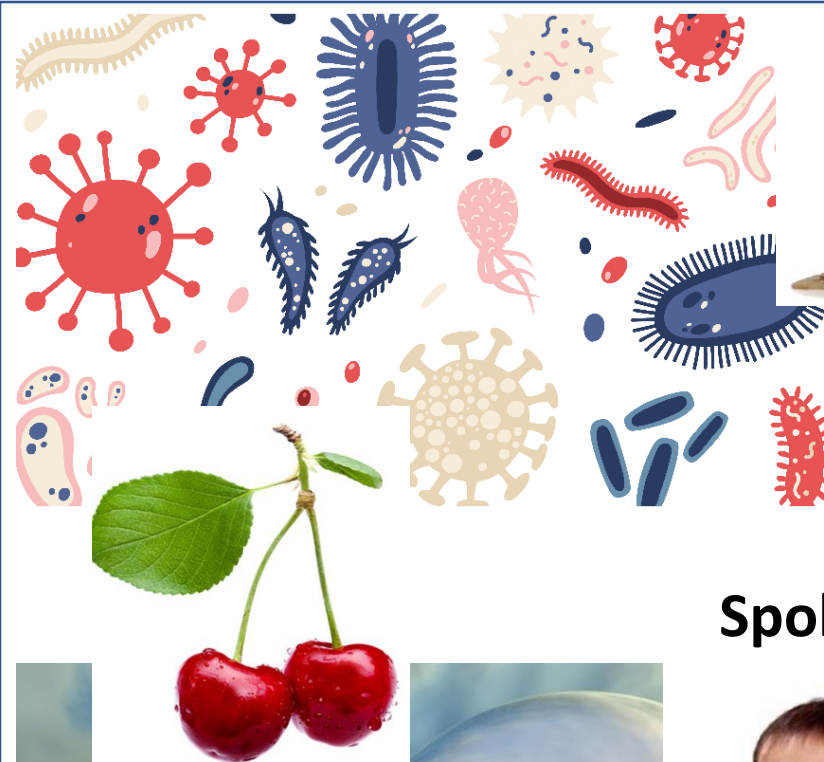
ČTECÍ RÁMEC!

Posunové - frameshift - mutace

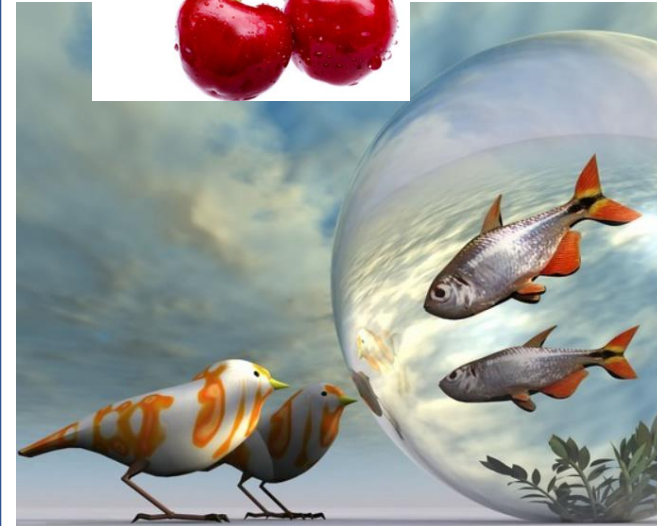
THE FAT CAT ATE THE BIG RAT
Delete C: THE FAT ATA TET HEB IGR AT
Insert A: THE FAT ATA ATE THE BIG RAT

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU Phenyl-alanine UUC UUA Leucine UUG	UCU Serine UCC UCA UCG	UAU Tyrosine UAC UAA Stop codon UAG Stop codon	UGU Cysteine UGC UGA Stop codon UGG Tryptophan	U C A G
	C	CUU Leucine CUC CUA CUG	CCU Proline CCC CCA CCG	CAU Histidine CAC CAA Glutamine CAG	CGU Arginine CGC CGA CGG	U C A G
	A	AUU Isoleucine AUC AUA AUG Methionine; start codon	ACU Threonine ACC ACA ACG	AAU Asparagine AAC AAA Lysine AAG	AGU Serine AGC AGA Arginine AGG	U C A G
	G	GUU Valine GUC GUA GUG	GCU Alanine GCC GCA GCG	GAU Aspartic acid GAC GAA Glutamic acid GAG	GGU Glycine GGC GGA GGG	U C A G

Genetický kód je UNIVERZÁLNÍ



Společný jazyk translace



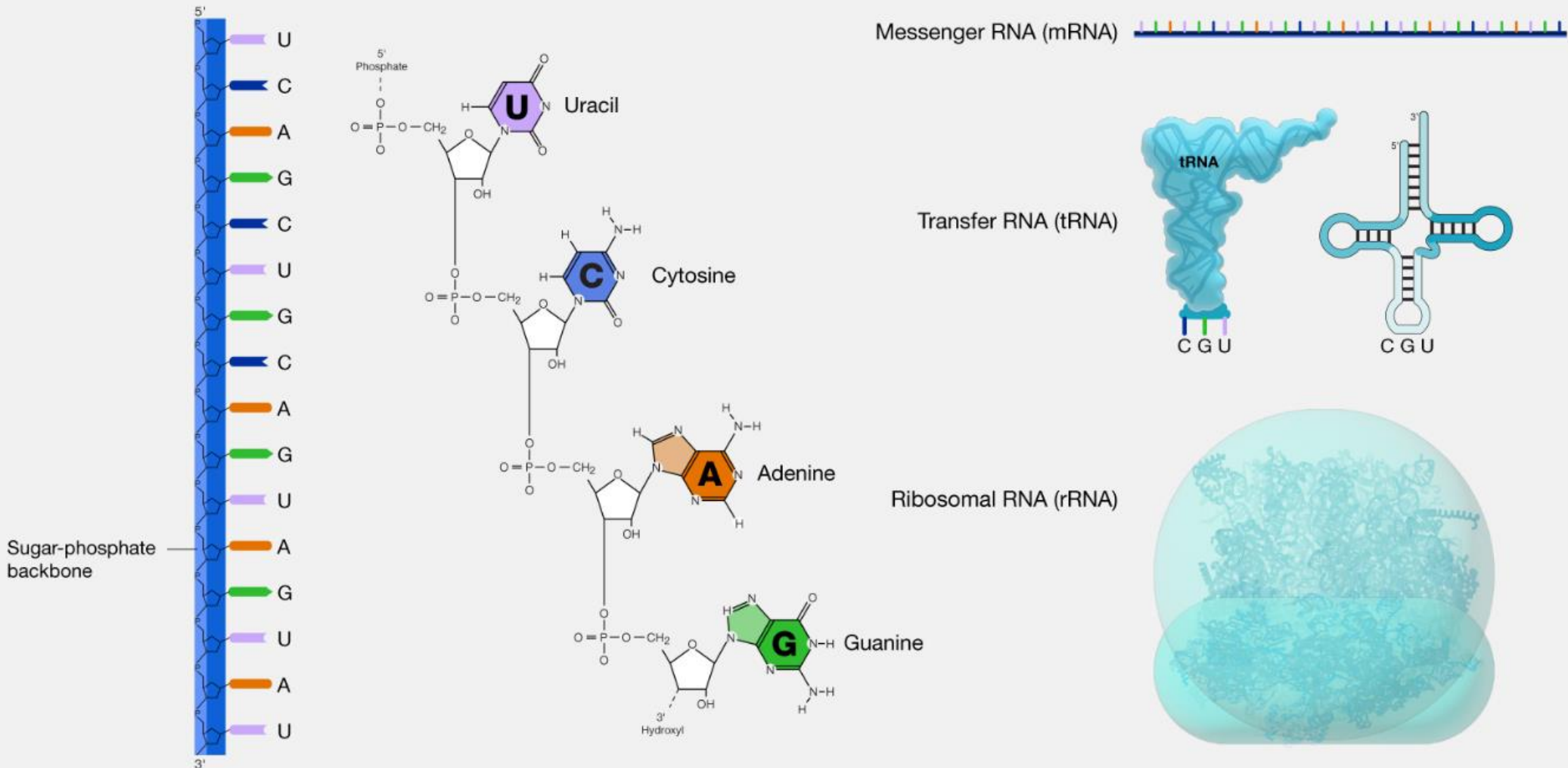
Genetický kód je univerzální

Ale výjimky existují...

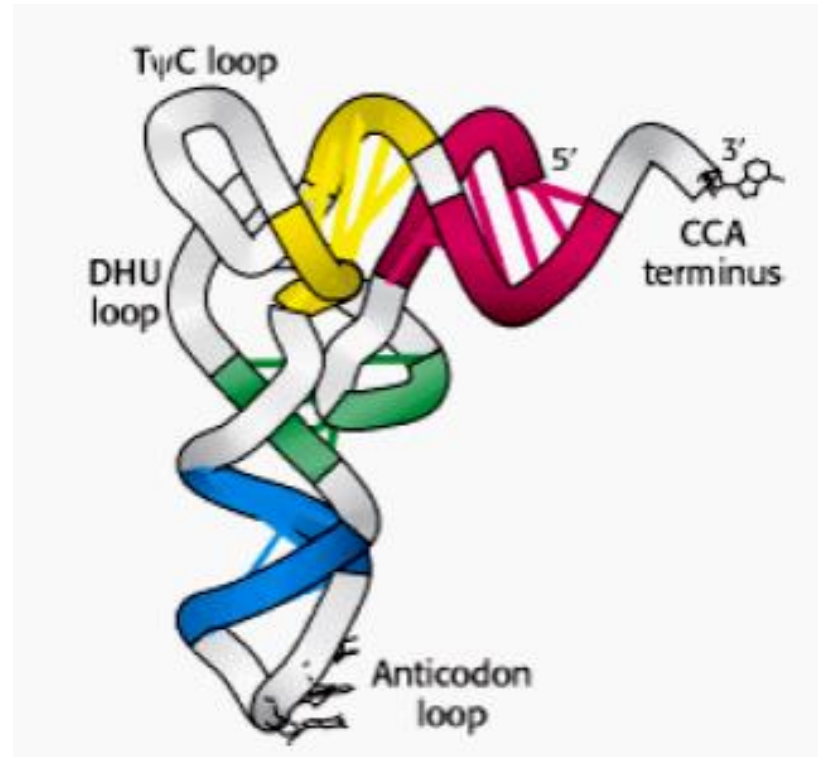
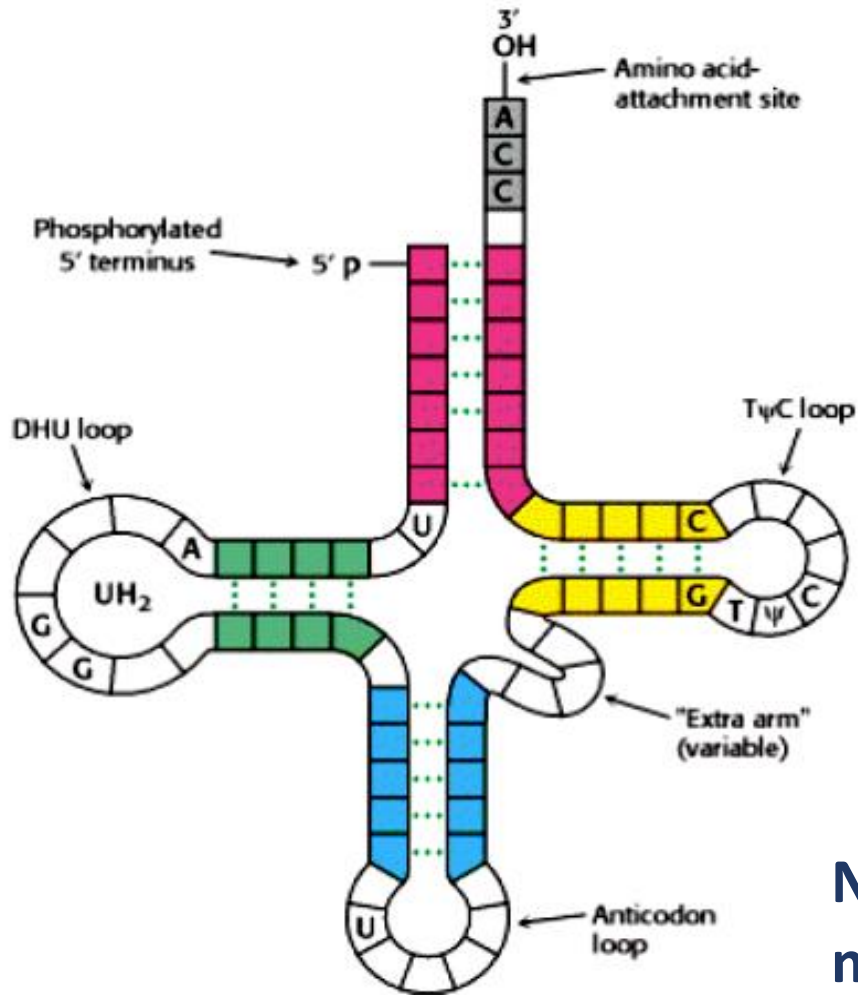
Codon	Normal Code Word	Altered Code Word	Source
UGA	Termination	trp	Human and yeast mitochondria and <i>Mycoplasma</i>
CUA	Leu	thr	Yeast mitochondria
AUA	Ile	met	Human mitochondria
AGA	Arg	Termination	Human mitochondria
AGG	Arg	Termination	Human mitochondria
UAA	Termination	gln	<i>Paramecium</i> , <i>Tetrahymena</i> , and <i>Stylonychia</i>
UAG	Termination	gln	<i>Paramecium</i>

Translace vyžaduje 3 typy RNA

Ribonucleic acid (RNA)

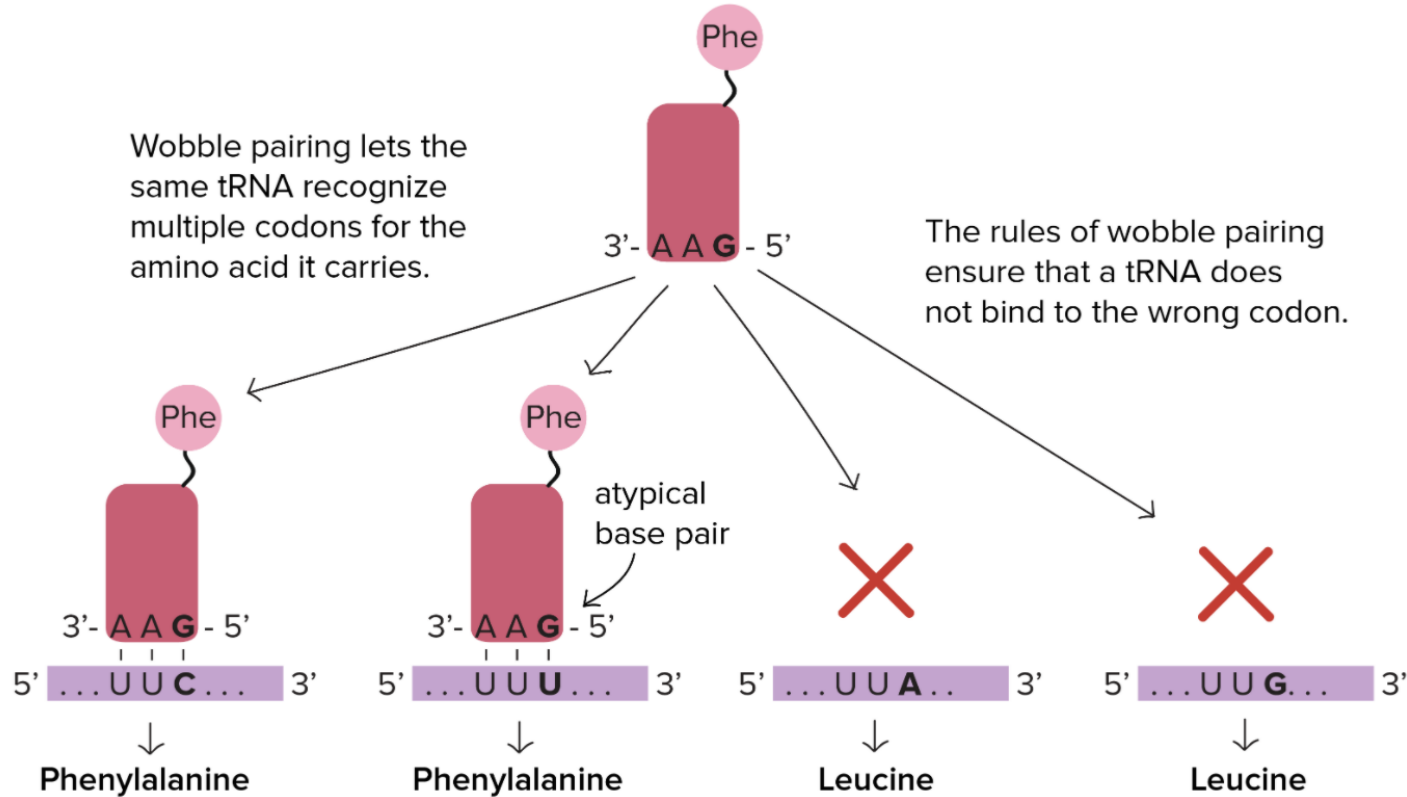


Obecná struktura tRNA



Neobvyklé báze vznikají enzymatickou modifikací standardních ribonukleotidů v prekurzorových tRNA

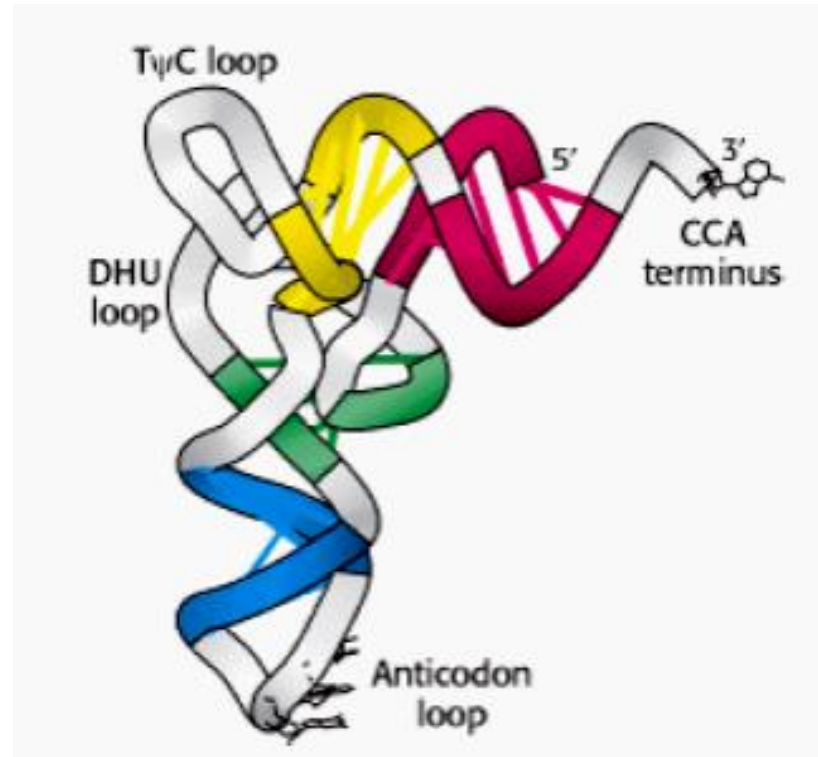
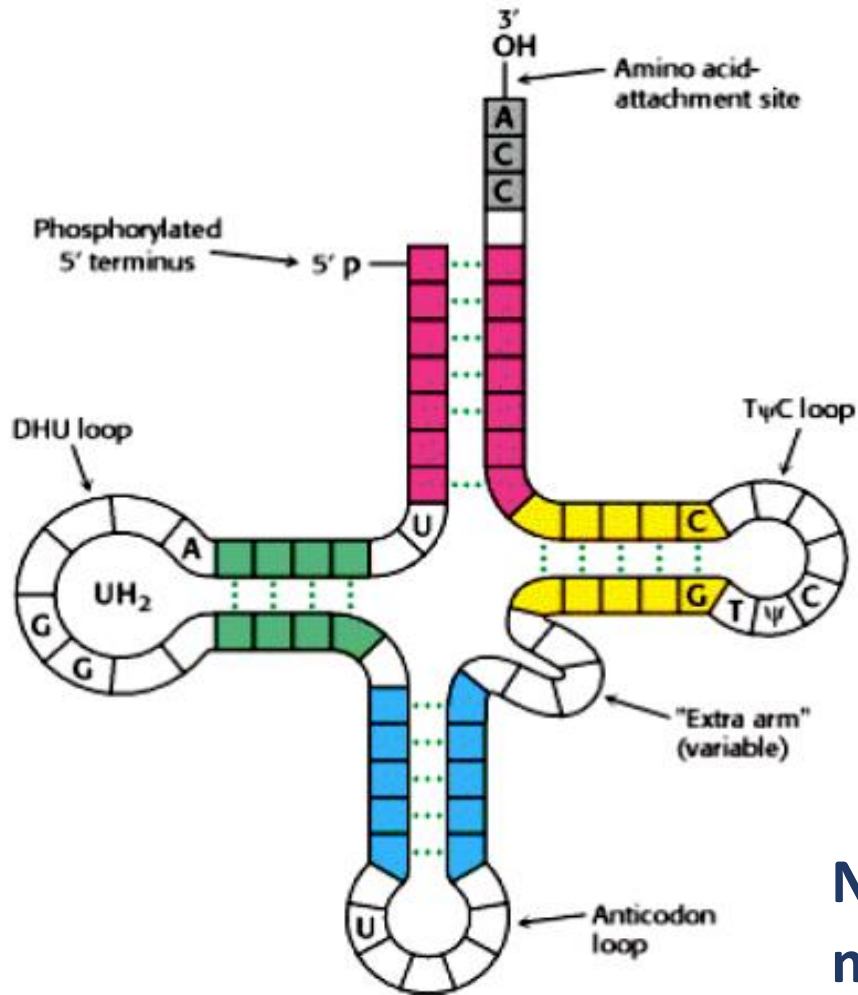
tRNA - wobbling



UUU	UUC	Phenylalanine
UUA	UUG	Leucine

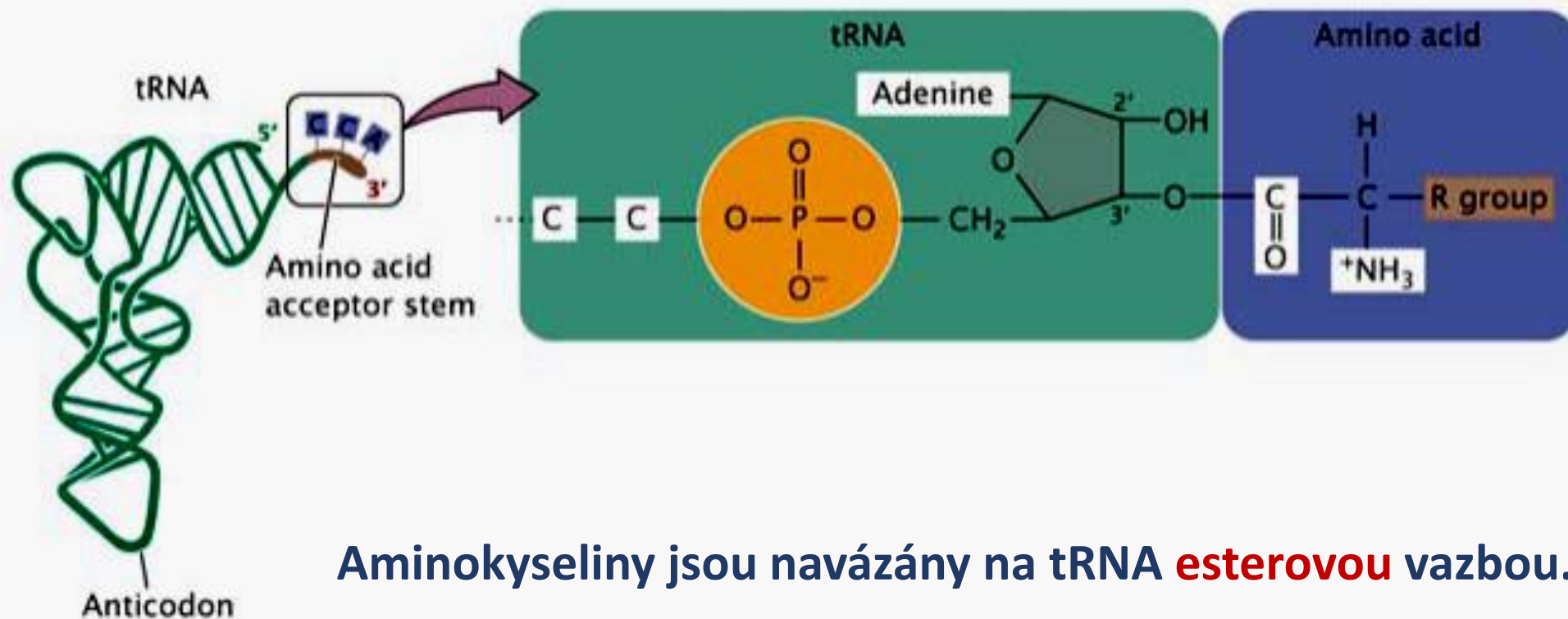
		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU Phenylalanine UUC Phenylalanine UUA Leucine UUG Leucine	UCU Serine UCC Serine UCA Serine UCG Serine	UAU Tyrosine UAC Tyrosine UAA Stop codon UAG Stop codon	UGU Cysteine UGC Cysteine UGA Stop codon UGG Tryptophan	U C A G
	C	CUU Leucine CUC Leucine CUA Leucine CUG Leucine	CCU Proline CCC Proline CCA Proline CCG Proline	CAU Histidine CAC Histidine CAA Glutamine CAG Glutamine	CGU Arginine CGC Arginine CGA Arginine CGG Arginine	U C A G
	A	AUU Isoleucine AUC Isoleucine AUA Isoleucine AUG Methionine; start codon	ACU Threonine ACC Threonine ACA Threonine ACG Threonine	AAU Asparagine AAC Asparagine AAA Lysine AAG Lysine	AGU Serine AGC Serine AGA Arginine AGG Arginine	U C A G
	G	GUU Valine GUC Valine GUA Valine GUG Valine	GCU Alanine GCC Alanine GCA Alanine GCG Alanine	GAU Aspartic acid GAC Aspartic acid GAA Glutamic acid GAG Glutamic acid	GGU Glycine GGC Glycine GGA Glycine GGG Glycine	U C A G

Obecná struktura tRNA



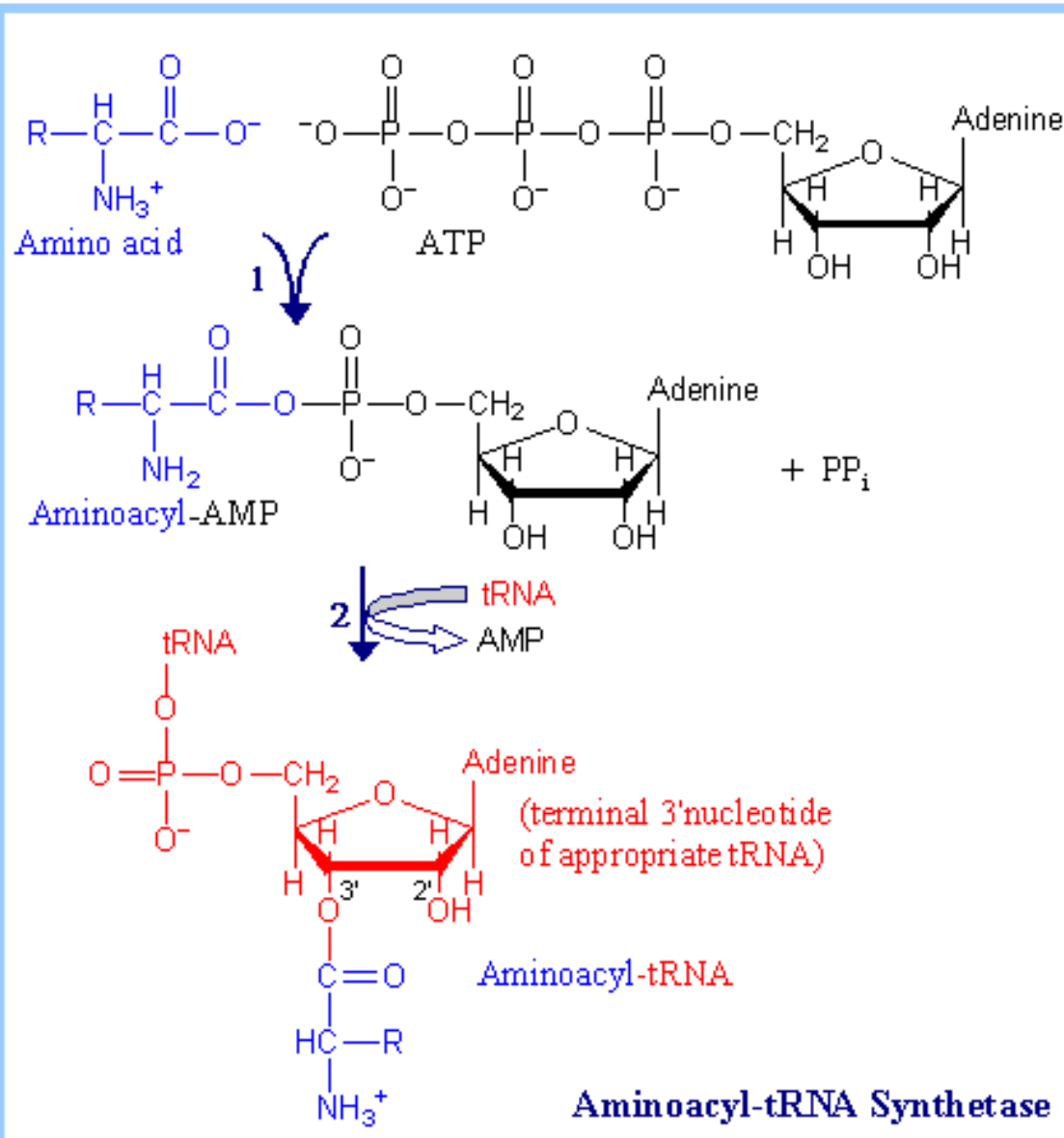
Neobvyklé báze vznikají enzymatickou modifikací standardních ribonukleotidů v prekurzorových tRNA

Aktivace aminokyselin



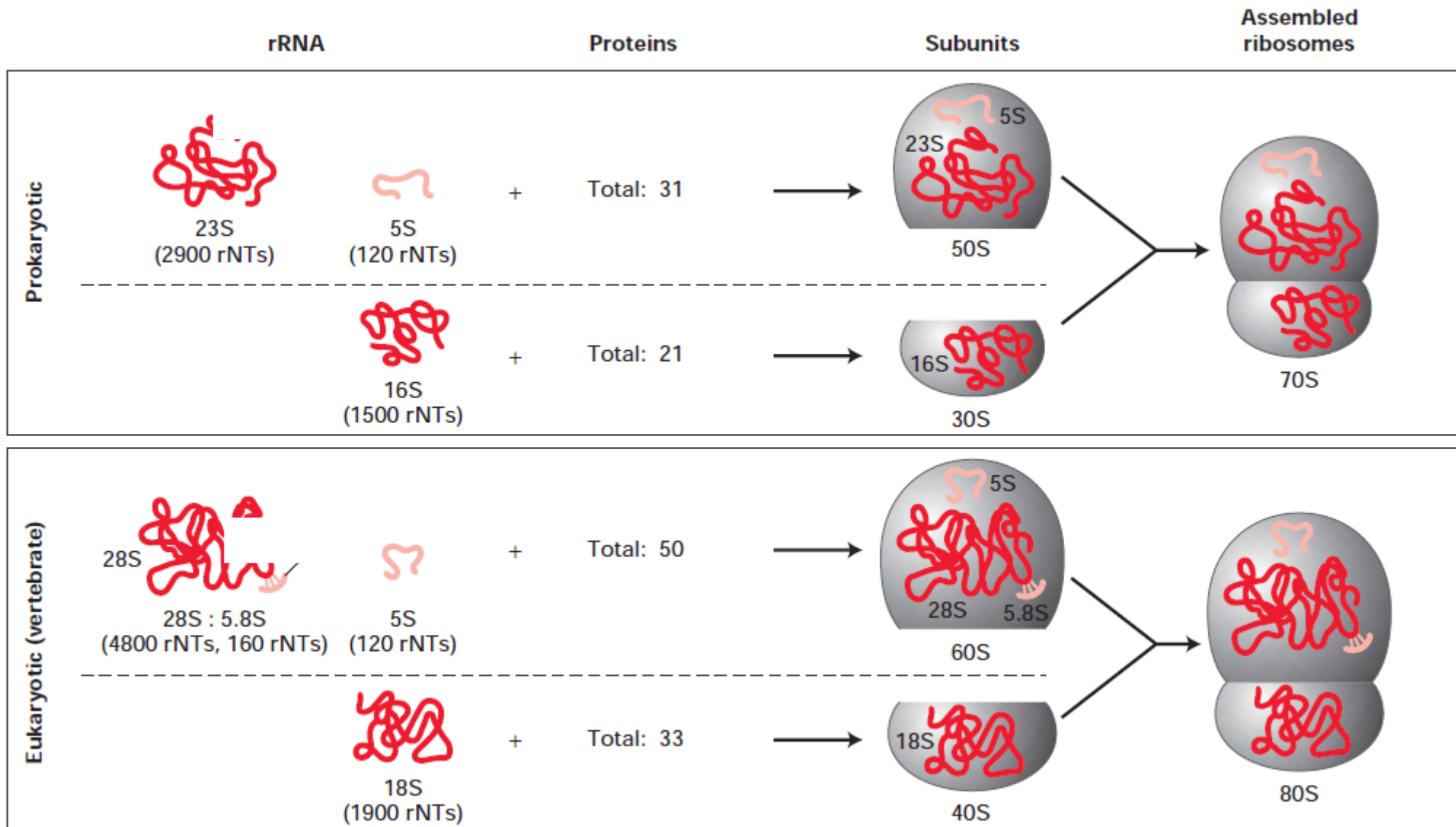
Aminokyseliny jsou navázány na tRNA **esterovou** vazbou.

Aktivace aminokyselin



- Dvoustupňová reakce
- Katalyzují aminoacyl-tRNA syntetázy
- Spotřeba ATP

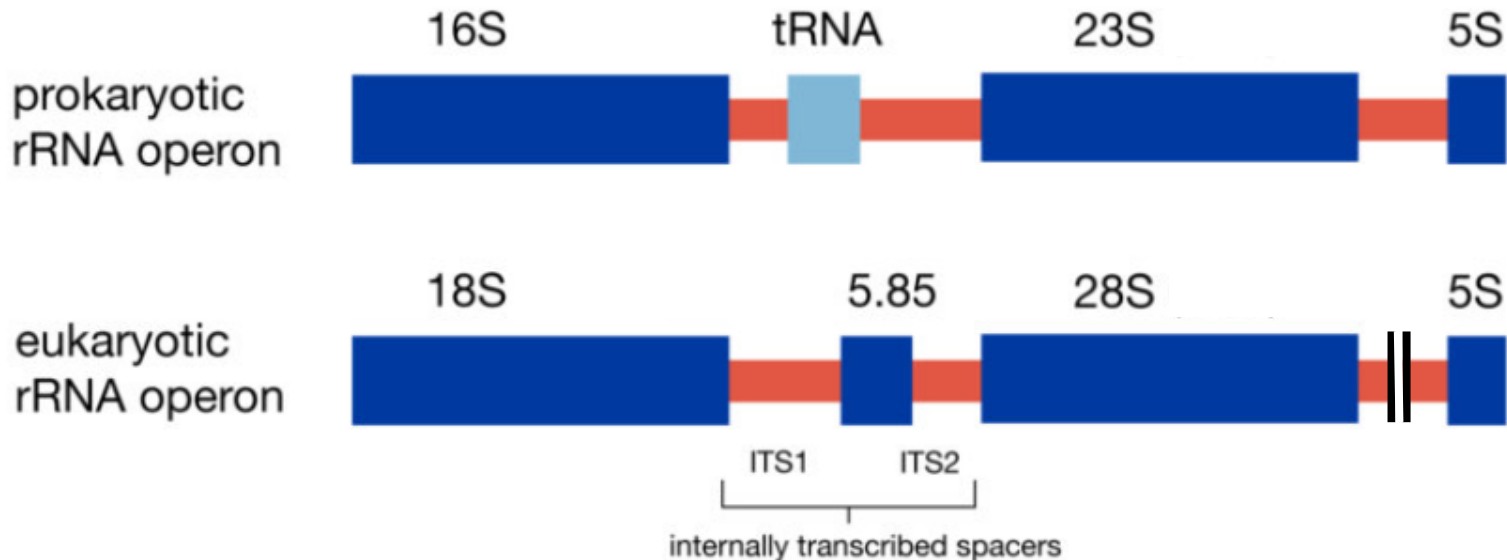
Složení prokaryotických a eukaryotických ribozomů



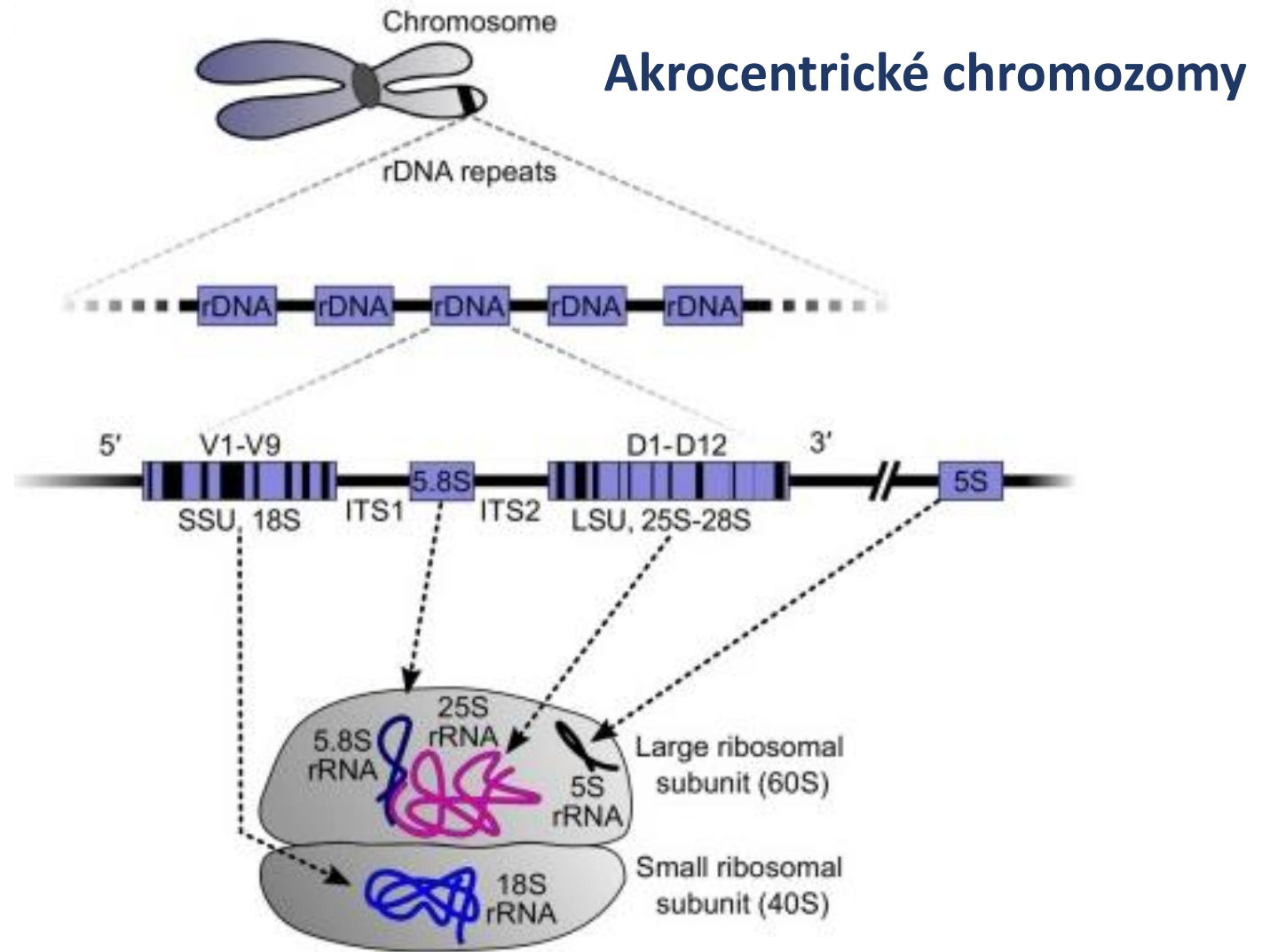
rDNA operon

U prokaryot: primární transkript obsahuje všechny tři rRNA molekuly (16S, 23S a 5S rRNA) a molekula tRNA vyštěpeny (ribonukleázou III) z jediného primárního transkriptu 30S.

U eukaryot: primární transkript obsahuje úseky pro 18S, 5.8S a 28S v tandemové repetici. 5S rDNA je kódována zvlášť.

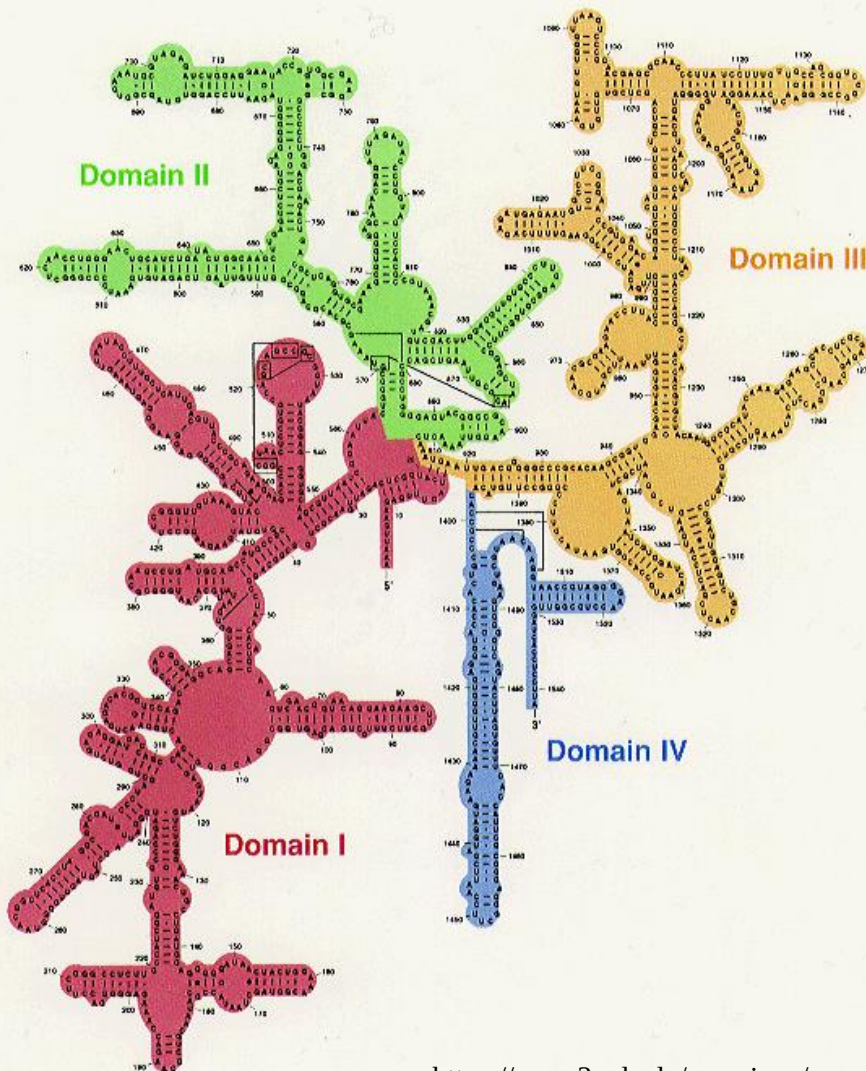


rDNA operon u eukaryot



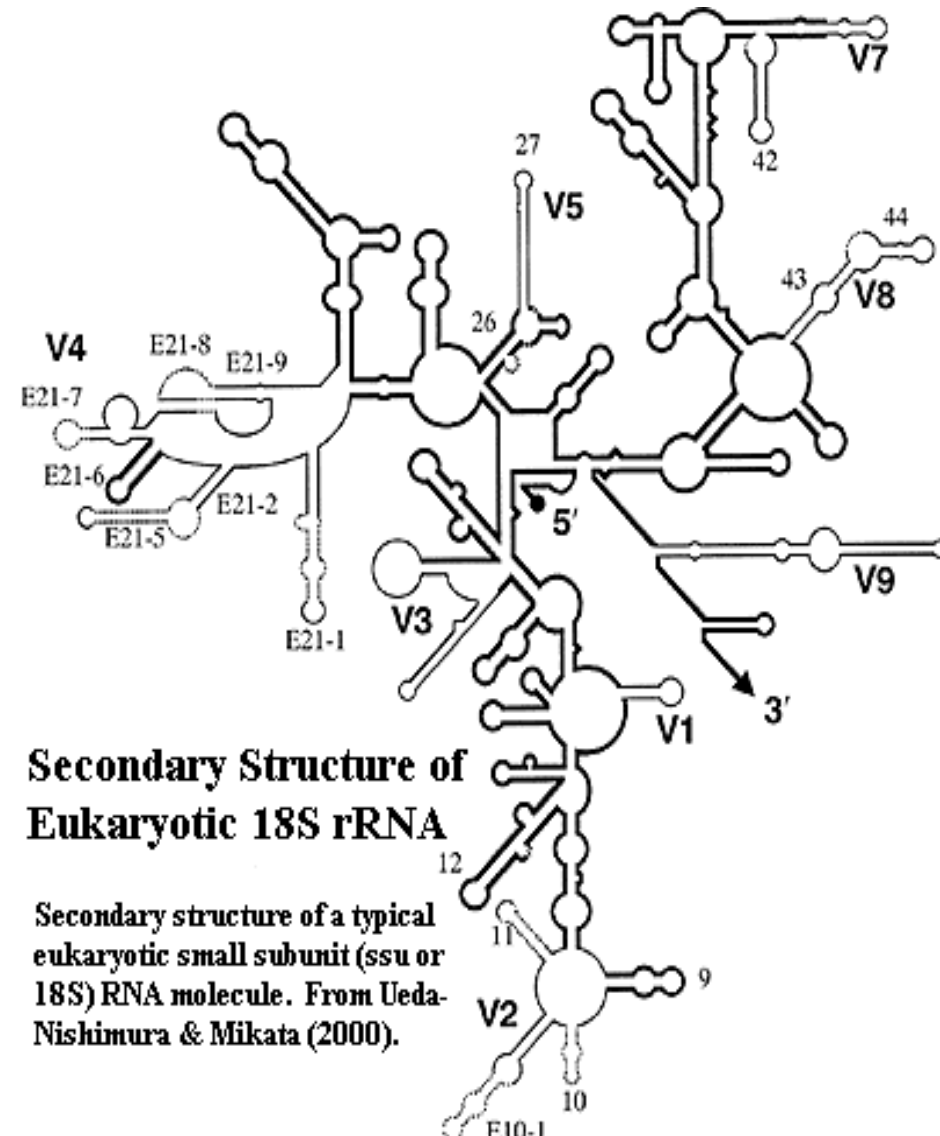
Sekundární struktura ribozomální RNA

16S rRNA



<https://www3.nd.edu/~aseriann/rrna.gif>

18S rRNA



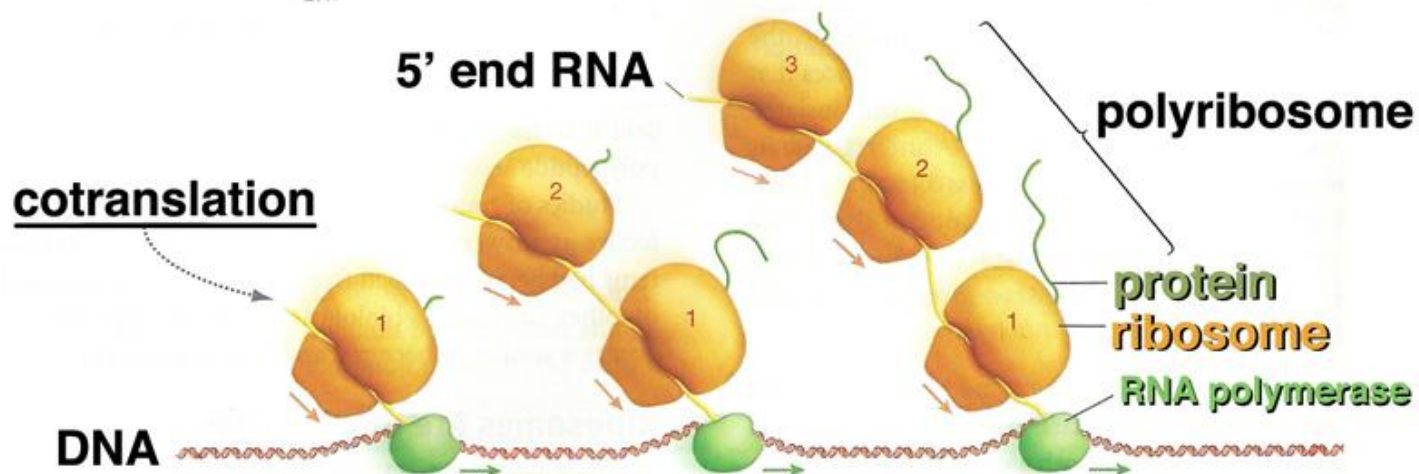
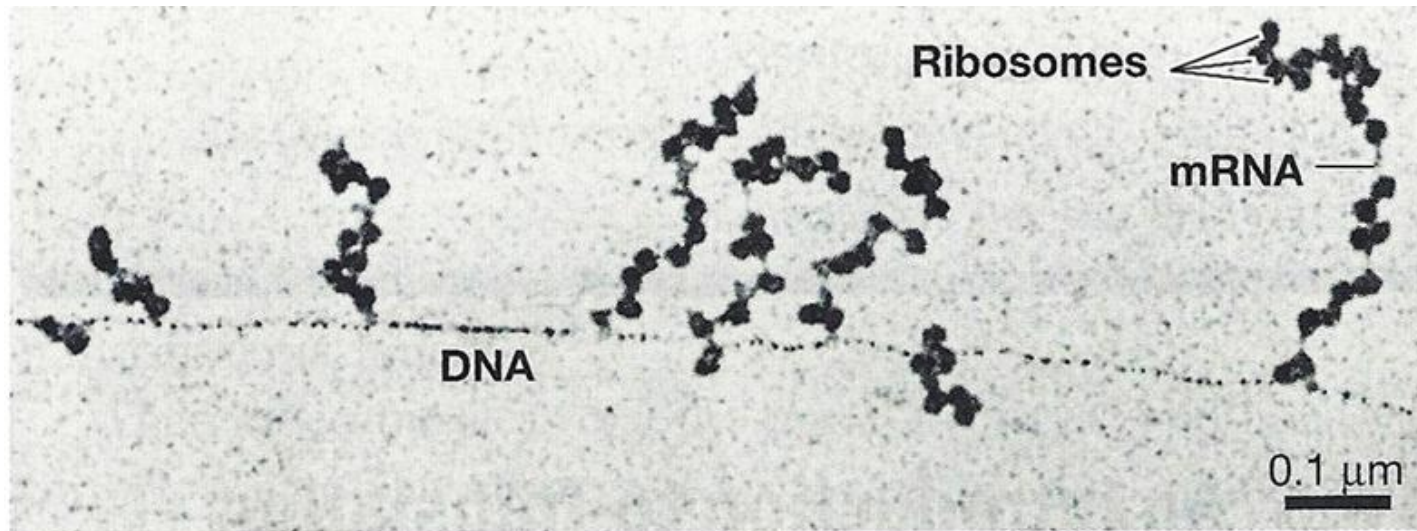
Secondary Structure of Eukaryotic 18S rRNA

Secondary structure of a typical eukaryotic small subunit (ssu or 18S) RNA molecule. From Ueda-Nishimura & Mikata (2000).

Translacija u prokaryot

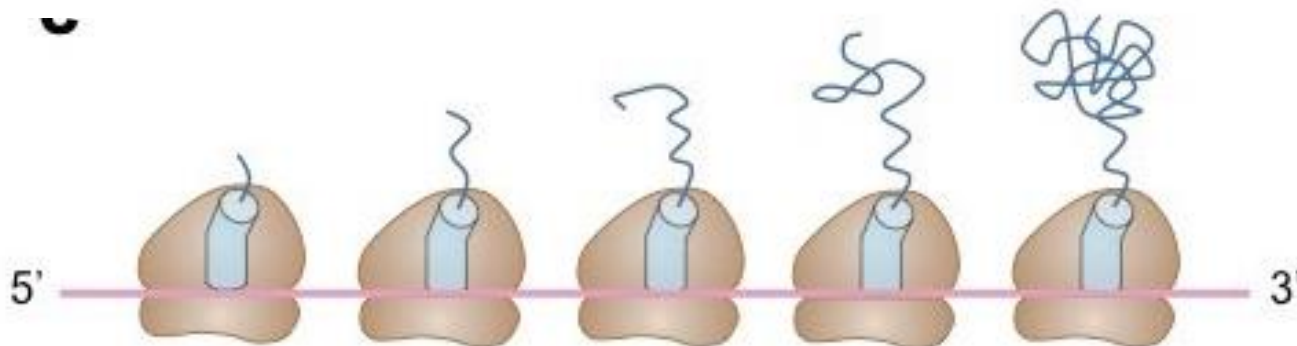
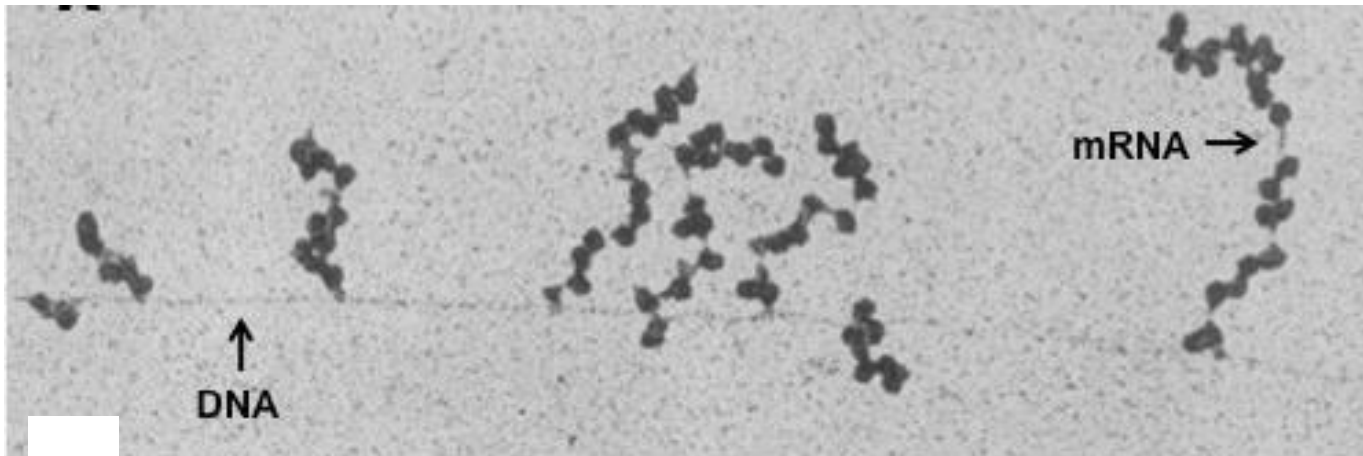
Prokaryotní RNA polymeráza a ribozom v činnosti na stejné molekule mRNA

Transkripcí vznikají molekuly mRNA, které se bezprostředně translatují řadou ribozomů

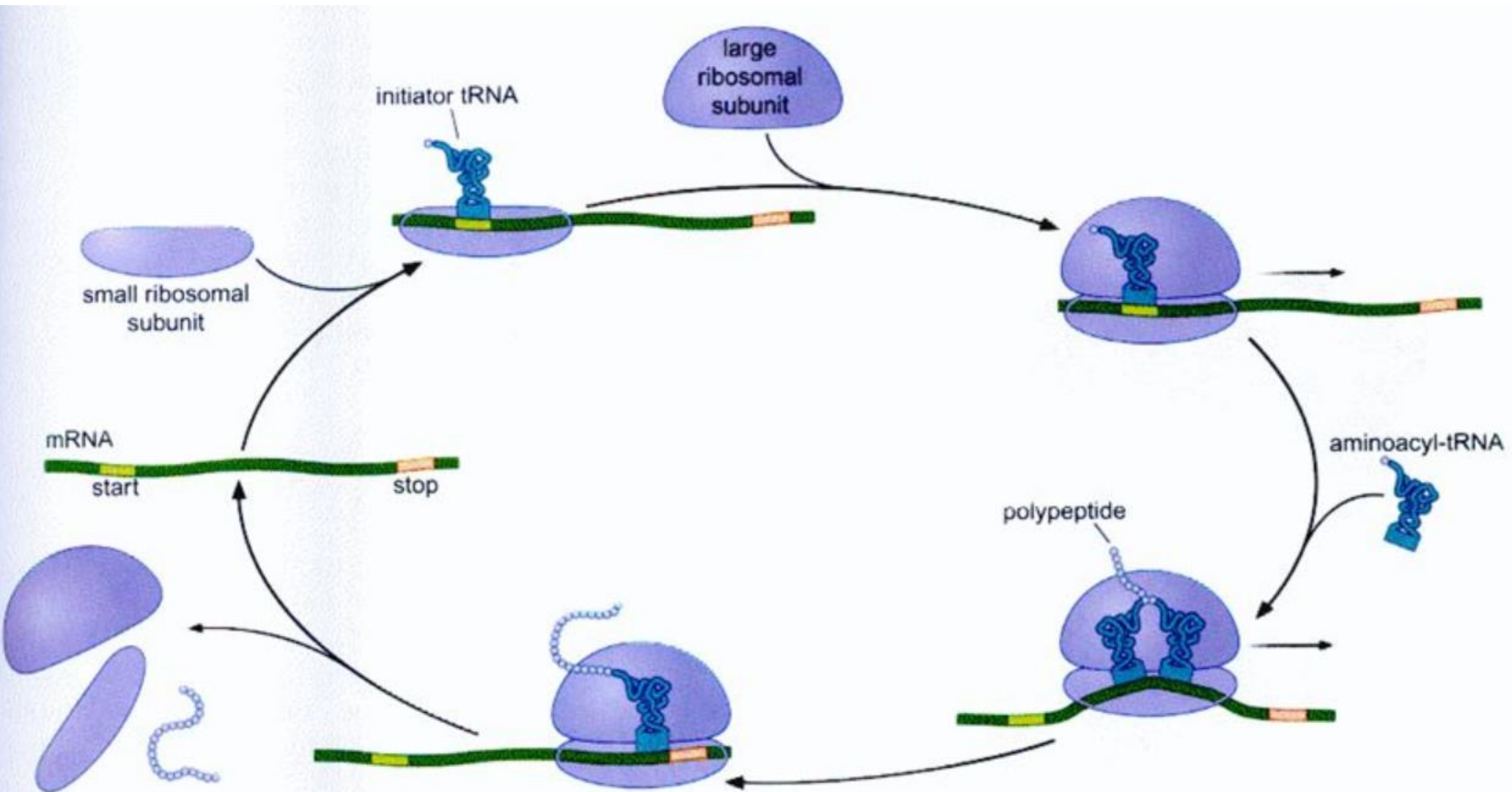


Polyribozom

Každá molekula mRNA může být translatována na více ribozomech.
mRNA nesoucí více ribozomů se označuje jako polyribozom či polyzom
-> zvýšené využití mRNA

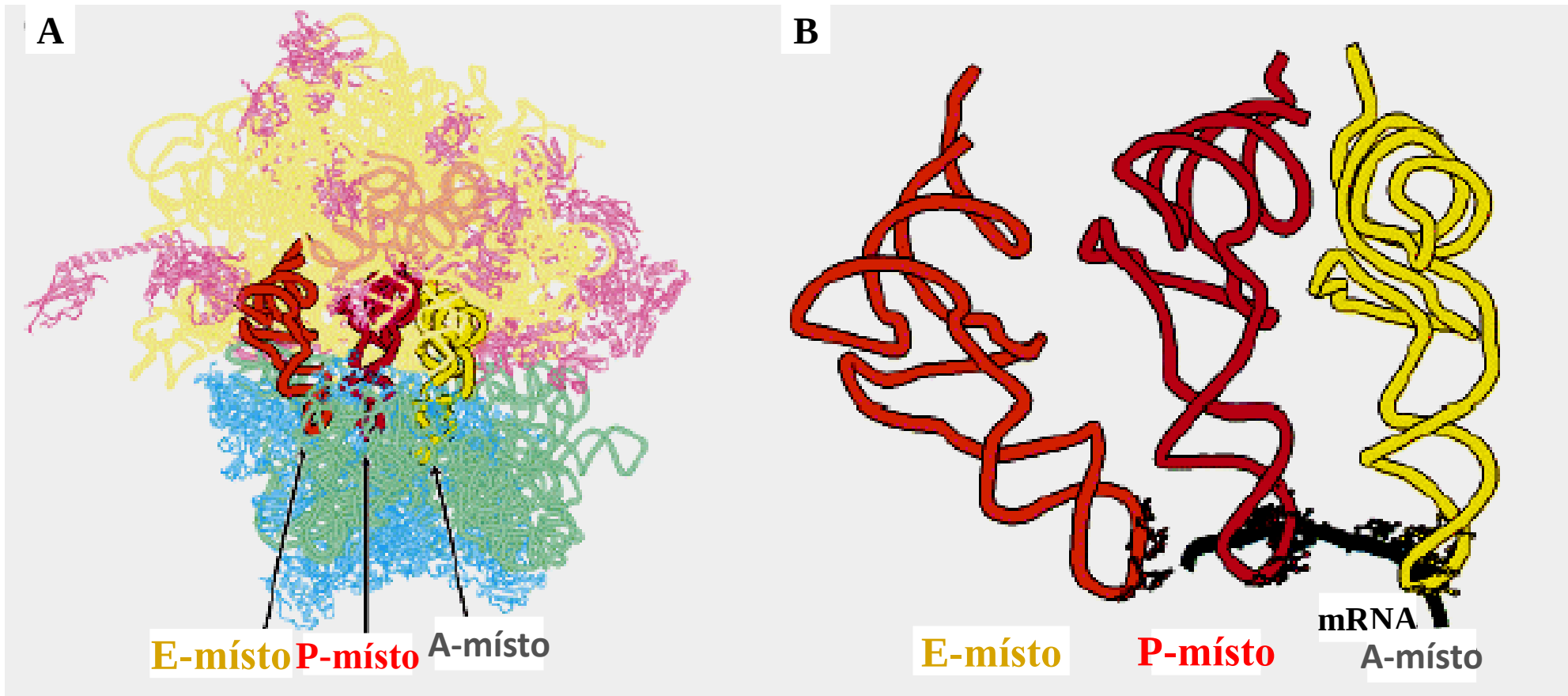


Ribozomální cyklus

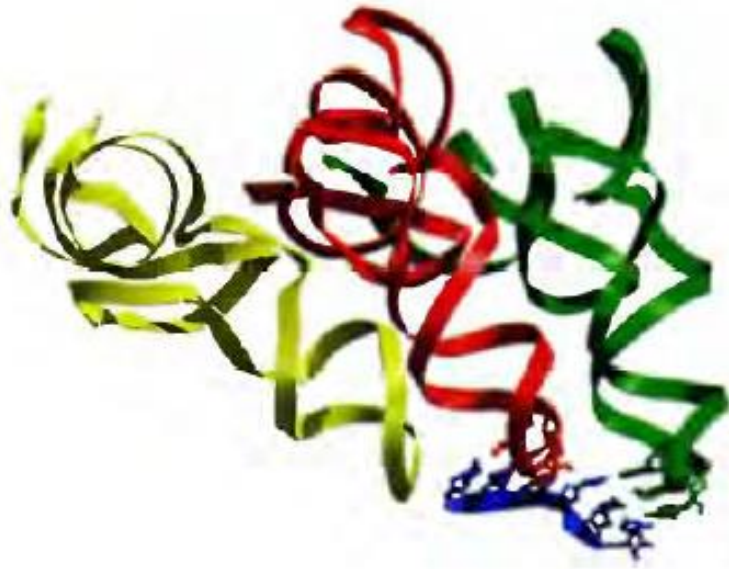


Vazebná místa pro tRNA a mRNA na ribozomu (70S)

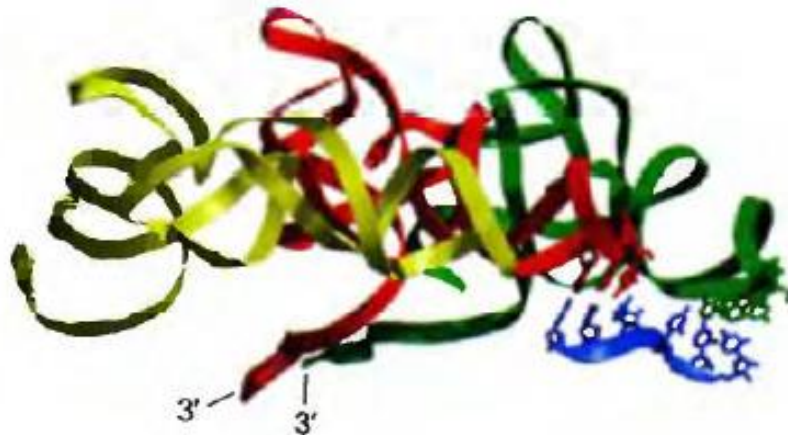
tRNA molekuly se váží s oběma ribosomálními podjednotkami; na 30S podjednotce v místech **A (pro aminoacyl)** a **P (pro peptidyl)** asociují 2 ze 3 interagujících molekul svými antikodony s kodony mRNA; třetí tRNA se váže v sousedním vazebném místě, nazvaném **E (pro exit)**.



Interakce na ribozomu mezi molekulami tRNA v A a P místě a molekulou mRNA

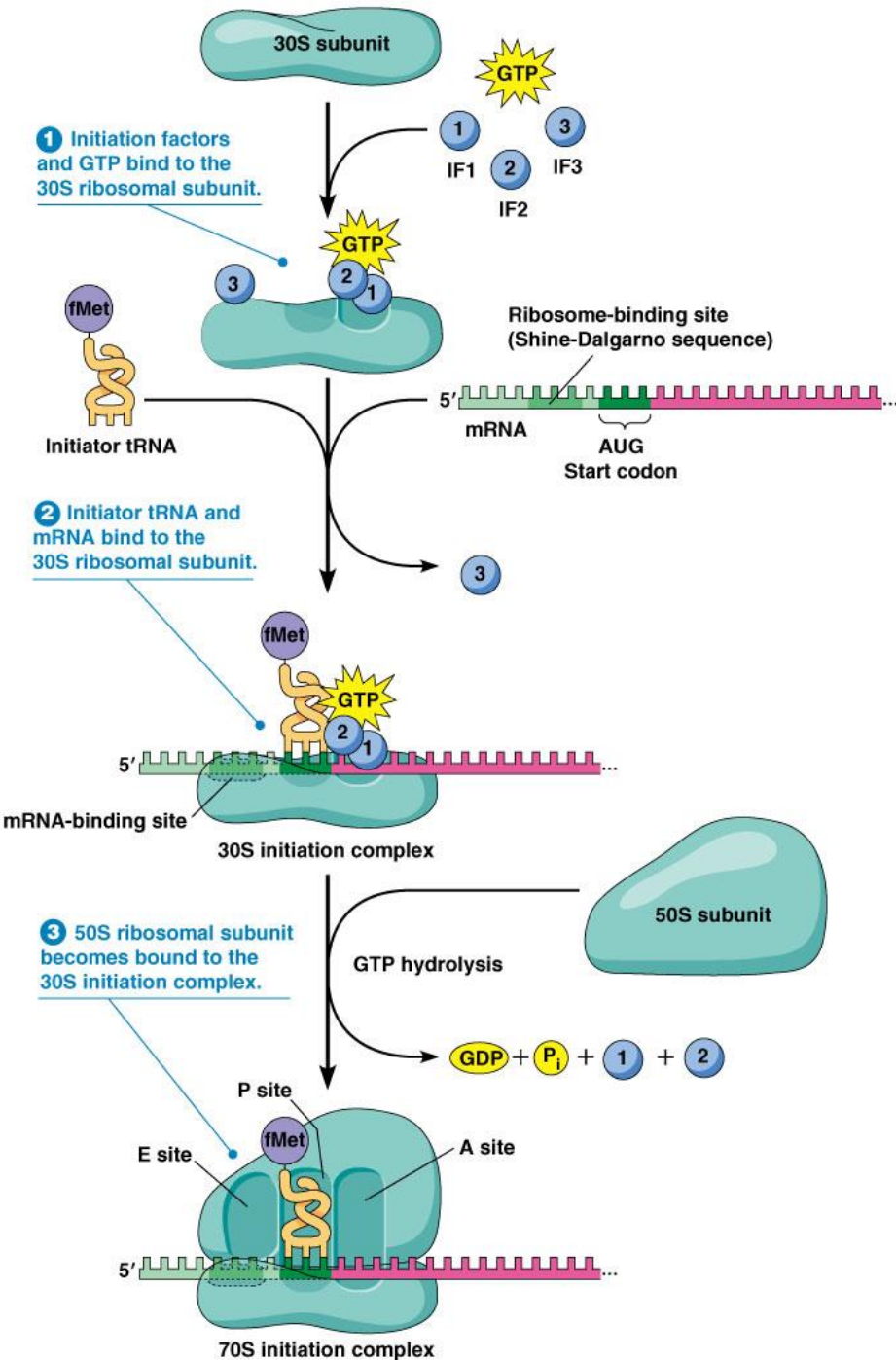


tRNA molekuly v místě **E**, **P** a **A** jsou nakresleny žlutě, červeně a zeleně; mRNA je označena modře.



3' konce tRNA molekul v místě A a P jsou lokalizovány v těsné blízkosti.

Iniciace translace u prokaryot



Iniciační faktory napomáhají vytvoření 30S a následně 70S iniciačního komplexu.

fMet~tRNA je v 30S iniciačním komplexu vázána na kodon AUG nad peptidylovým místem.

3' konec 16S rRNA je komplementární k Shine-Dalgarno sekvenci mRNA

E. coli trpA mRNA 5' AGCACGAGGGGAAAUCUGAUGGAACGCUAC 3'

E. coli araB mRNA UUUGGAUGGAGUGAAACGAUGGCCGAUUGCA

E. coli lacI mRNA CAAUUCAGGGUGGUGAAUCUGAAACCAGUA

λ phage *CRO* mRNA AUGUACUAAGGAGGUUGUAUGGAACAAGCG

Shine-Dalgarno sequence

Initiation codon;
pairs with fMet-tRNA^{fMet}

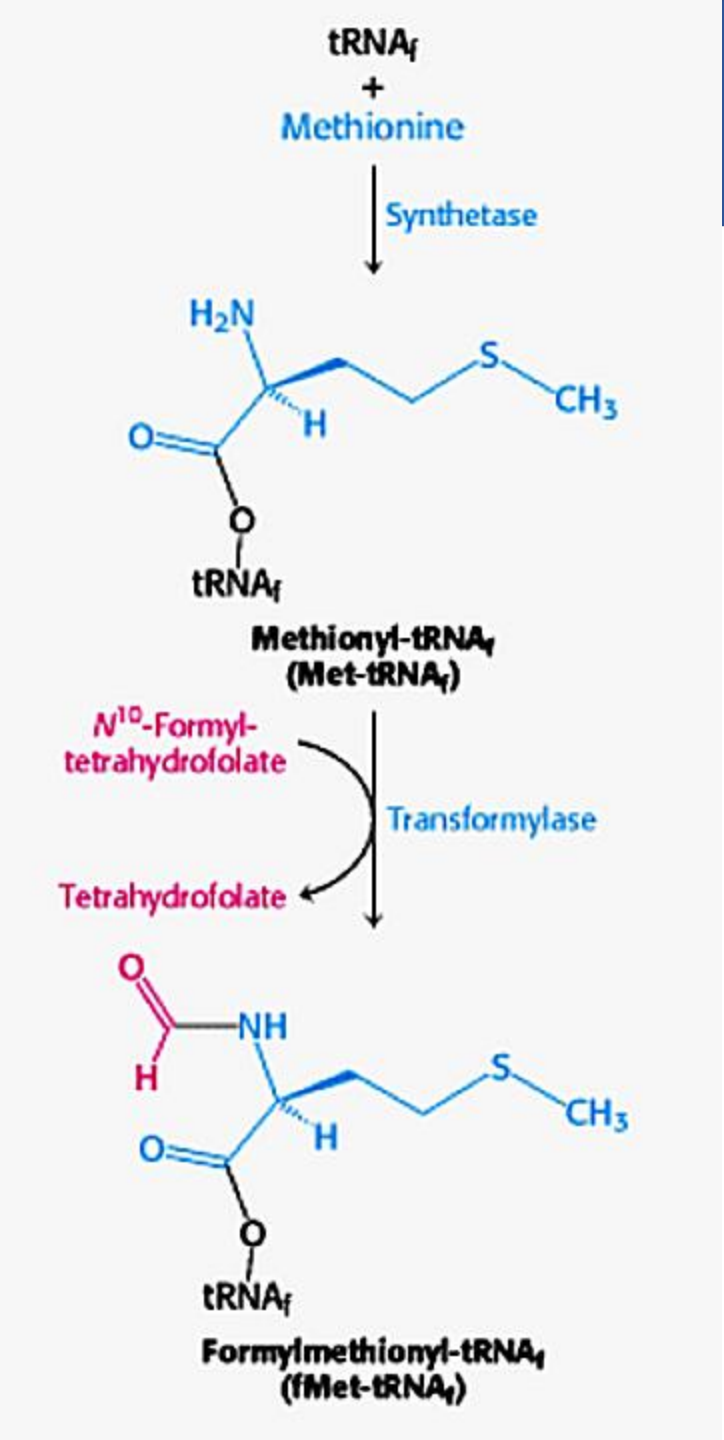
mRNA 5' AUGUACUAAGGAGGUUGUAUGGAACAAGACG 3'

AUUCUCCA

Initiation codon

16S rRNA 3' 5'

Formylace methionyl-tRNA



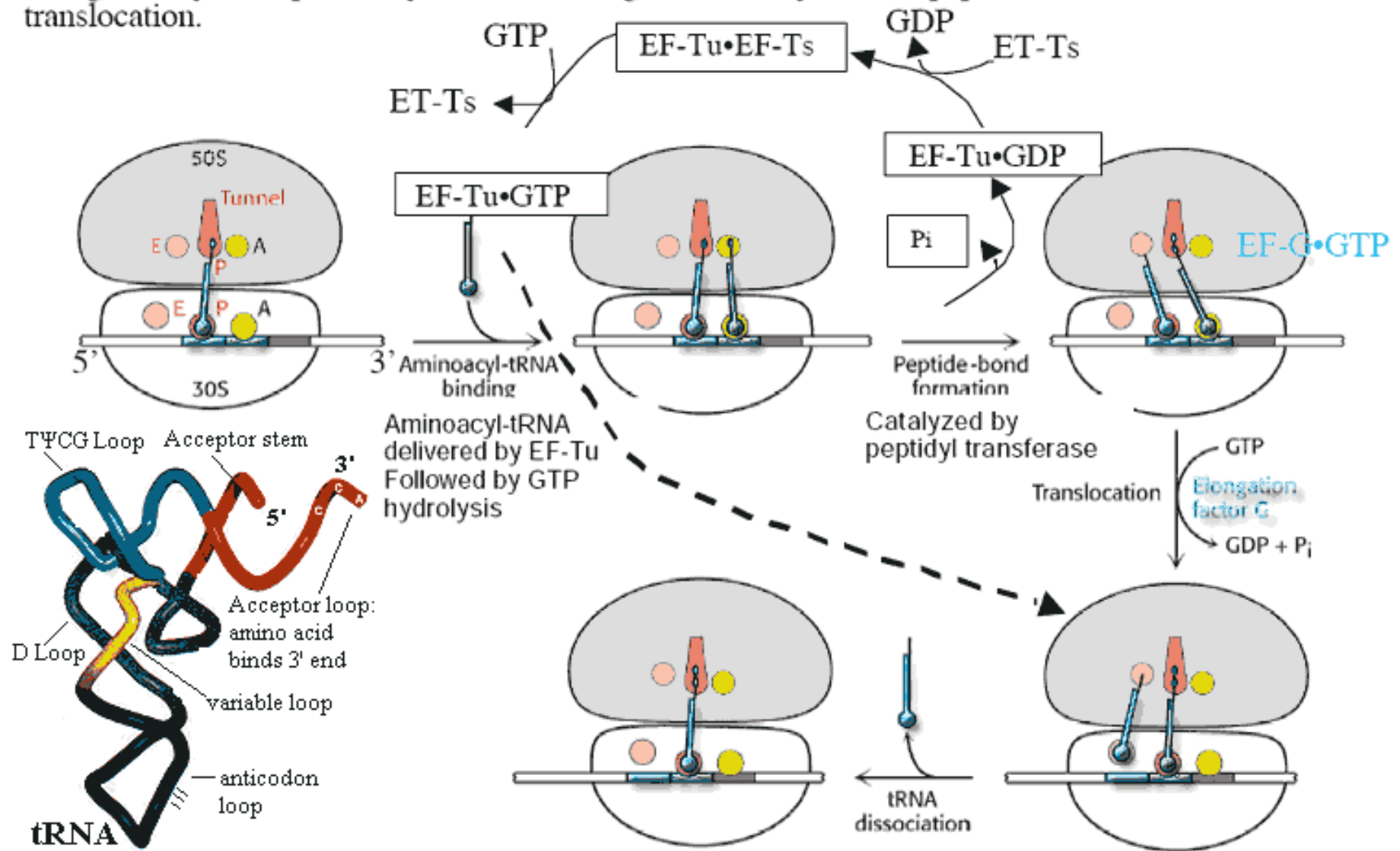
První aminokyselinou u prokaryot je
N-formylmethionin!

- Vazba Met na tRNA_i
- formylace **transformylázou**
(donor: N¹⁰- formyltetrahydrofolát).

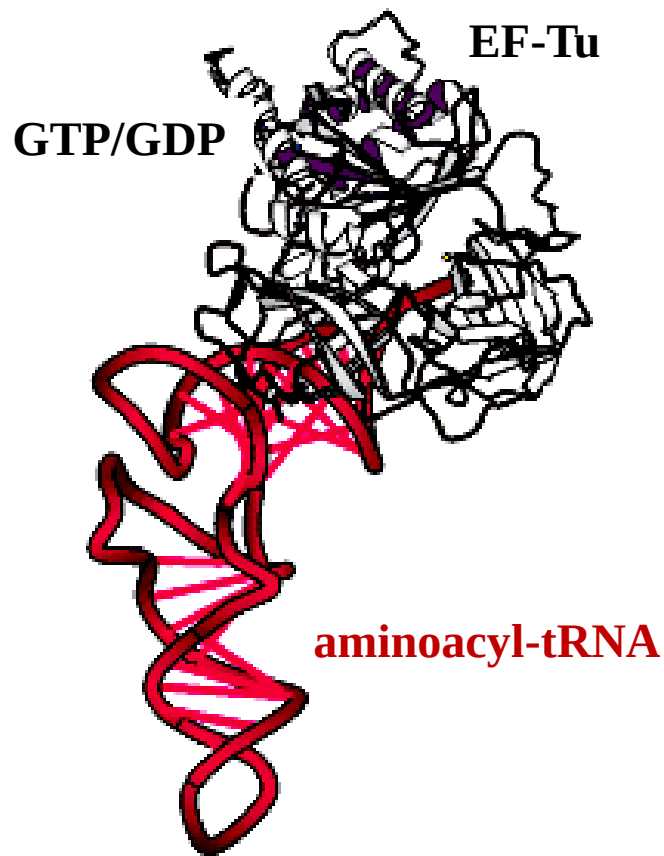
- Vazba Met na tRNA_i
- formylace **transformylázou**
(donor: N¹⁰- formyltetrahydrofolát).

Mechanism translace u prokaryot - elongace

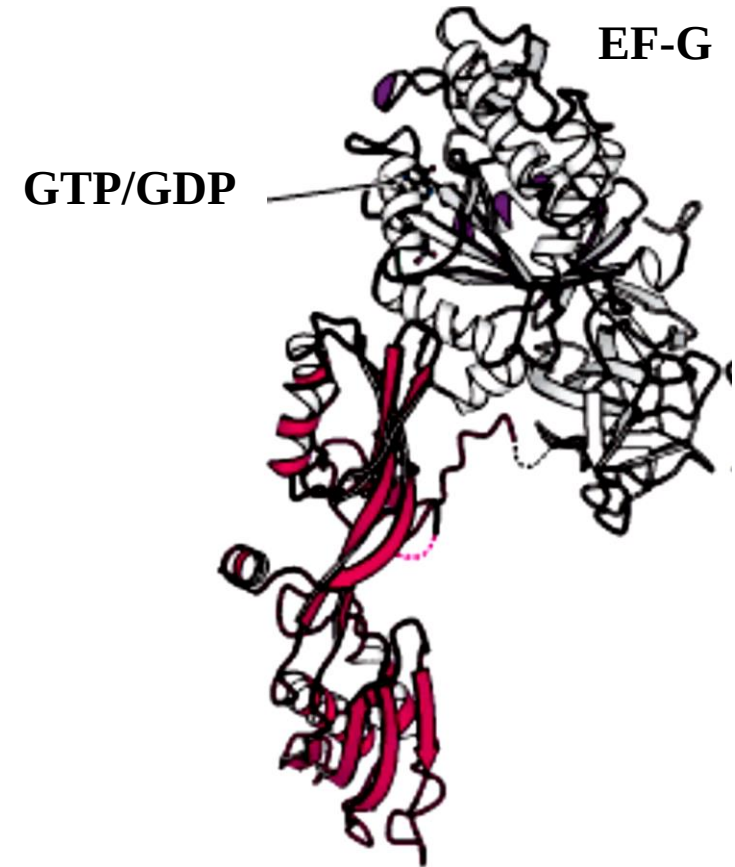
Elongation cycle of protein synthesis: Binding of aminoacyl-tRNA, peptide bond formation and translocation.



Struktura elongačního faktoru Tu a G se podobá

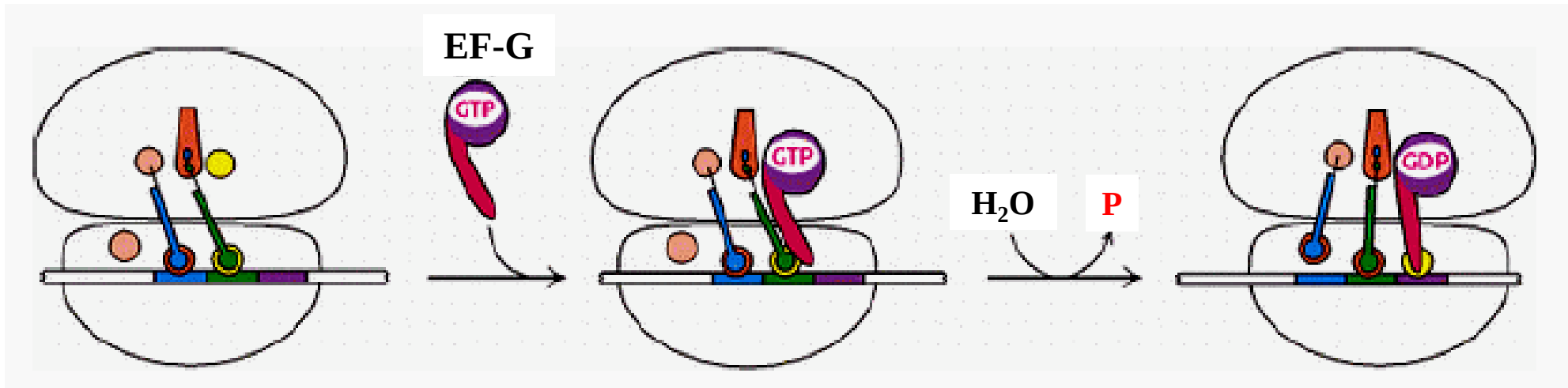


EF-Tu.GTP
navázání aa~tRNA do A-místa
ribozomu v závislosti na kodonu v
tomto místě.



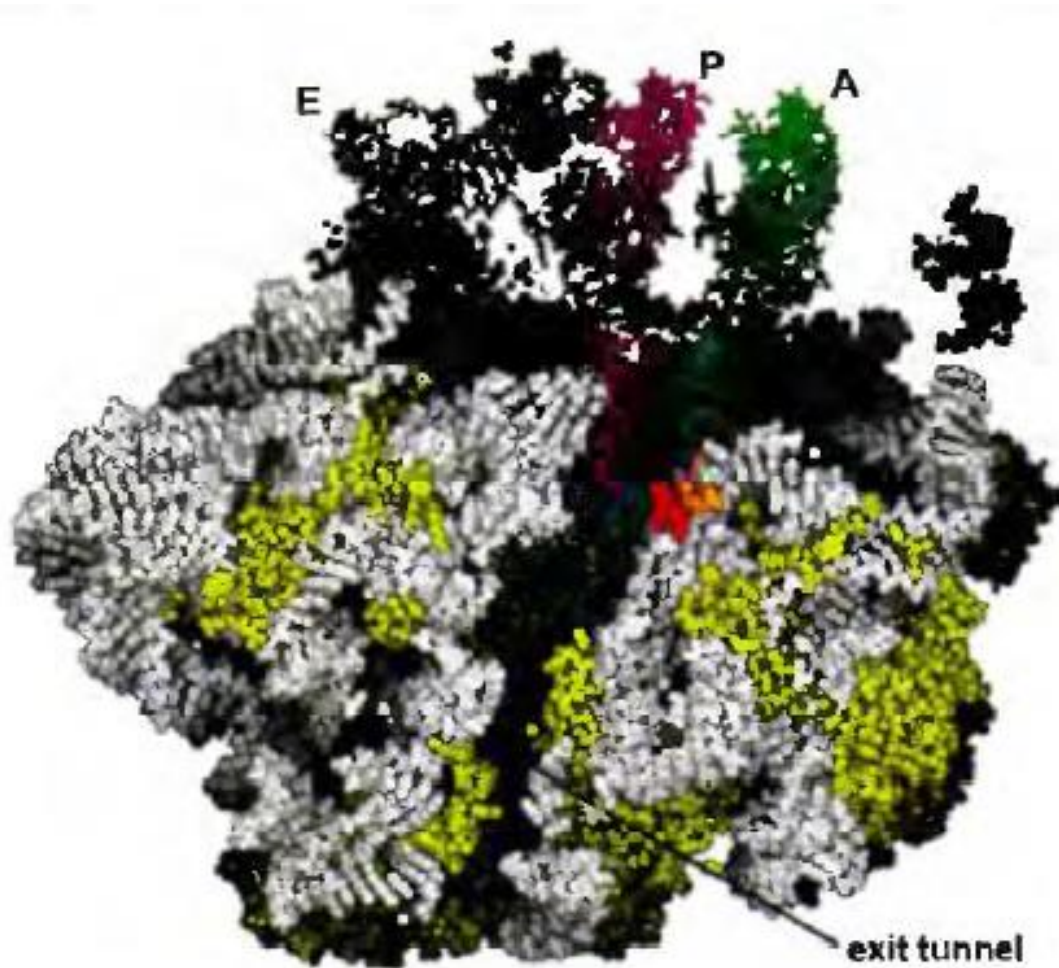
EF-G.GTP
Posun mRNA a tRNA o jeden kodon

Mechanismus translokace



Vazba EF-G (v GTP formě) na vazebné místo pro EF-Tu na 50S podjednotce stimuluje hydrolýzu GTP, což vede ke konformační změně faktoru EF-G, která podmiňuje interakci faktoru v místě A na 30S podjednotce. Přizpůsobení této konformační změně způsobuje posun mRNA a tRNA o vzdálenost odpovídající jednomu kodonu.

Kanál, kterým prochází syntetizovaný polypeptid



Průřez podjednotkou 50S s polypeptidovým výstupním tunelem (rRNA , ribozomální proteiny).

3 tRNA v E-místě, P-místě a A-místě.

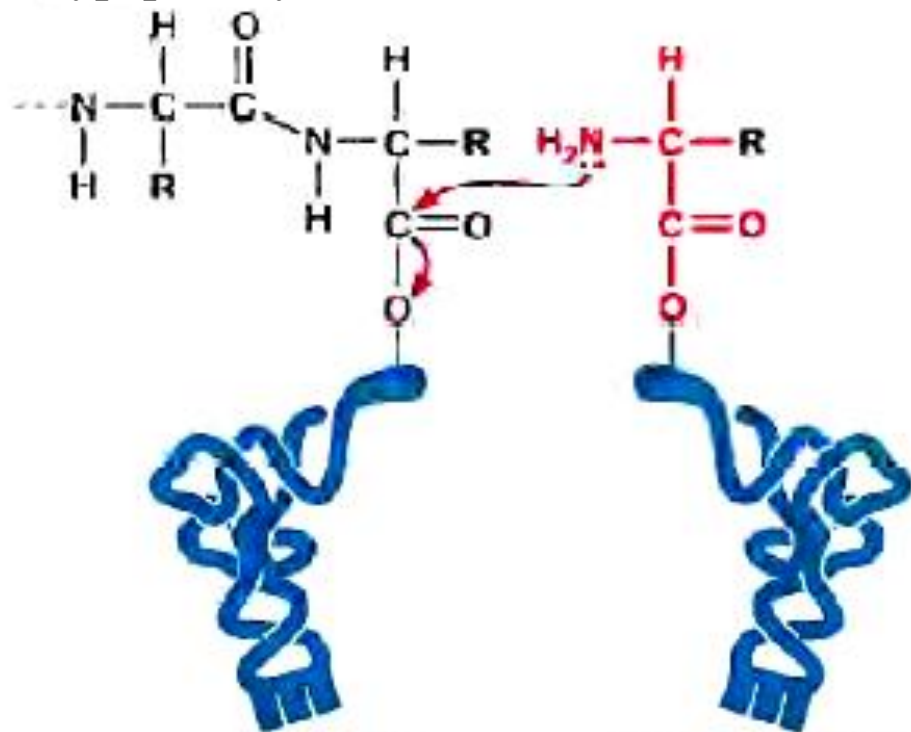
Červeně a oranžově vyznačené části rRNA přiléhající k A-místu tRNA jsou součástí peptidyl transferázového centra.

Peptidyltransferázová reakce

Aminoskupina aminoacyl-tRNA v ribozomovém vazebném místě A reaguje s karbonylovou skupinou peptidyl-tRNA v místě P.

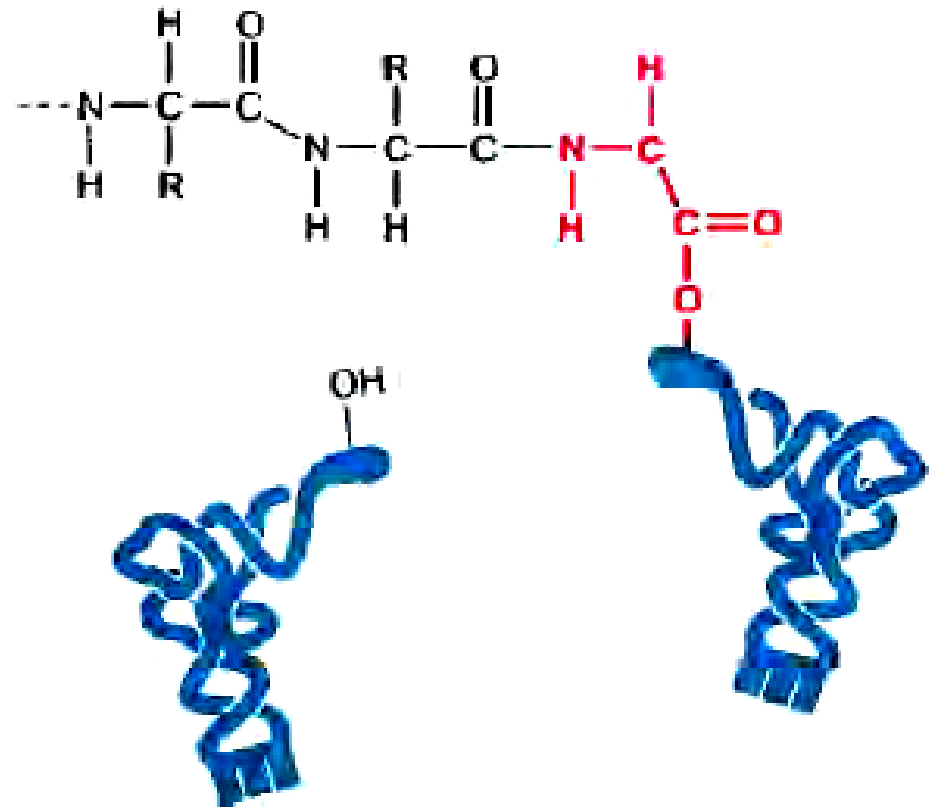
Polypeptidový řetězec se prodlužuje ve směru **od N-konce k C-konci**.

Polypeptidový řetězec



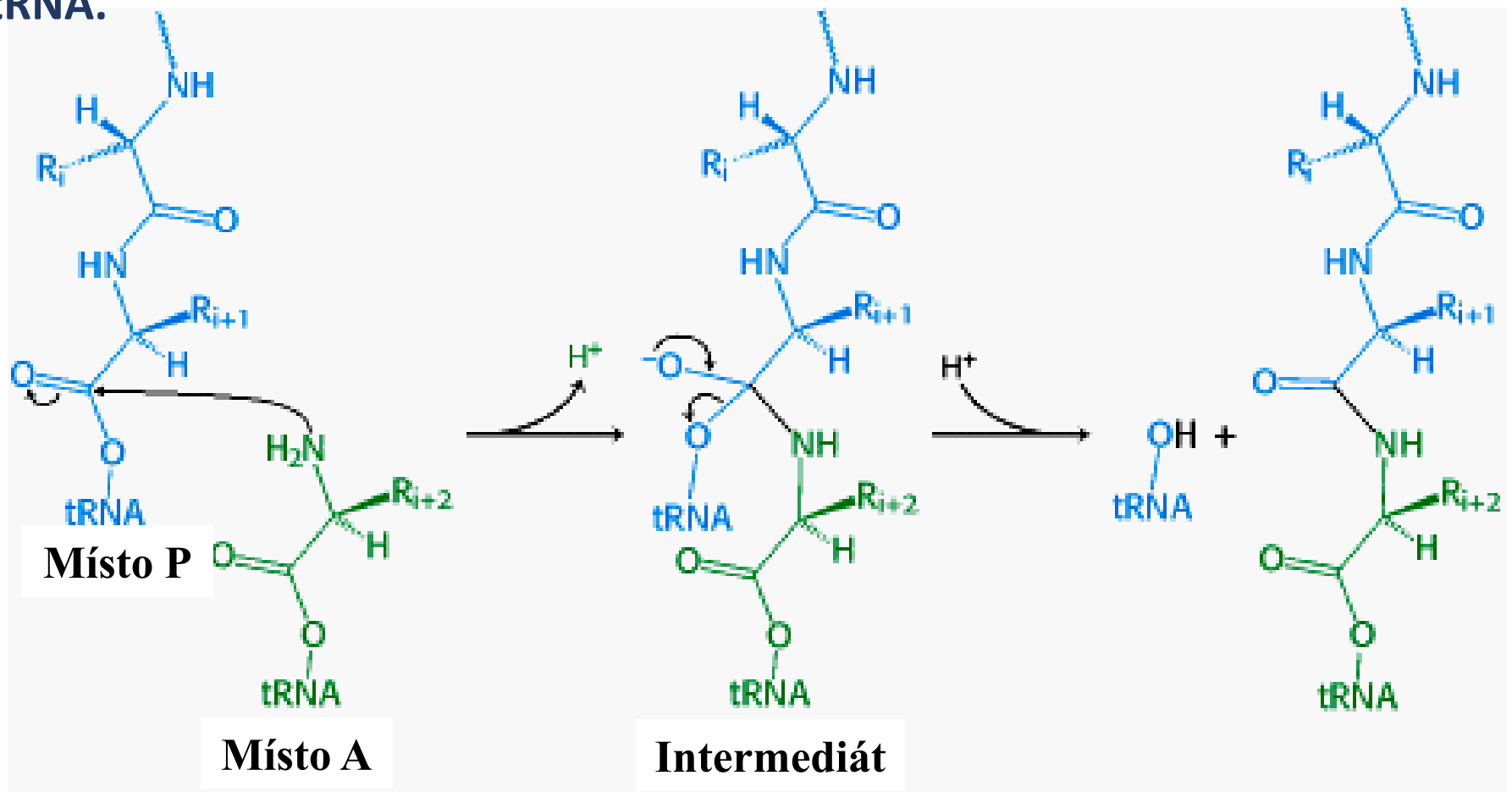
Peptidyl-tRNA

Aminoacyl-tRNA

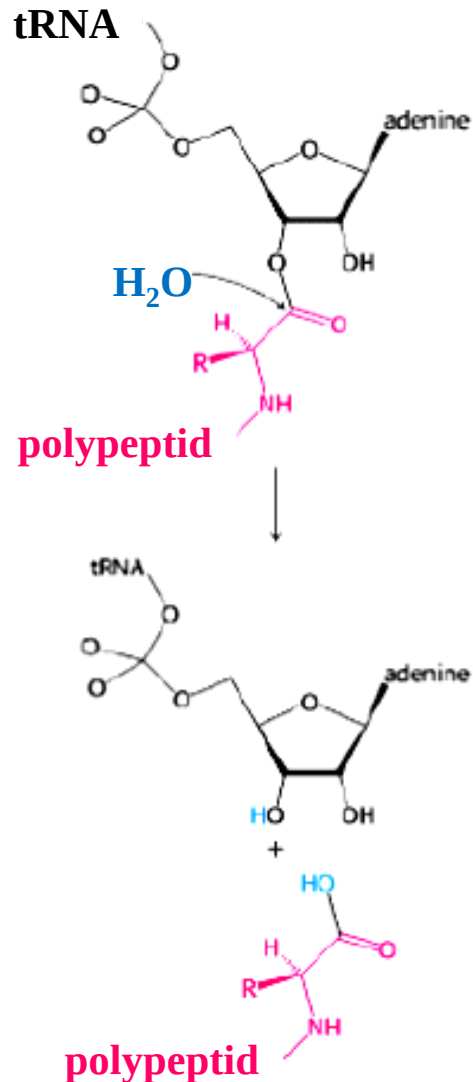


Tvorba peptidové vazby

Aminoskupina aminoacyl-tRNA působí na karbonylovou skupinu esterového spojení peptidyl-tRNA. Vytváří se **peptidová vazba** a uvolní se deacylovaná tRNA.



Terminace translace

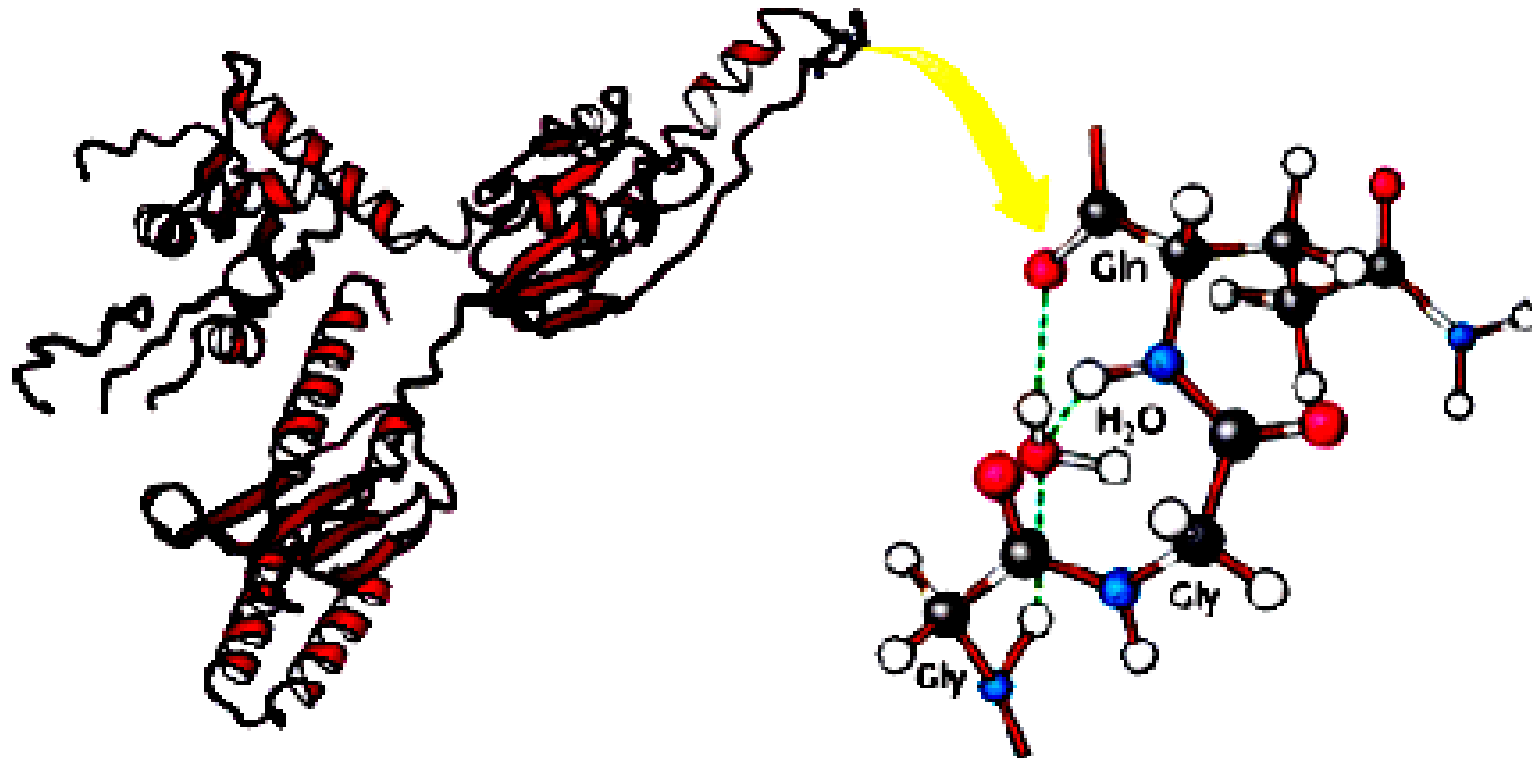


Při terminaci translace dochází k hydrolytickému štěpení esterové vazby peptidyl-tRNA

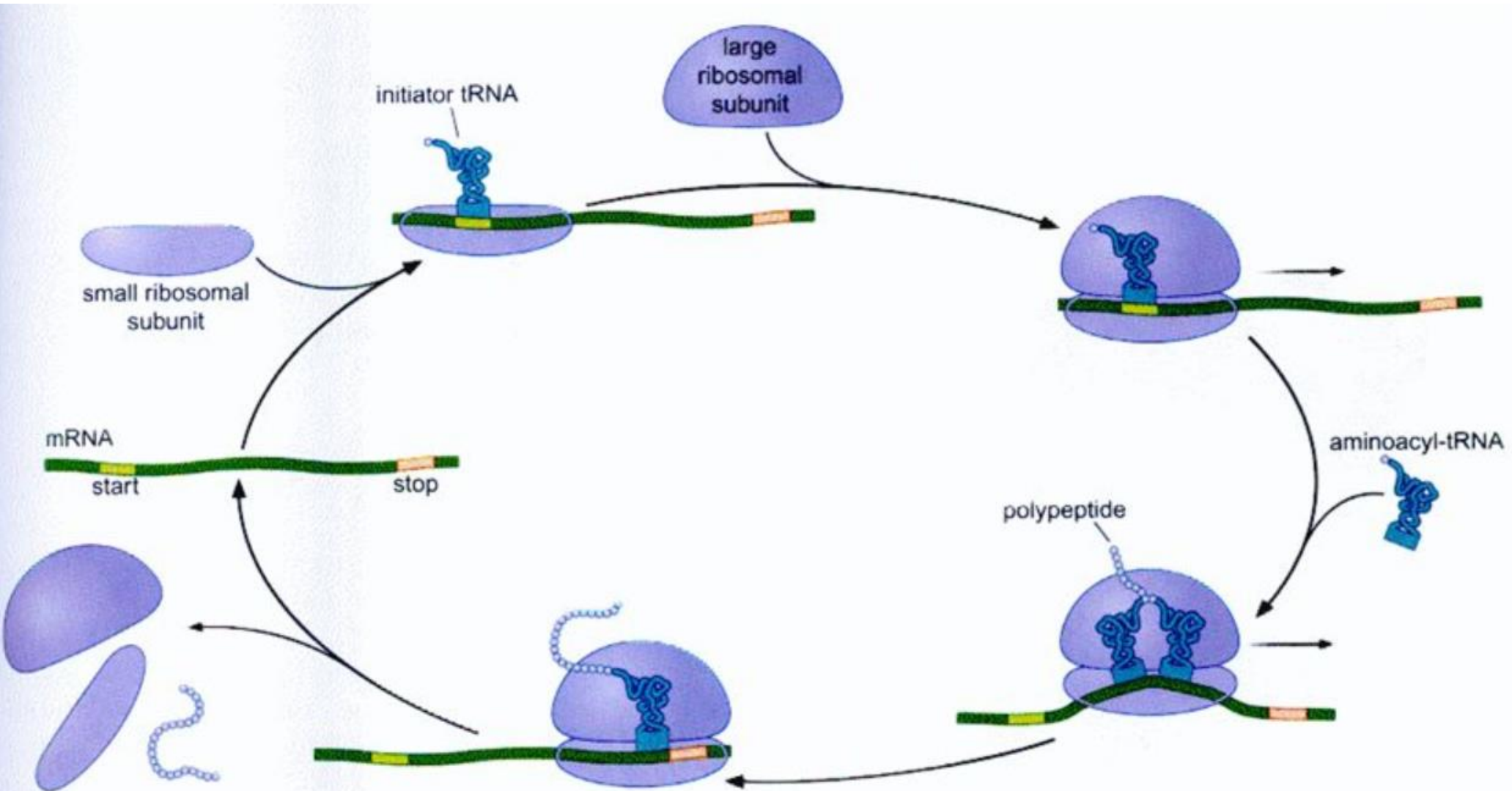
Nutná přítomnost terminačního kodonu a terminačních translačních faktorů (bakterie mají 3 terminační faktory)

Struktura terminačního faktoru translace

Trojrozměrná struktura faktoru se podobá struktuře tRNA. Aminokyselinová sekvence Gly-Gly-Gln imituje CCA konec tRNA. Faktor přináší do peptidyltransferázového centra ribosomu molekulu H_2O , která štěpí esterovou vazbu peptidyl-tRNA.

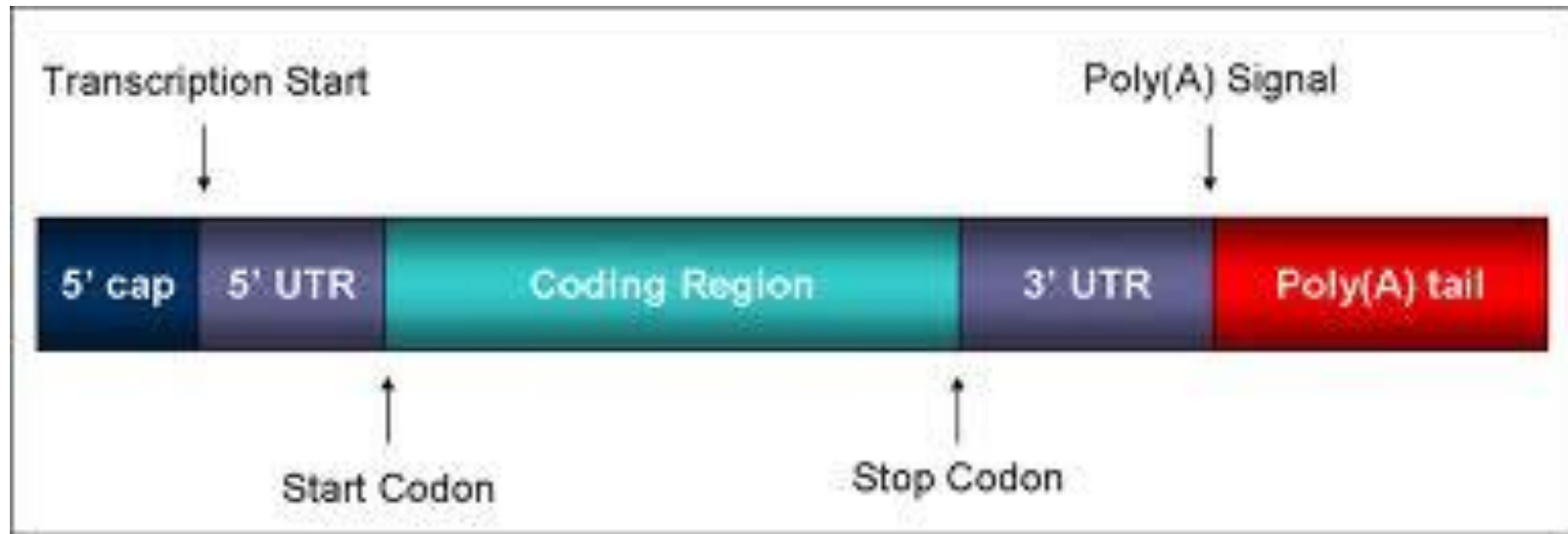


Přehled dějů v průběhu translace

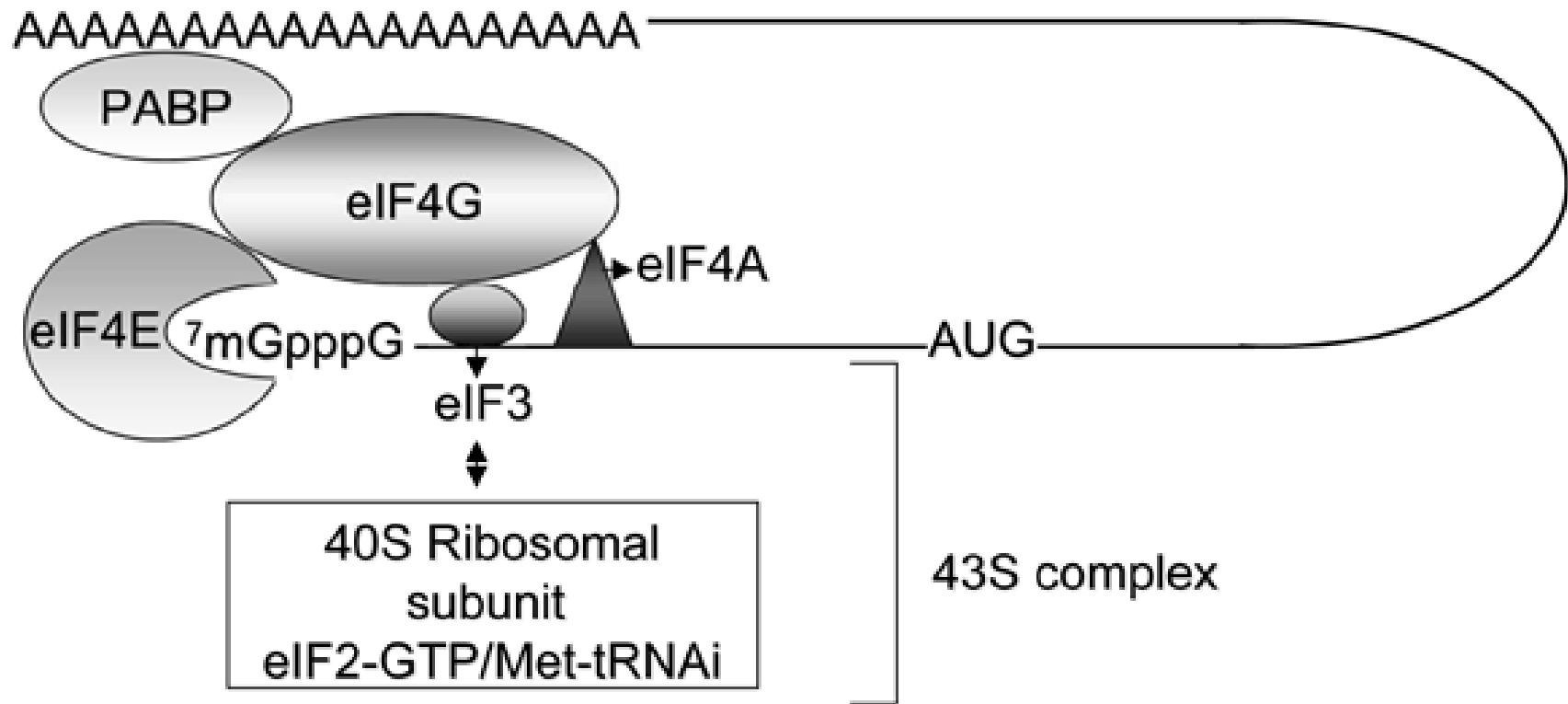


Translase u eukaryot

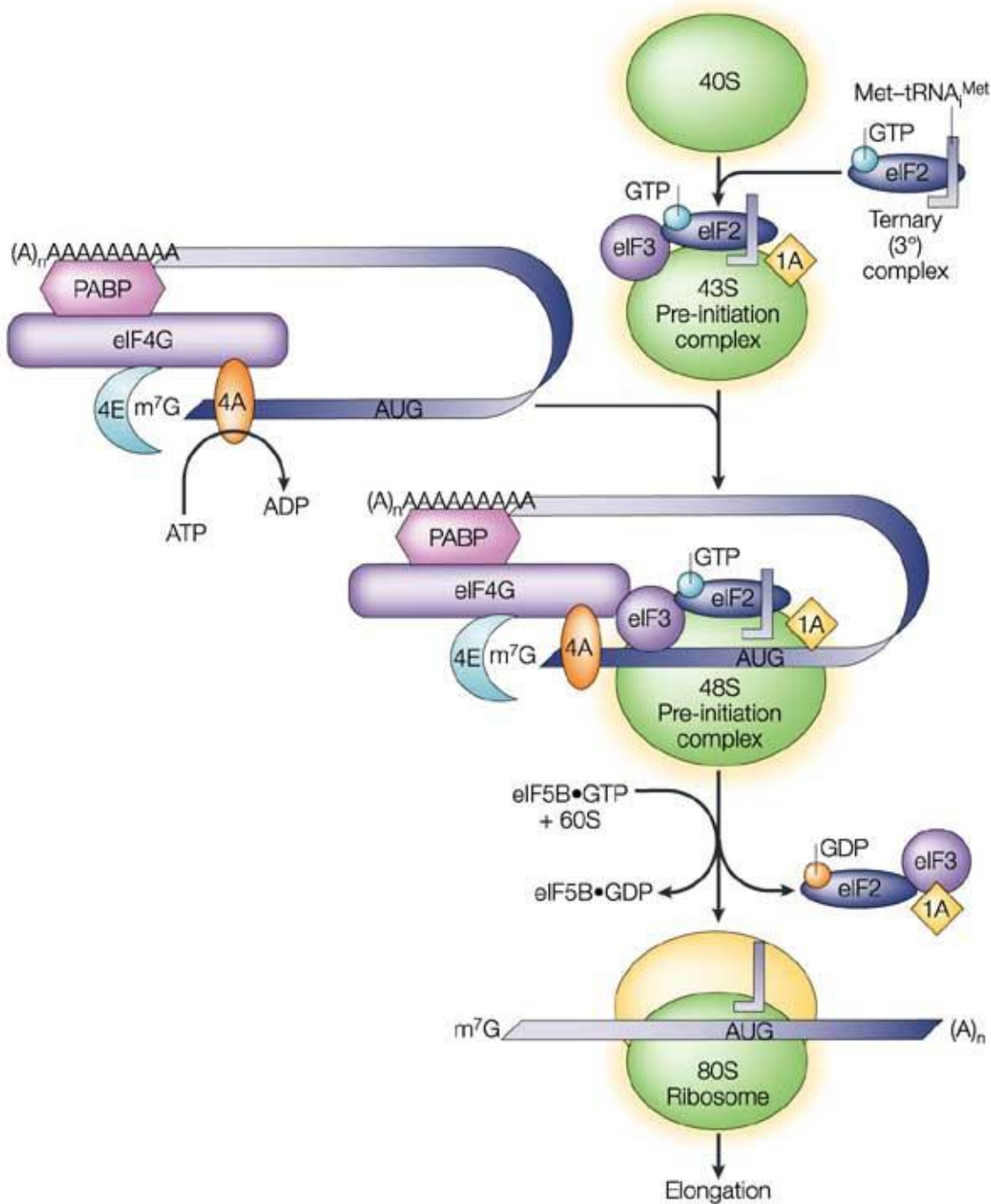
Translating mRNA in eukaryotes



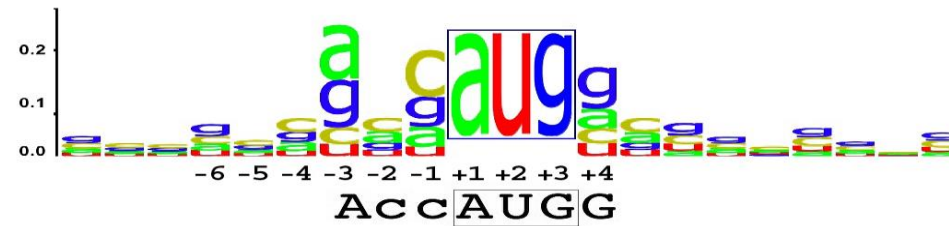
Význam polyA konce pro iniciaci translace



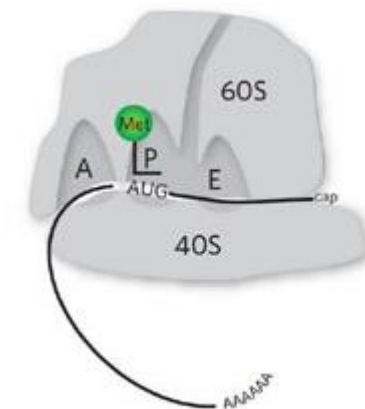
Iniciace translace u eukaryot – iniciační faktory



Kozakové sekvence



=



Translace u eukaryot

Elongace:

- EF-1 (analogický k bakteriálnímu EF-Tu) ,EF-2 (analogický k bakteriálnímu EF-G)

Terminace:

- Jeden terminační faktor RF

<http://www.youtube.com/watch?v=5bLEDd-PSTQ>

<https://www.youtube.com/watch?v=qlwrhUrvX-k>

Translace u eukaryot

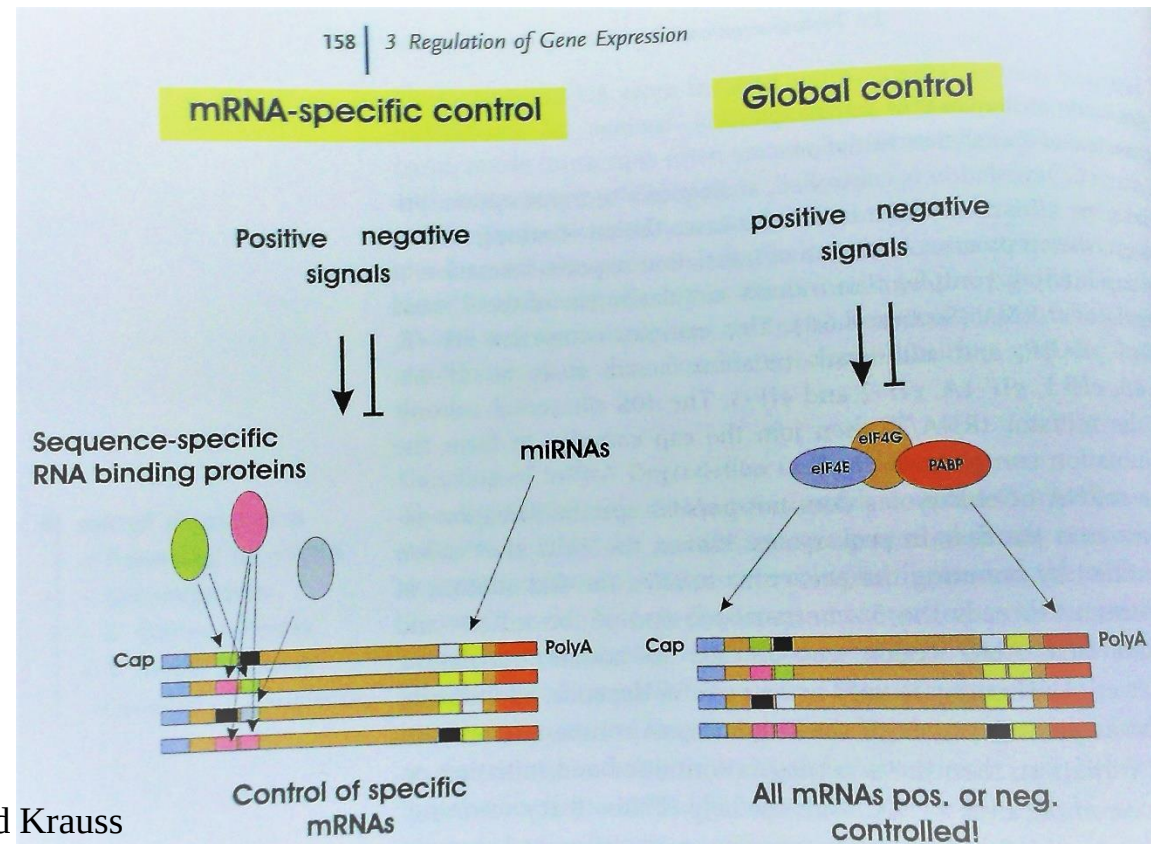
Úroveň translace závisí na:

- **Dostupnost** mRNA
 - syntéza
 - processing
 - export
- **Stabilita** mRNA
- **Regulace** na úrovni translace

Regulace translace u eukaryot

GLOBÁLNÍ

mRNA SPECIFICKÁ

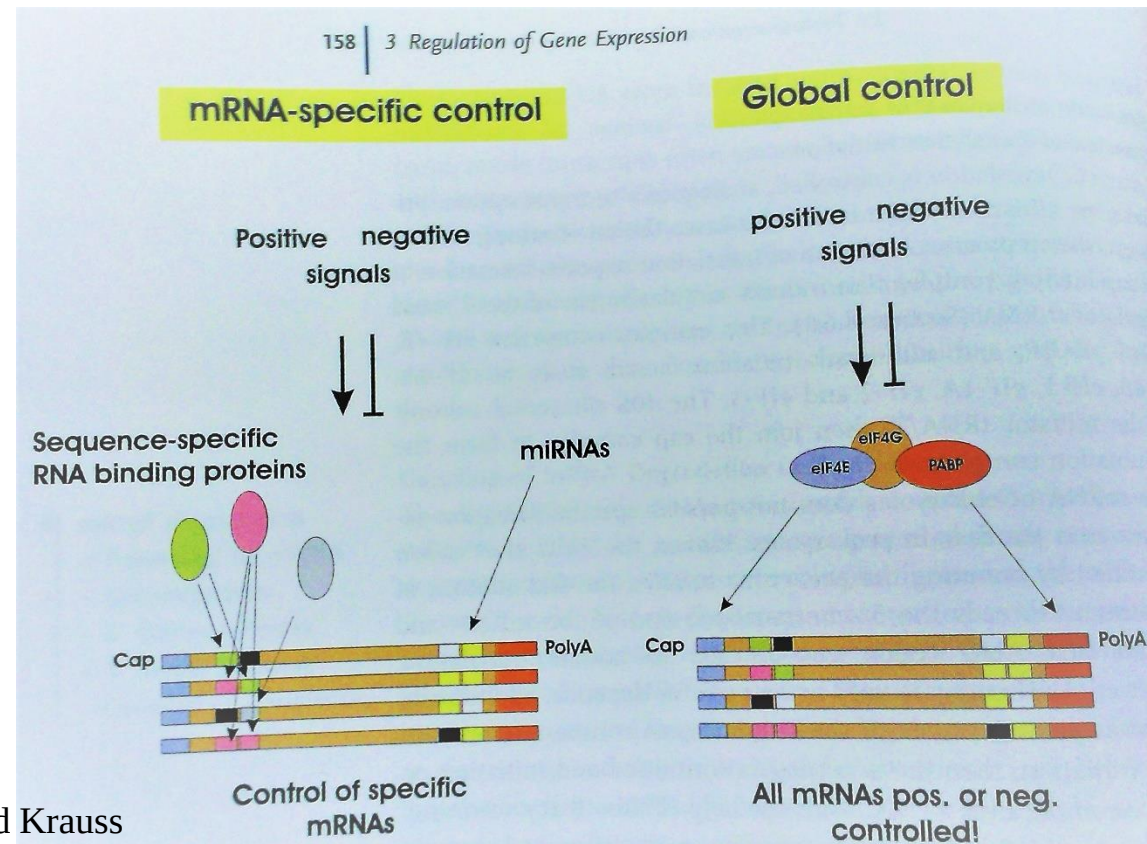


Regulace translace u eukaryot

GLOBÁLNÍ

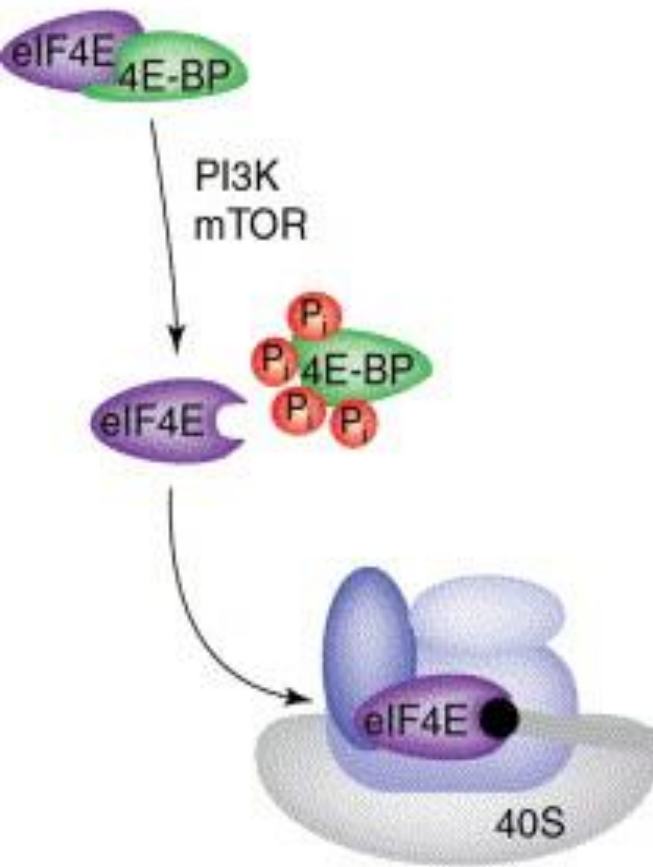
Mechanismus: fosforylace/dostupnost iniciačních faktorů
- ovlivnění translace všech mRNA

mRNA SPECIFICKÁ

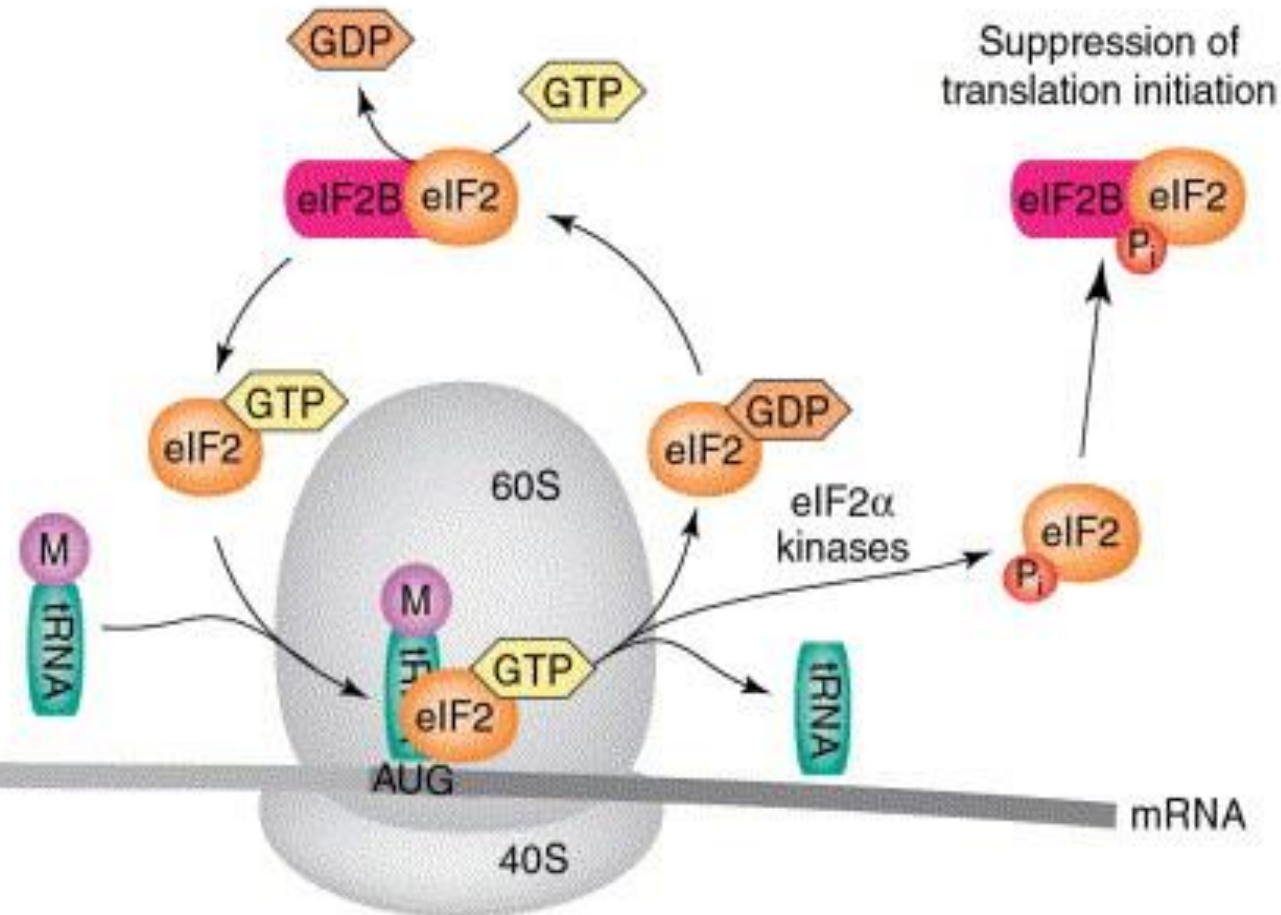


Iniciace translace u eukaryot- globální regulace

(a) Formation of the cap-binding complex



(b) Formation of the ternary translation initiation complex



Regulace translace u eukaryot

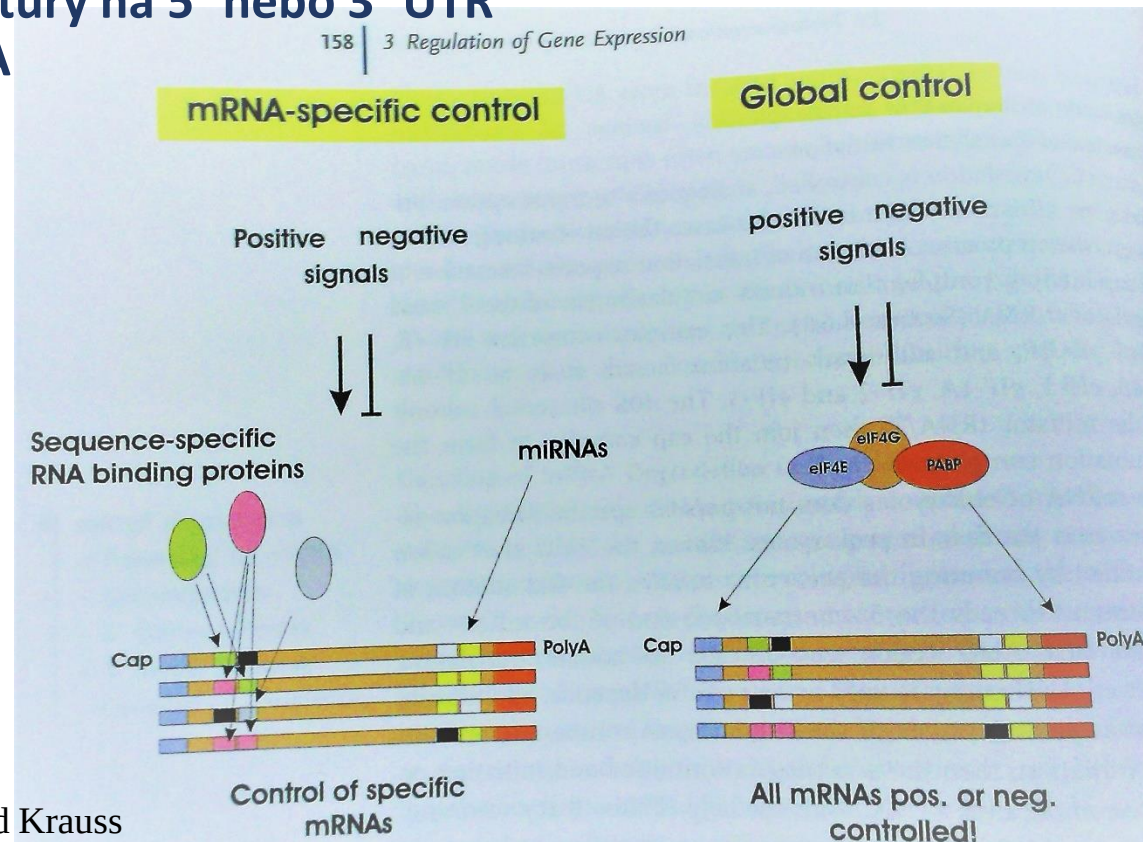
GLOBÁLNÍ

Mechanismus: fosforylace/dostupnost iniciačních faktorů
- ovlivnění translace všech mRNA

mRNA SPECIFICKÁ

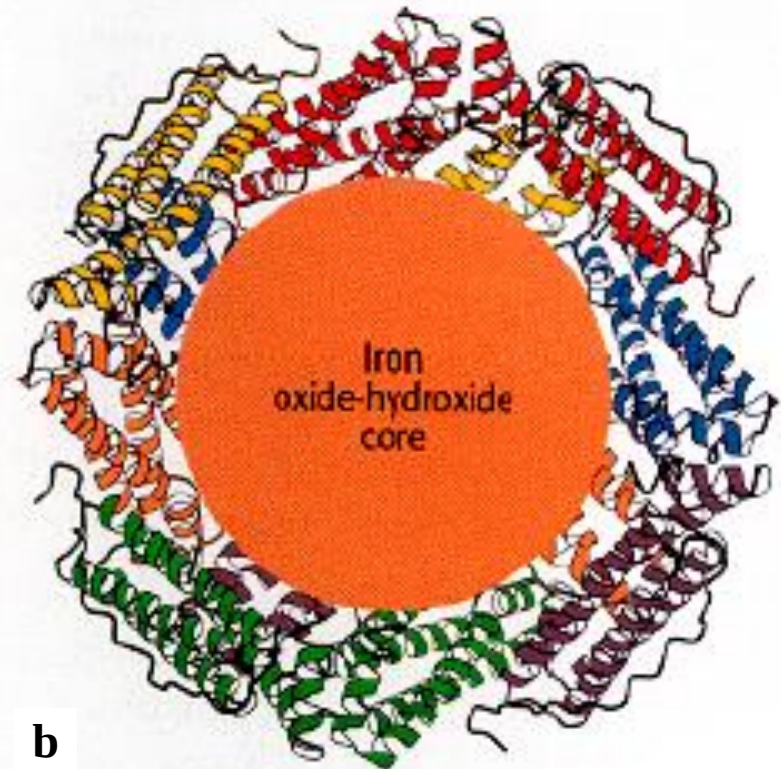
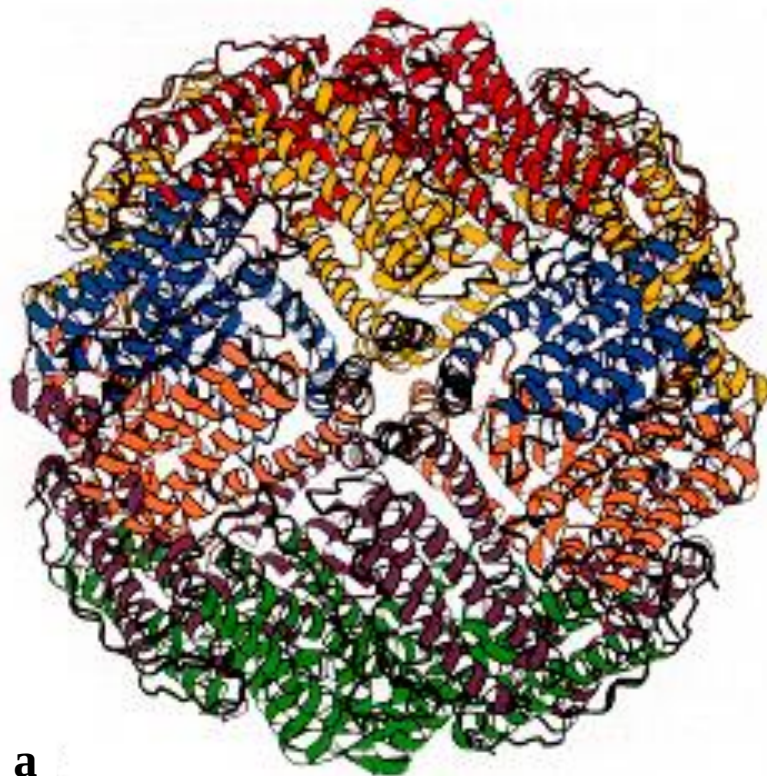
Mechanismus: specifické sekvence/struktury na 5' nebo 3' UTR

- vazba regulačních proteinů/miRNA
aktivace/represe translace



mRNA specifická regulace translace

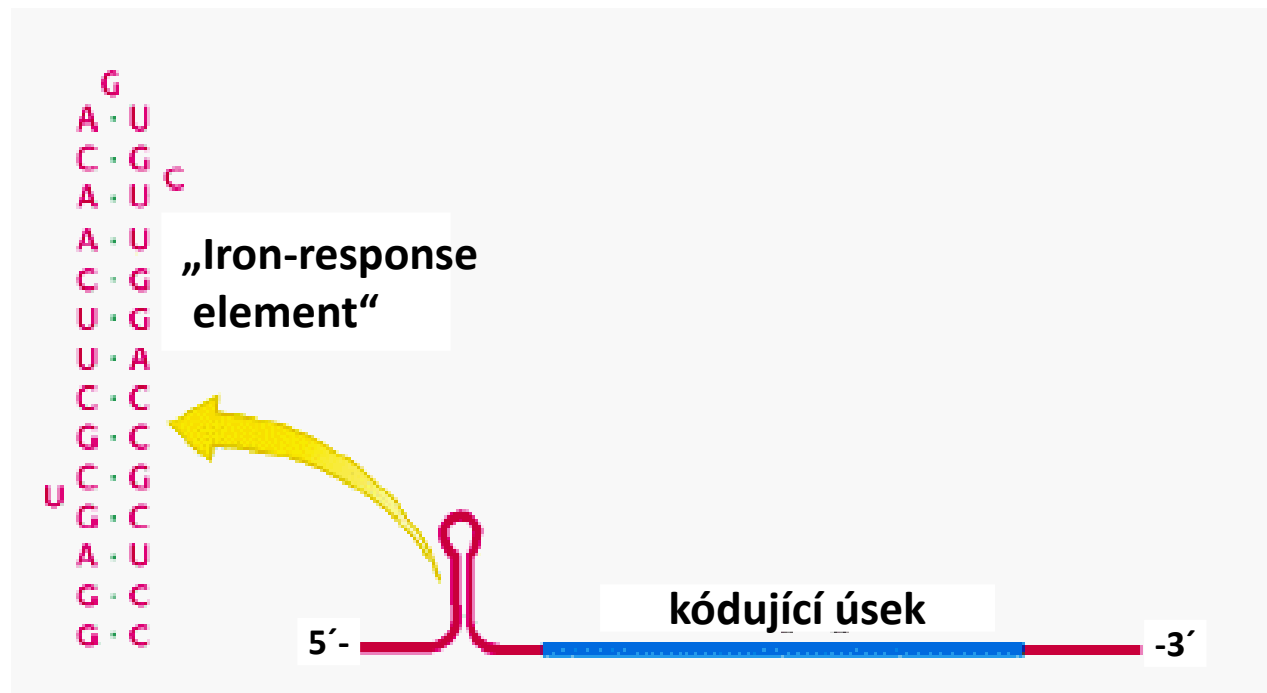
Struktura ferritinu



- (a) 24 polypeptidových řetězců tvoří sférickou slupku proteinu.
- (b) Jádro proteinu znázorněné na příčném řezu obsahuje Fe^{3+} ionty.

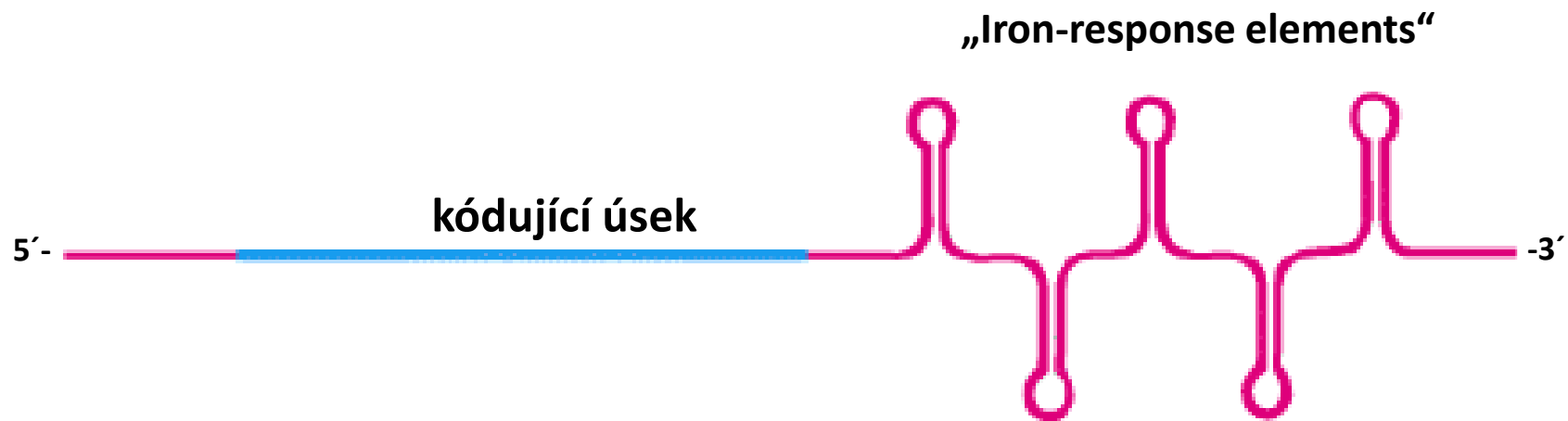
IREs – Iron Responsive Elements

Ferritinová mRNA obsahuje na 5' netranslatovaném konci "iron response element" (IRE). Tato sekvence váže specifický protein, který blokuje translaci této mRNA při nízké koncentraci Fe^{3+} .

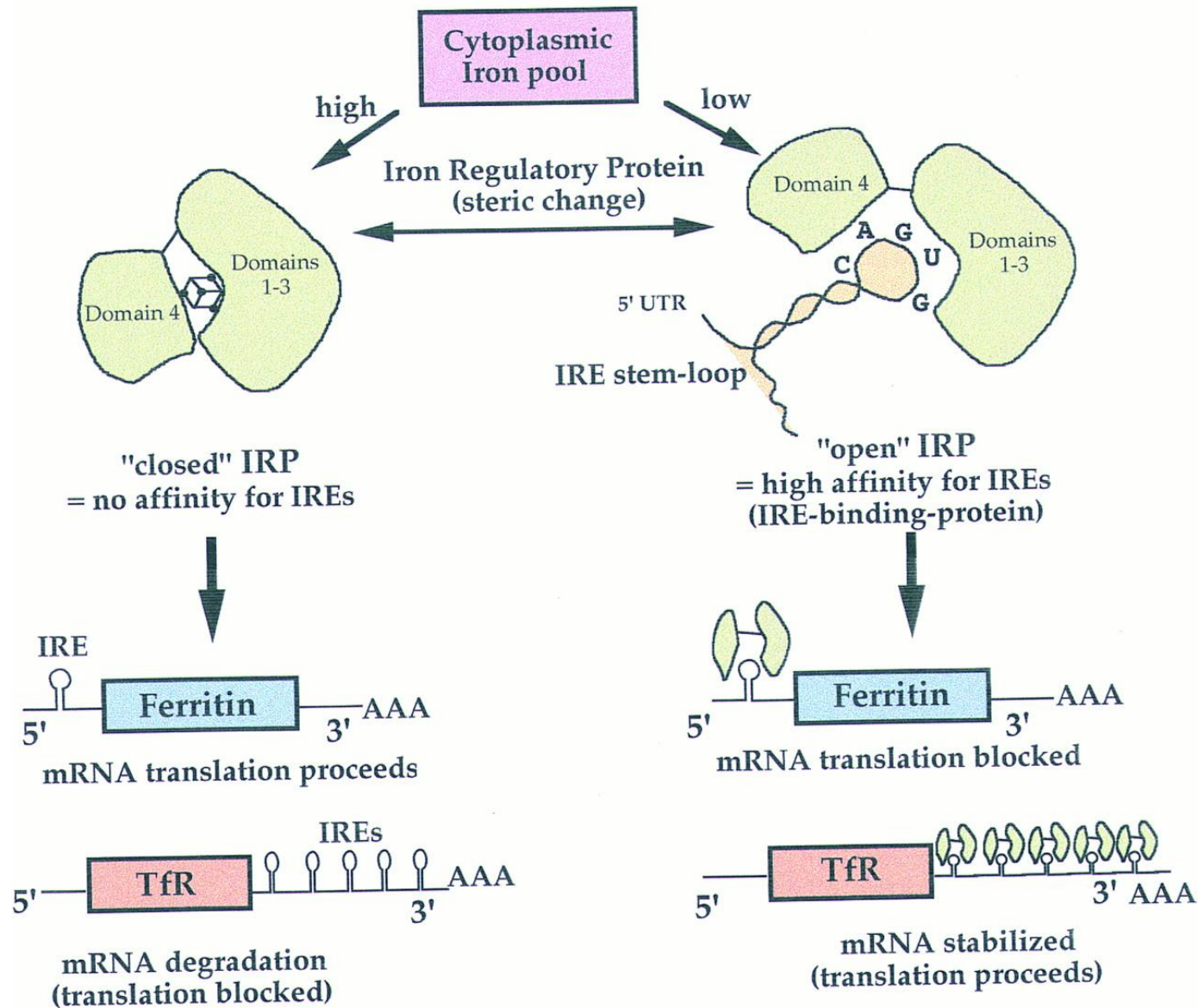


mRNA pro transferrinový receptor

Tato mRNA nese několik IRE na netranslatovaném 3' konci molekuly. Připojení vazebného proteinu (IRE-binding protein) neovlivňuje translaci, ale stabilizuje mRNA.

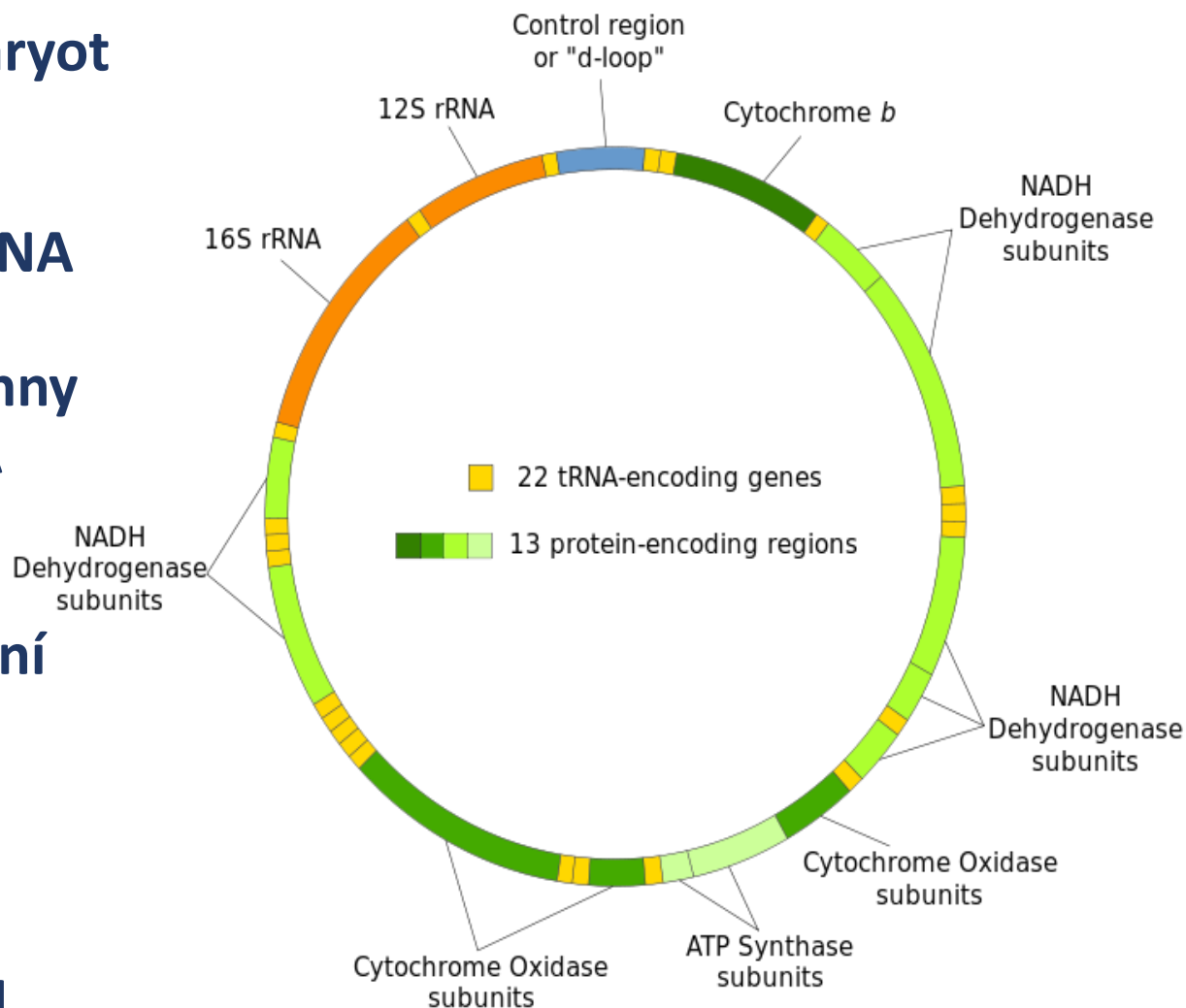


Specifická regulace translace – IRE elementy



Translace v mitochondriích eukaryot

- Podobná translaci prokaryot
- Translace jen mRNA vzniklých přepisem mtDNA
- Mitochondrie mají všechny molekulární druhy tRNA nezbytné k translaci
- Translace není autonomní
- 22 molekulárních druhů tRNA
- Smysl některých kodonů jiný než v kódu standardním



Translace u prokaryot a eukaryot - srovnání

Prokaryota	Eukaryota
Translace není oddělena od transkripce	Probíhá v cytoplazmě a mitochondiích (+ chloroplasty)
Ribozomy 70S	Ribozomy 80S
Překládá se mRNA	Překládá se mRNA odvozená z pre-mRNA (postranskripční úpravy)
Vazba 16S-rRNA ribozomu na Shineovu-Dalgarnovu sekvenci (AGGA) na 5' mRNA	Vazba ribozomu na m ⁷ G čepičku mRNA prostřednictvím CBP proteinů (IF4F)
Méně iniciačních faktorů potřebných k zahájení translace	Více iniciačních faktorů potřebných k zahájení translace
1. AMK je fMet	1. AMK je Met
...	...

Antibiotika inhibující proteosyntézu

Antibiotikum

Působení

Streptomycin

Blokuje vazbu fMet-tRNA_f na ribozom a inhibuje iniciaci translace, nesprávné čtení kodónu (prokaryota).

Tetracyklin

Váže se na 30S podjednotku a inhibuje vazbu aminoacyl-tRNAs (prokaryota).

Chloramfenikol

Inhibuje aktivitu peptidyltransferázy na 50S ribosomální podjednotce (prokaryota).

Cykloheximid

Inhibuje aktivitu peptidyltransferázy na 60S ribosomální podjednotce (eukaryota).

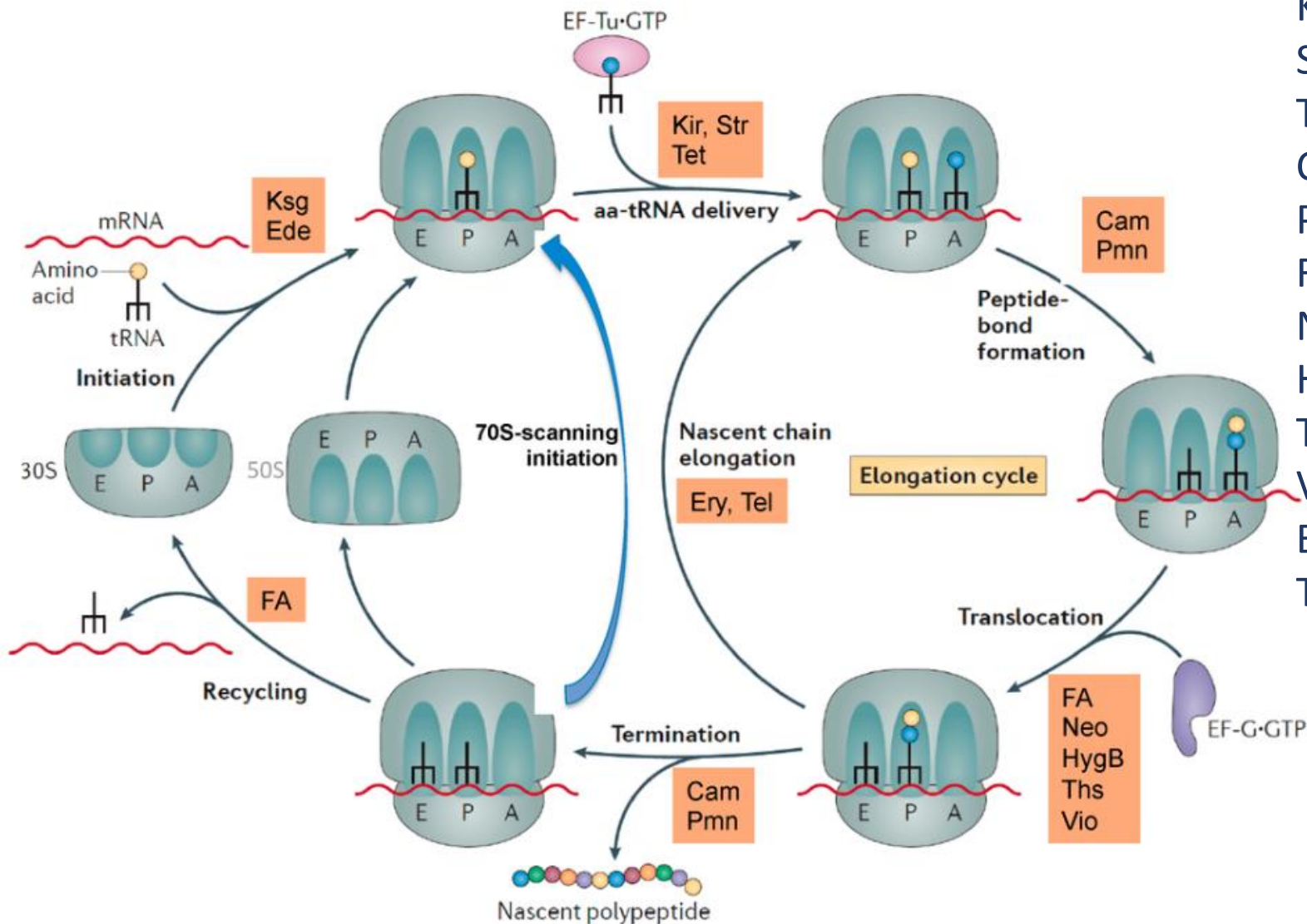
Erythromycin

Váže se na 50S podjednotku a inhibuje translokaci (prokaryota).

Puromycin

Způsobuje předčasnou terminaci translace; působí jako analog aminoacyl-tRNA (prokaryota a eukaryota).

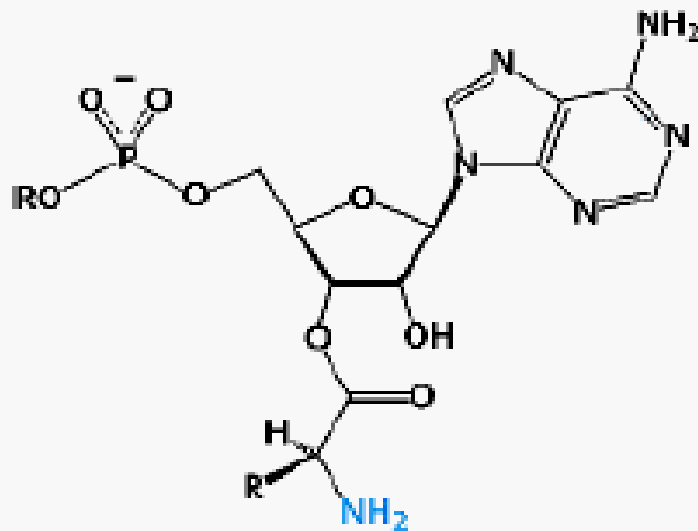
Antibiotika inhibující proteosyntézu



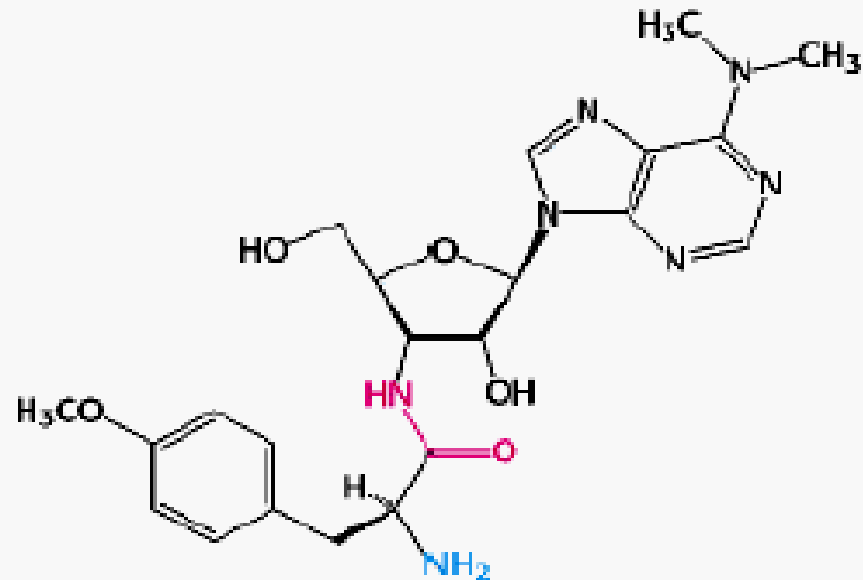
Kir, kirromycin
 Str, streptomycin
 Tet, tetracycline
 Cam, chloramphenicol
 Pmn, puromycin
 FA, fusidic acid
 Neo, neomycin
 HygB, hygromycin B
 Ths, thiostrepton
 Vio, viomycin
 Ery, erythromycin
 Tel, telithromycin

Účinek antibiotika puromycinu

Puromycin je analog terminální aminoacyl-adenosinové skupiny aminoacyl-tRNA. Váže se do vazebného místa A ribosomu a jeho aminoskupina reaguje s karbonylovou skupinou peptidyl-tRNA. Vzniká peptidyl-puromycin, který se uvolňuje z ribosomu

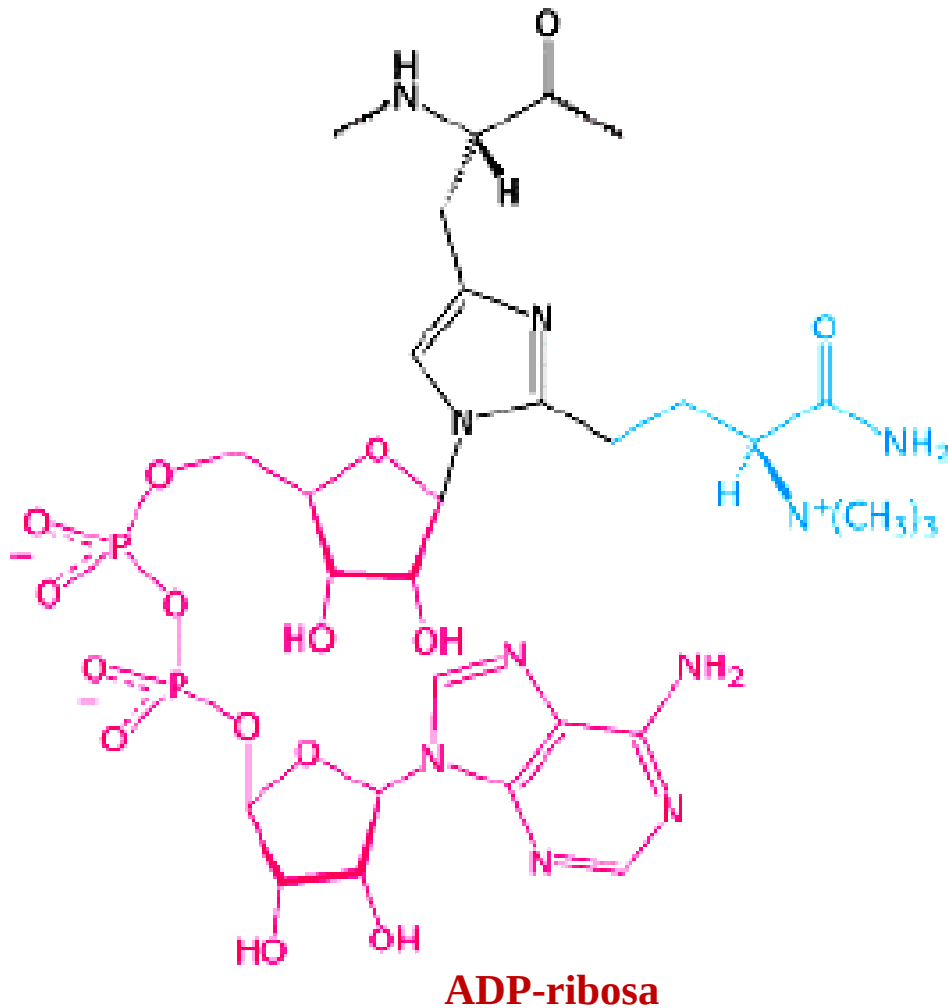


Aminoacyl-tRNA



Puromycin

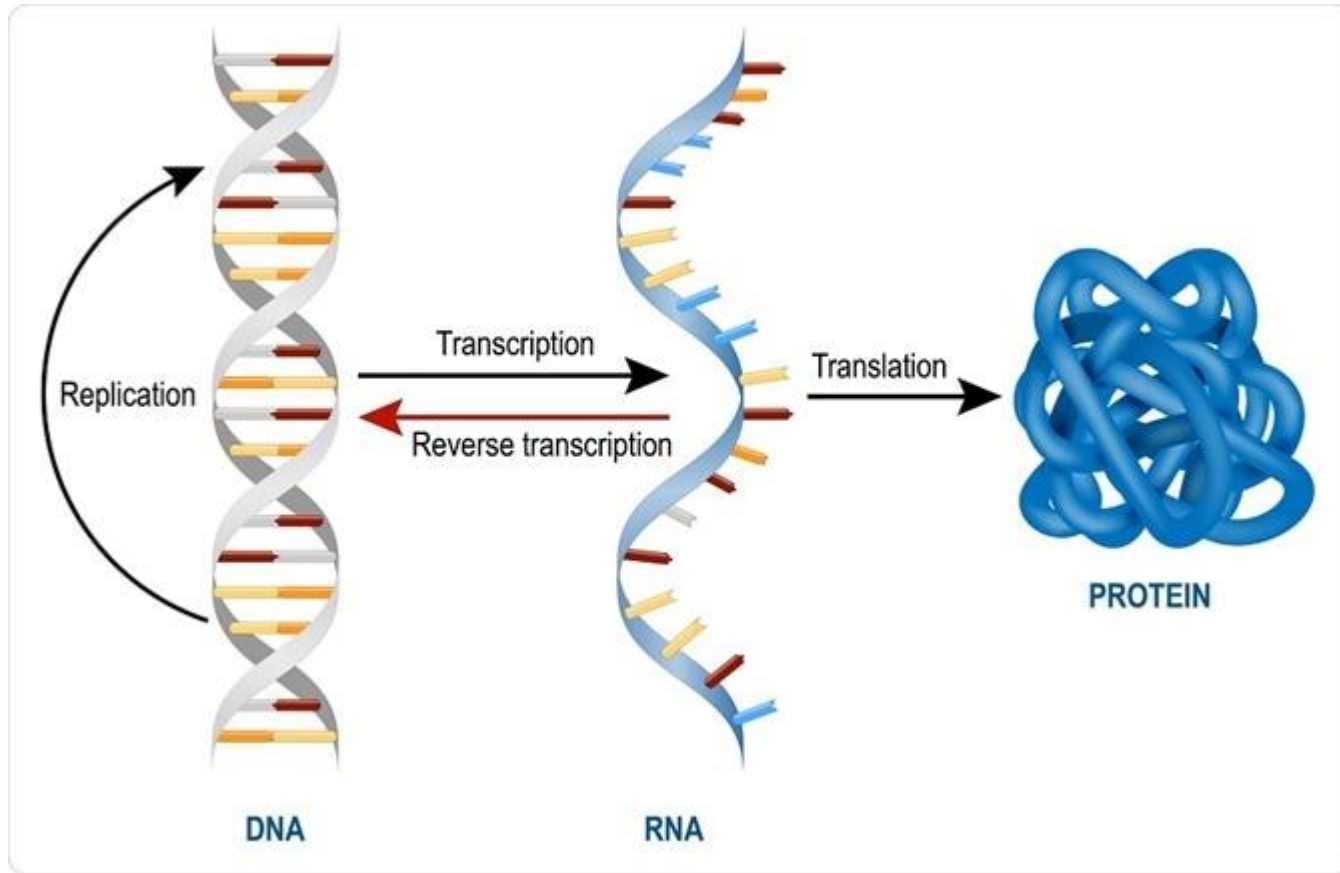
Difterický toxin blokuje translaci



Difterický toxin blokuje proteosyntézu eukaryot katalýzou přenosu **ADP-ribosové jednotky** z NAD^+ na diftamid, modifikovaný aminokyselinový zbytek elongačního faktoru 2.

Diftamid vzniká postranslačně modifikací histidinu

Závěr



Příště: logistika proteinů v buňce