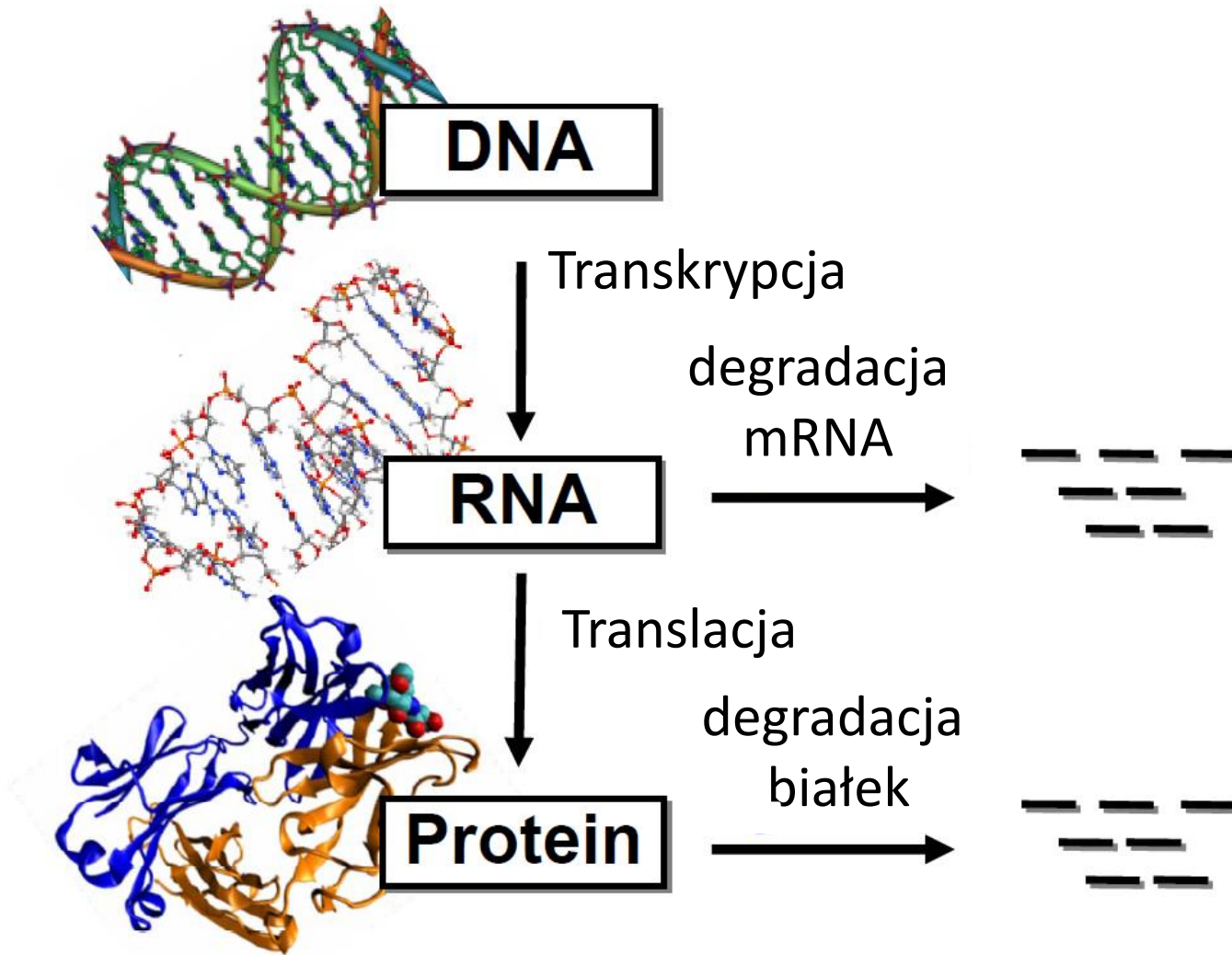


Translacja białek

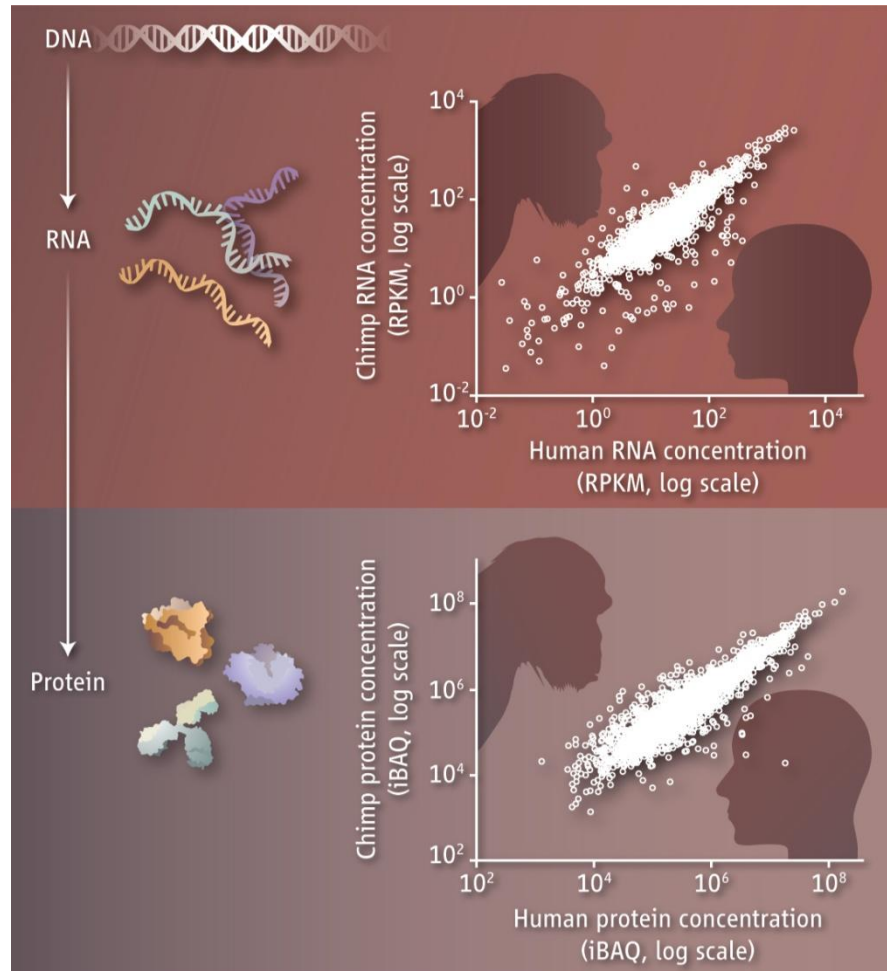
Marta Koblowska

Zakład Biologii Molekularnej Roślin, UW

REGULACJA TRANSLACJI



Protein versus mRNA expression. Absolute concentrations of mRNA are more divergent between chimpanzee and human than absolute protein concentrations, suggesting tighter evolutionary constraints on protein abundances.



C Vogel Science 2013;342:1052-1053

Poziom ekspresji około 27% białek koreluje z poziomem ich mRNA

Regulacja poziomu ekspresji białek

Translacja

Proces bardzo uporządkowany
Pochłaniający dużo energii
Regulowany na wielu poziomach

Etapy regulacji procesu translacji

Wykorzystanie kodonów

Inicjacja translacji

Składanie rybosomu

Elongacja translacji

Terminacja translacji

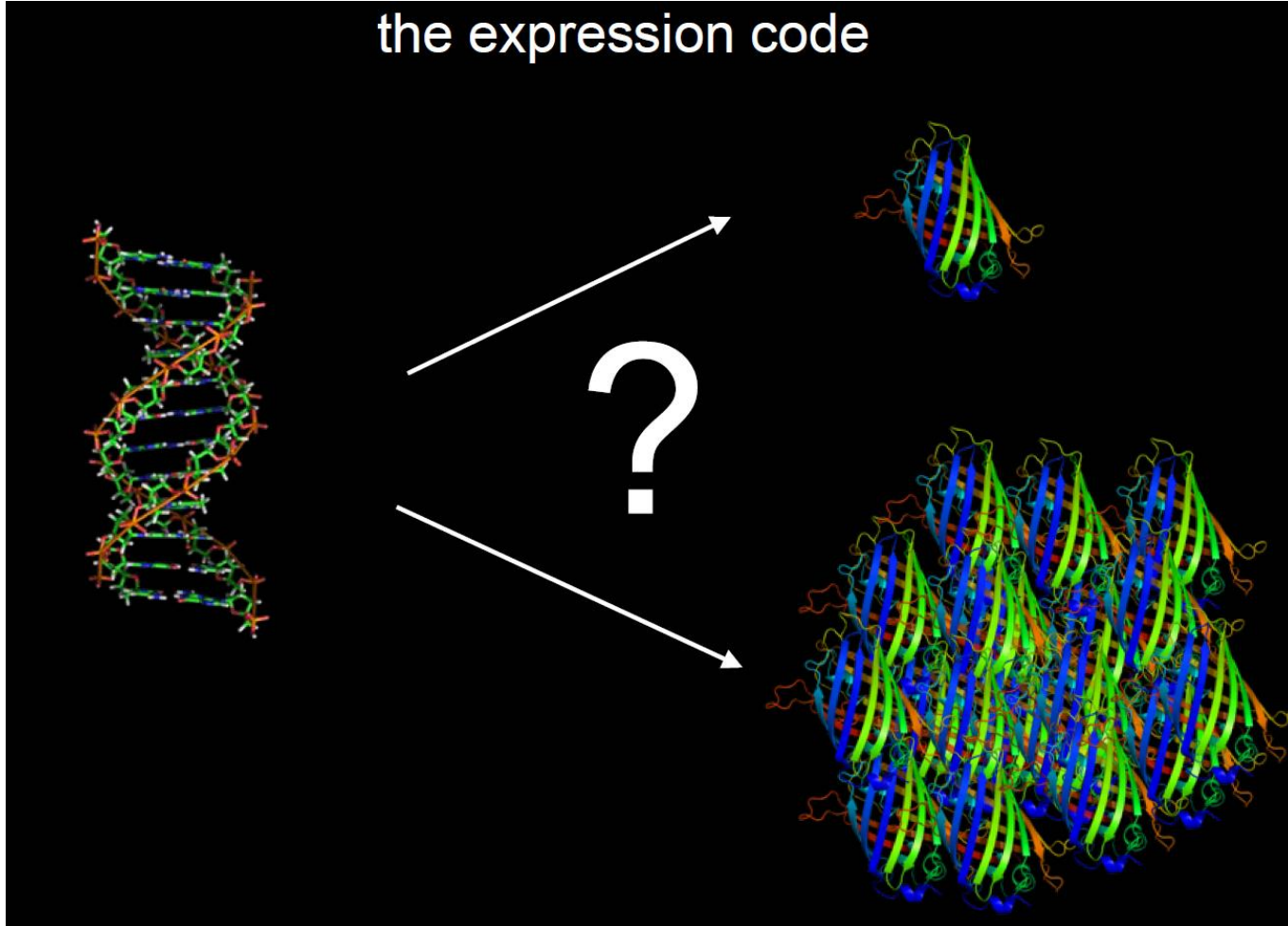
U Eukariontów długi czas półtrwania mRNA

Długość mRNA

Fosforylacja białek prowadzących proces translacji

Wykorzystanie kodonów

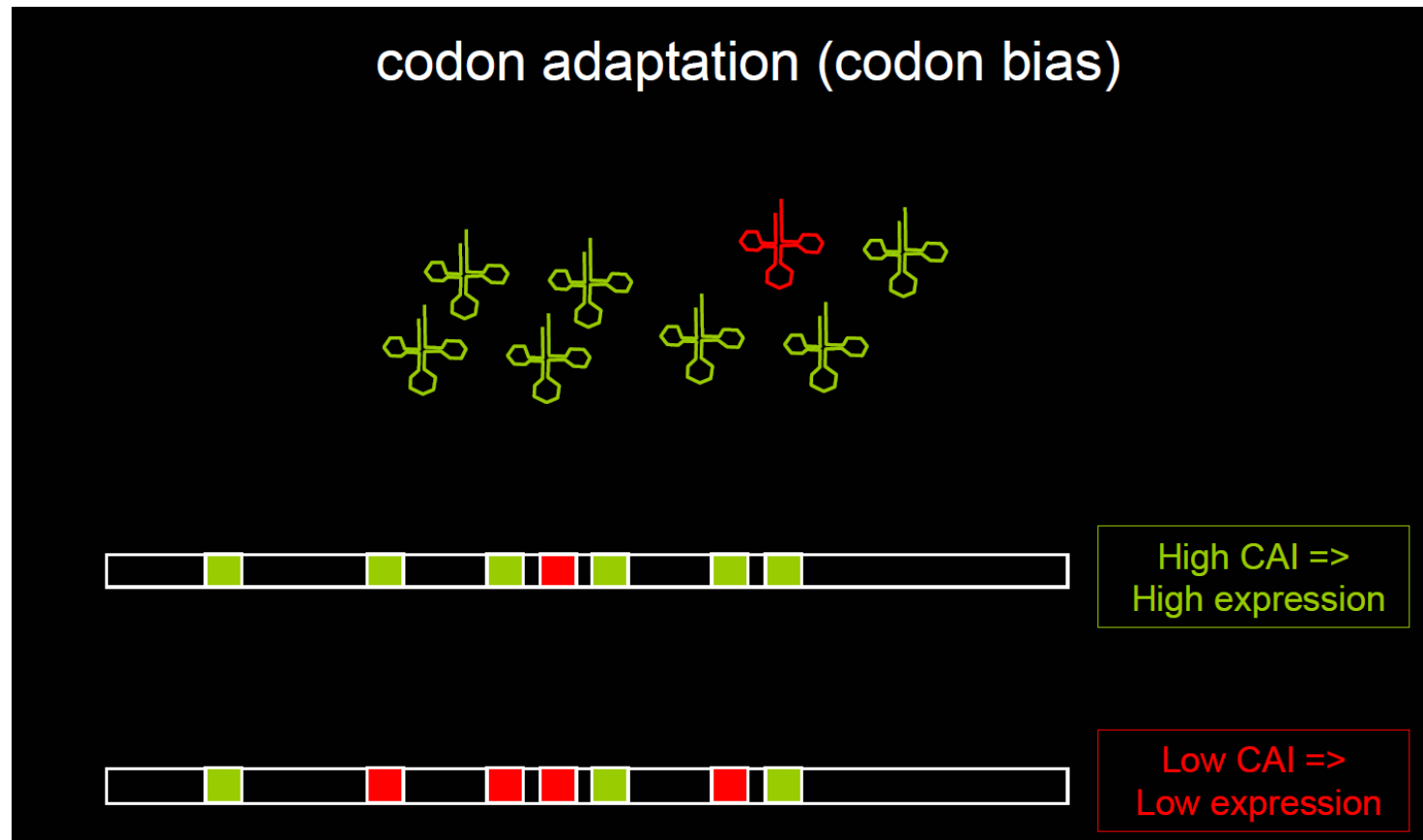
the expression code



Joshua Plotkin, Ph.D.
University of Pennsylvania
Philadelphia, PA

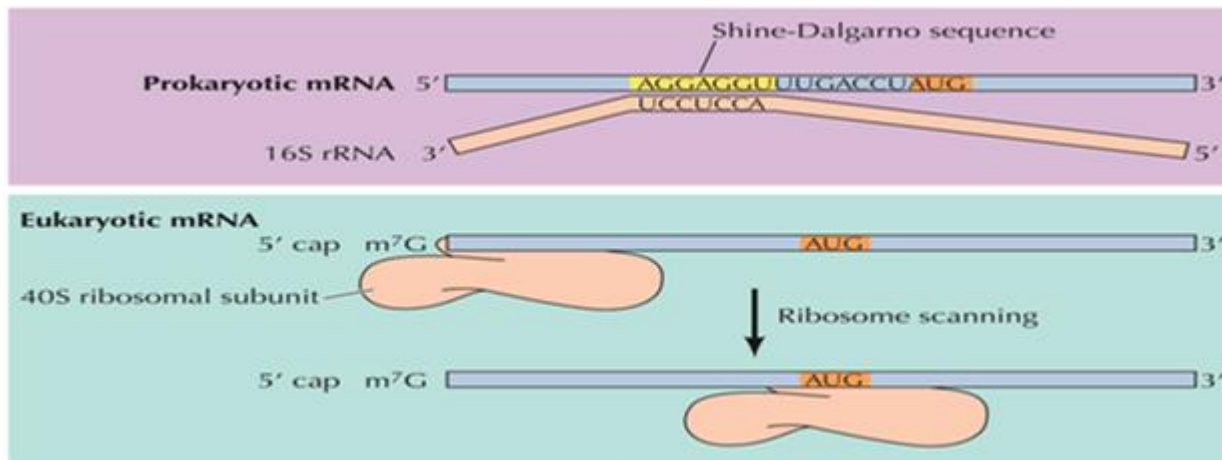
Cechy sekwencji, które wpływają na poziom ekspresji białka

Wykorzystanie kodonów

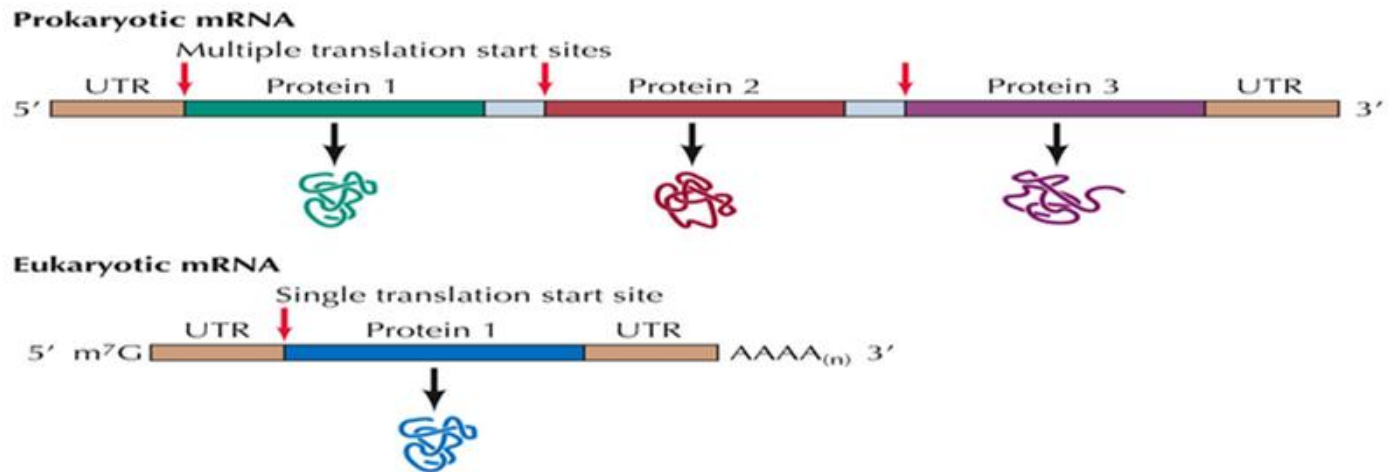


Inicjacja translacji

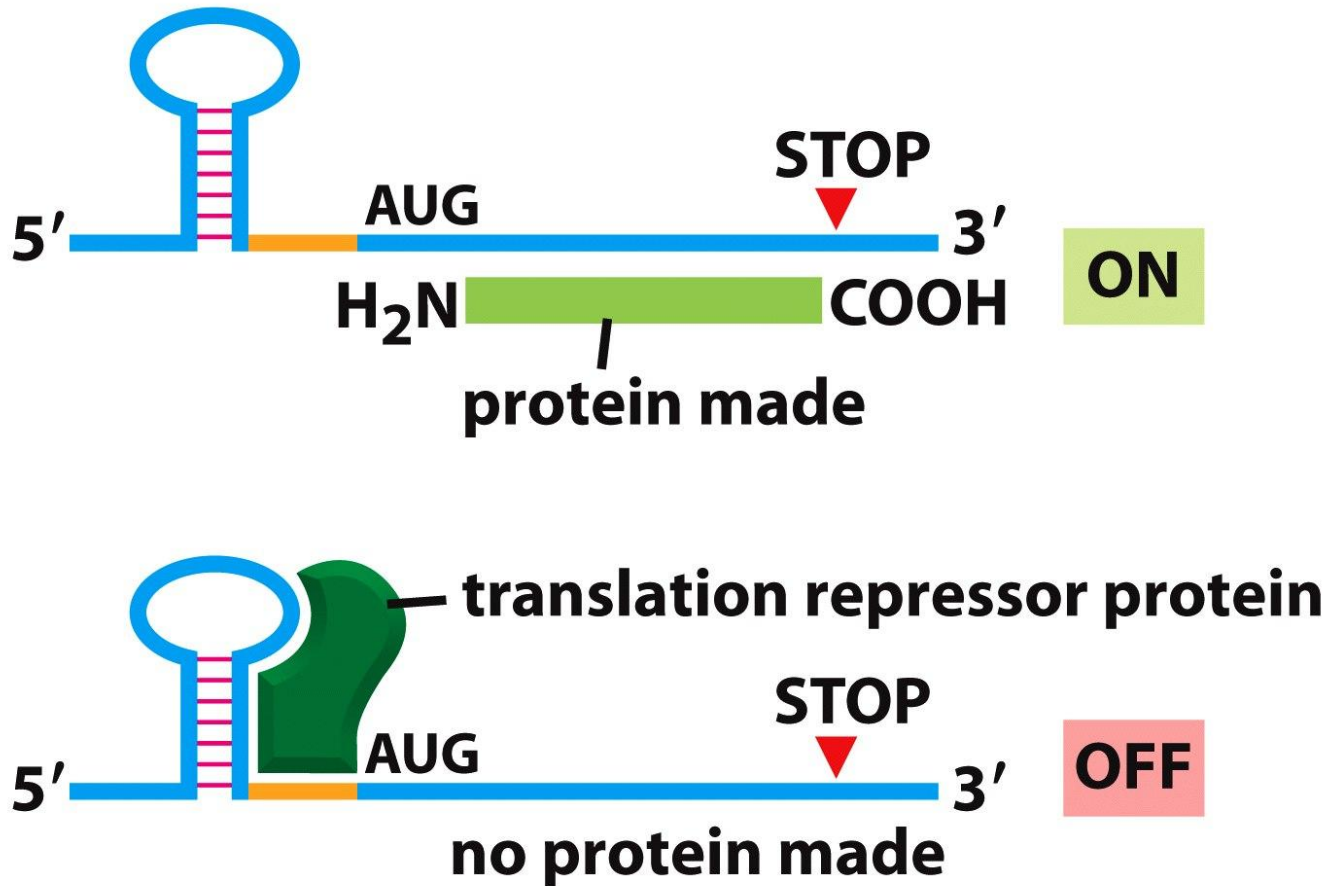
1. Inicjatorowy tRNA – aminokwasem rozpoczynającym syntezę białka jest metionina, u prokaryotów to N-formylmetionina. Inicjatorowy aminoacylo-tRNA nazywa się Met-tRNA_i;
3. Inicjacja - Zawsze AUG (metionina) u eukariontów, u prokaryotów zazwyczaj AUG (83%), rzadziej GUG (walina, 14%), bardzo rzadko UUG (leucyna, 3%)
Brak sekwencji Shine-Dalgarno (bogatej w puryny) na 5' końcu mRNA



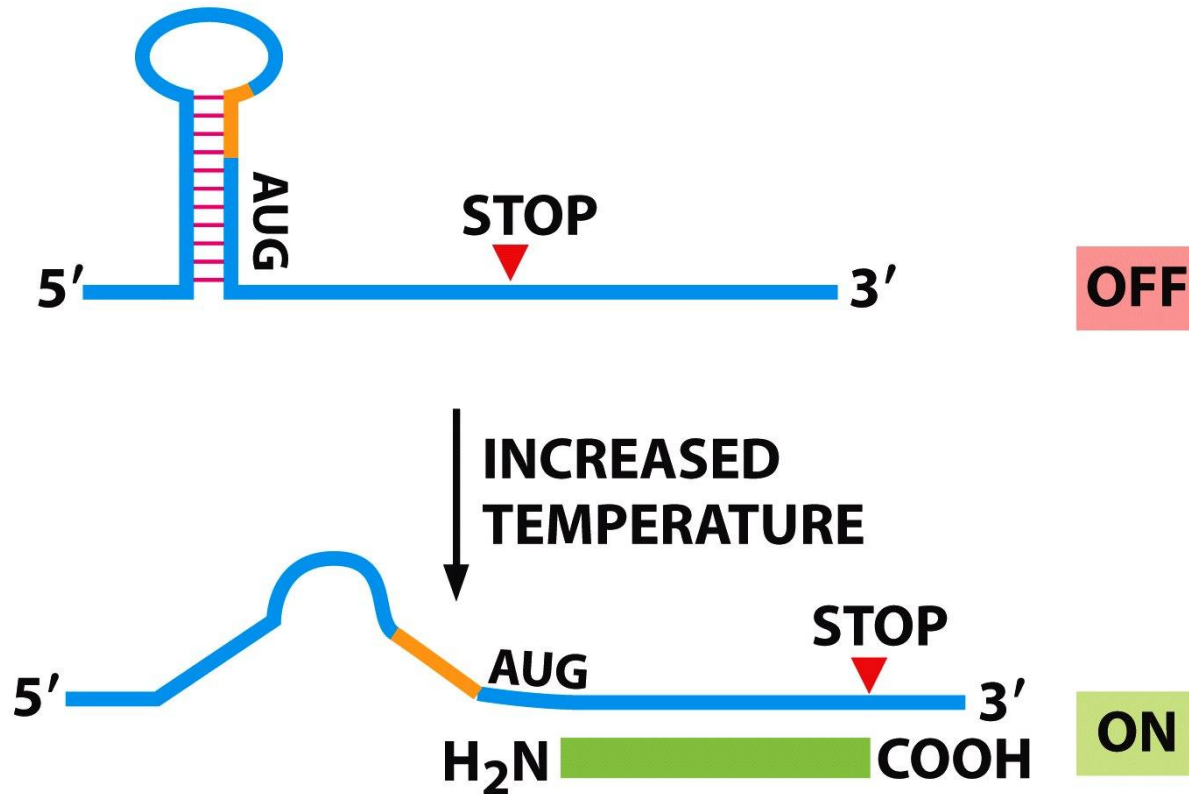
Eukariotyczny mRNA posiada jedno miejsce inicjacji syntezy białka
Prokariotyczny mRNA często zawiera wiele sekwencji Shine-Dalgarno



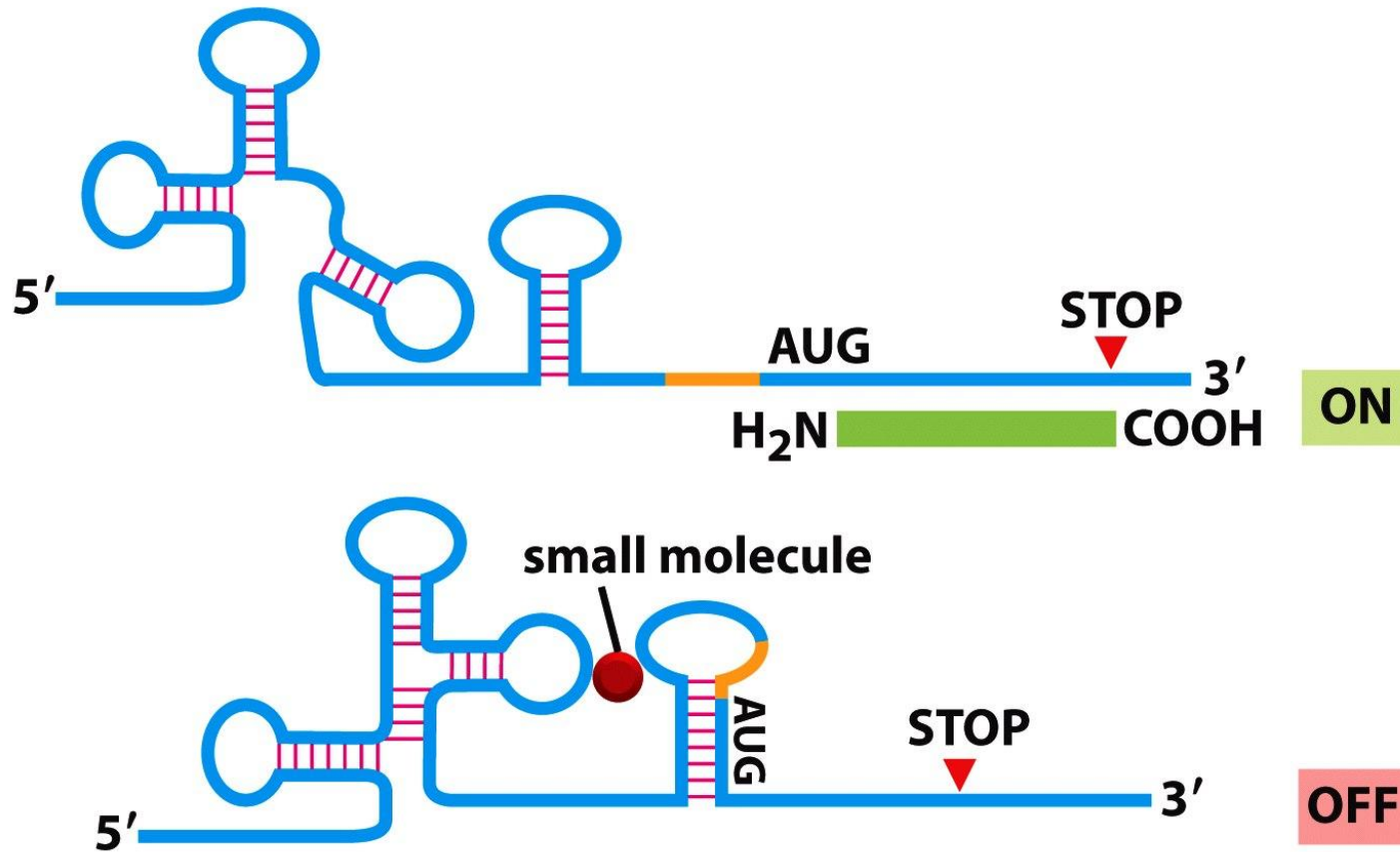
Mechanizmy kontroli procesu translacji u bakterii



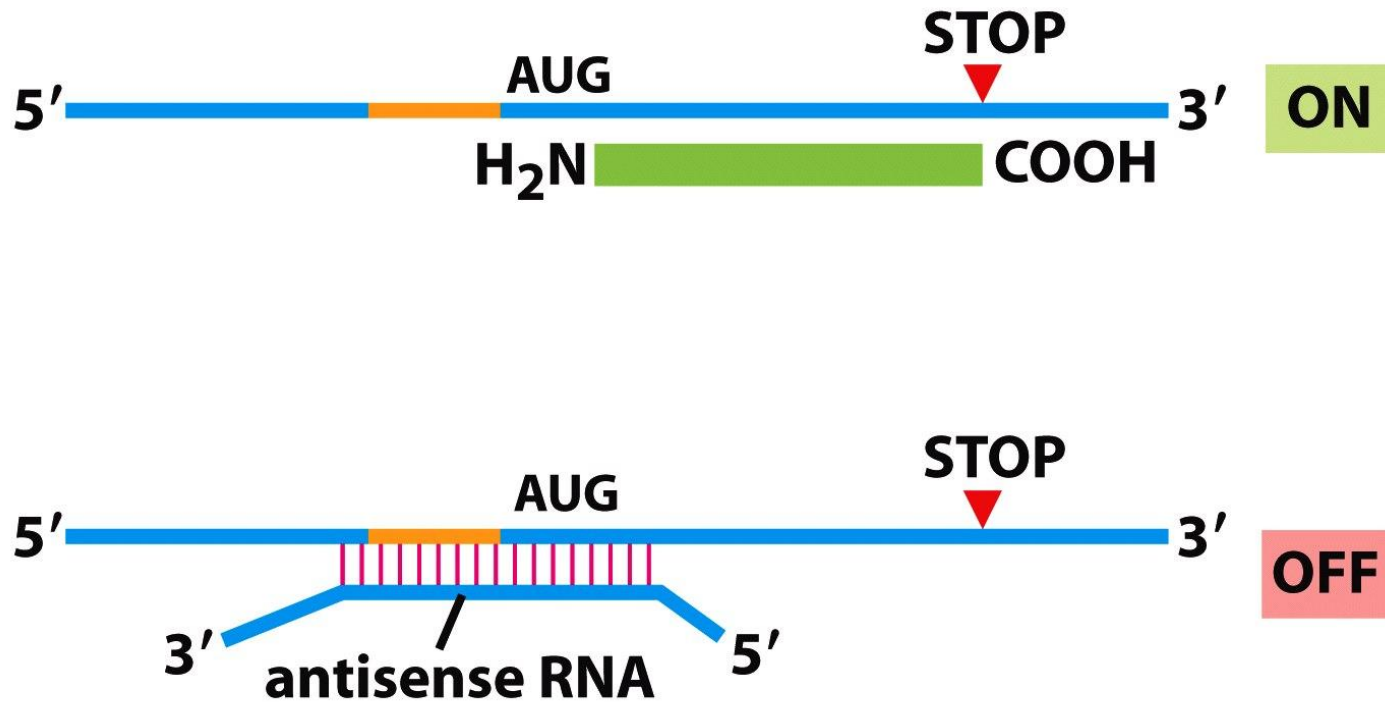
Mechanizmy kontroli procesu translacji u bakterii



Mechanizmy kontroli procesu translacji u bakterii

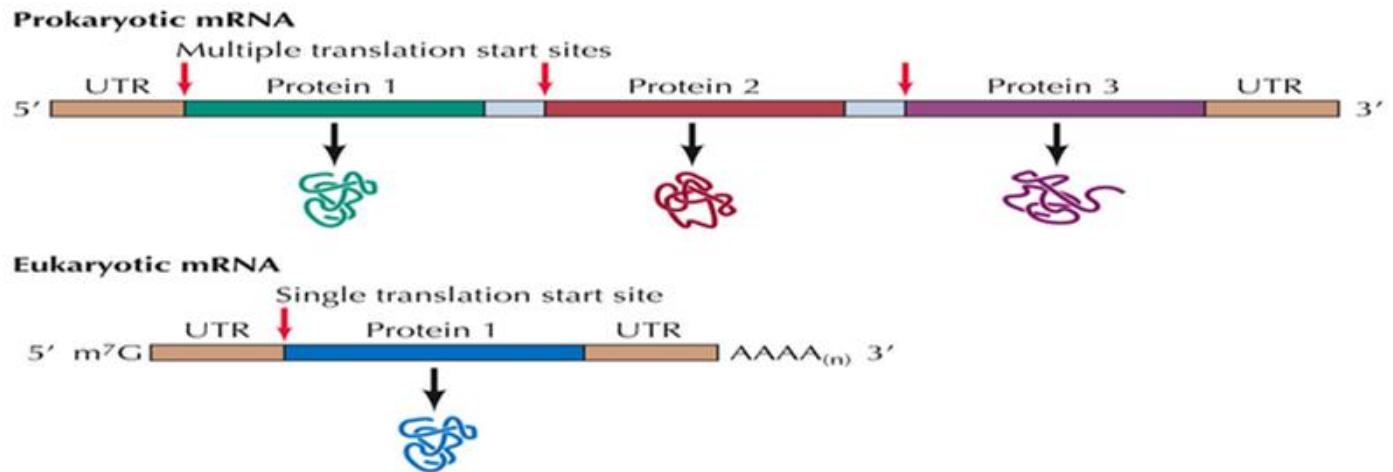


Mechanizmy kontroli procesu translacji u bakterii

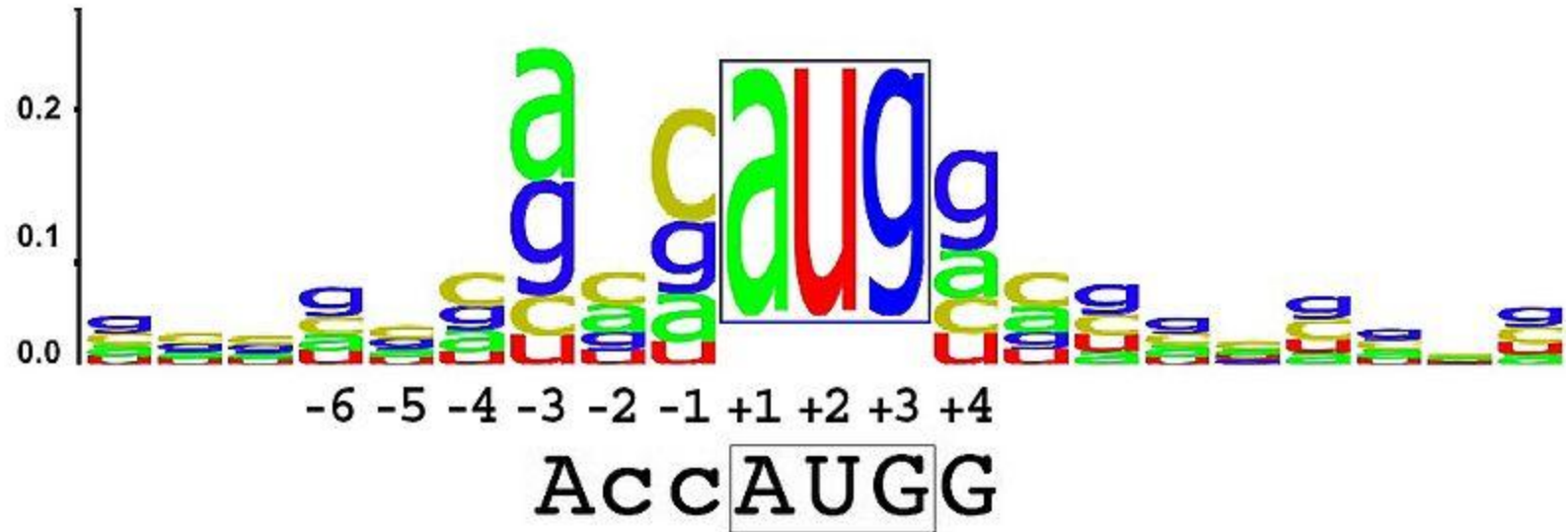


Eukariotyczny mRNA posiada jedno miejsce inicjacji syntezy białka

Prokariotyczny mRNA często zawiera wiele sekwencji Shine-Dalgarno

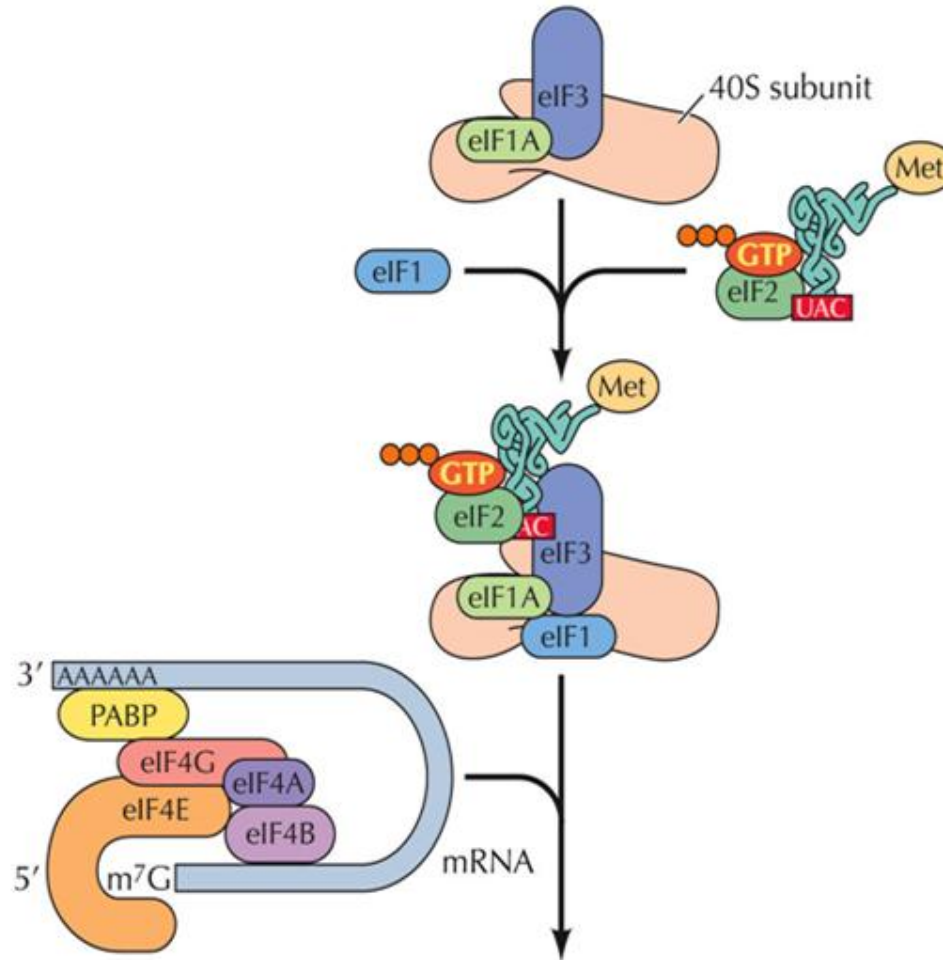


Sekwencja Kozak, właściwe otoczenie dla AUG - ACCAUGGA



Częstość poszczególnych zasad w sekwencji nukleotydowej inicjującej translację wśród ~25,000 genów człowieka

1. Inicjacja translacji – komórka eukariotyczna



THE CELL, Fourth Edition, Figure 8.11 (Part 1) © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Czynnik eIF1 umożliwia powstanie kompleksu preinicjacyjnego
Czynniki eIF4 oddziałują z białkiem PABP (poly A binding protein)
Czynniki inicjacyjne rozpoznają zarówno 5' jak i 3' koniec mRNA

Cykl eIF2

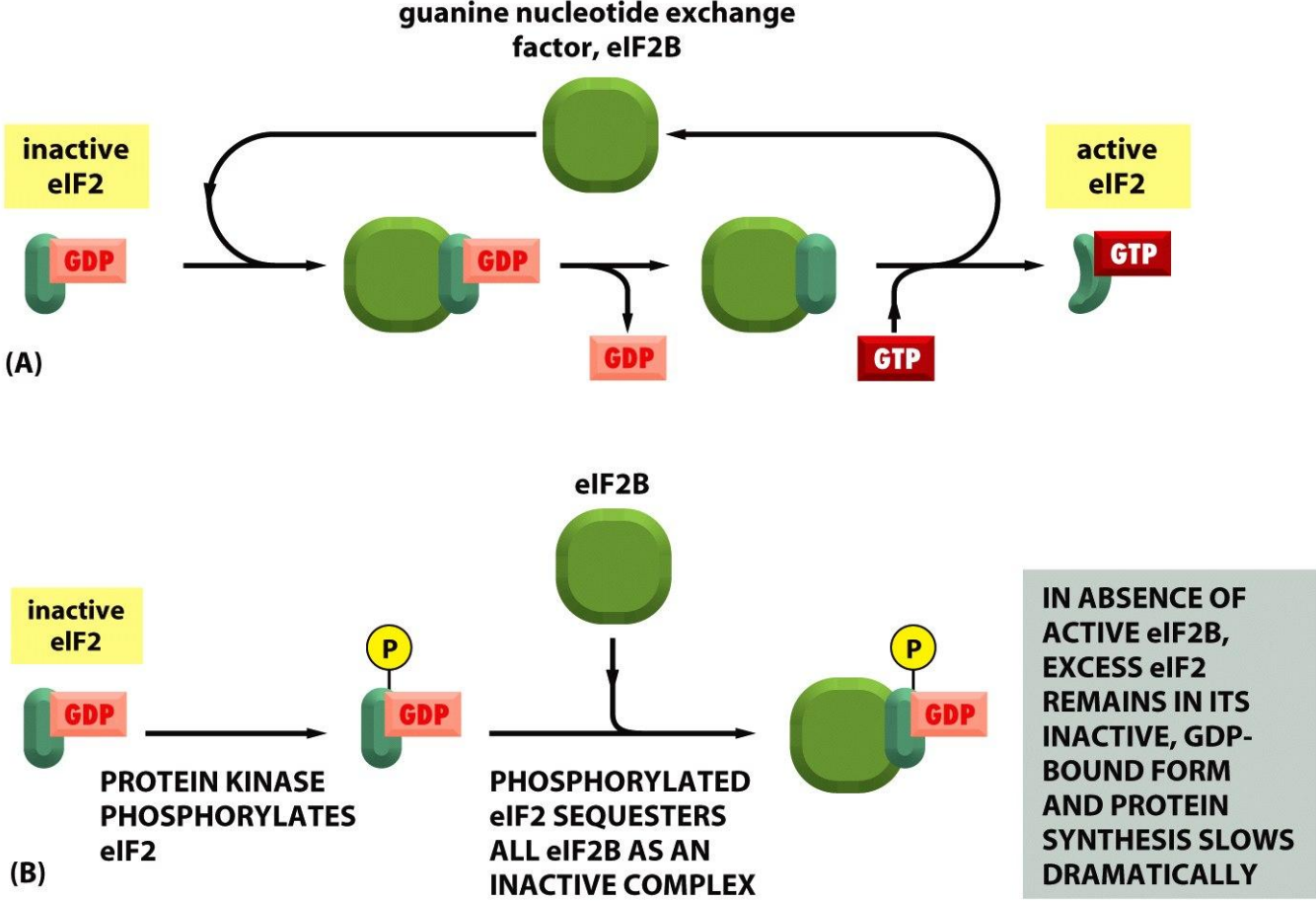
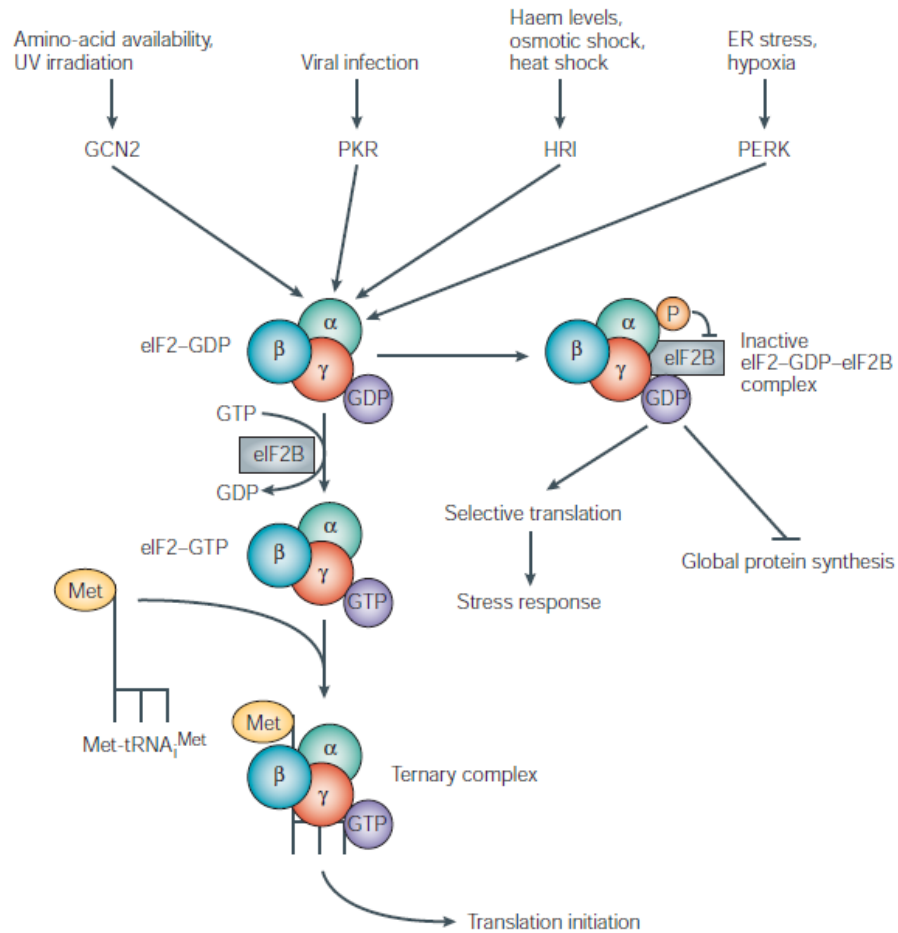


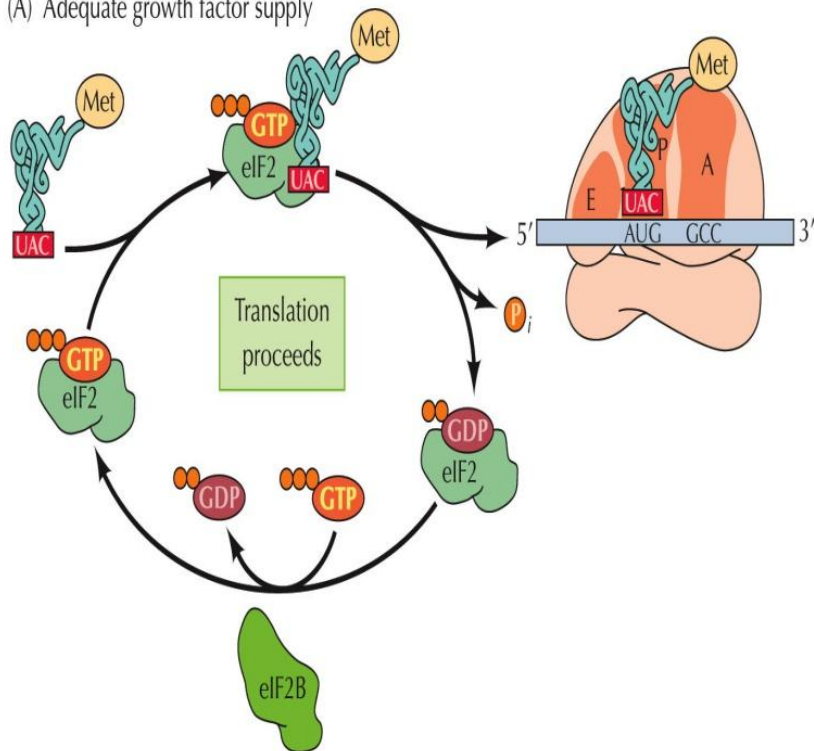
Figure 7-107 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Integration of stress responses by the phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α .

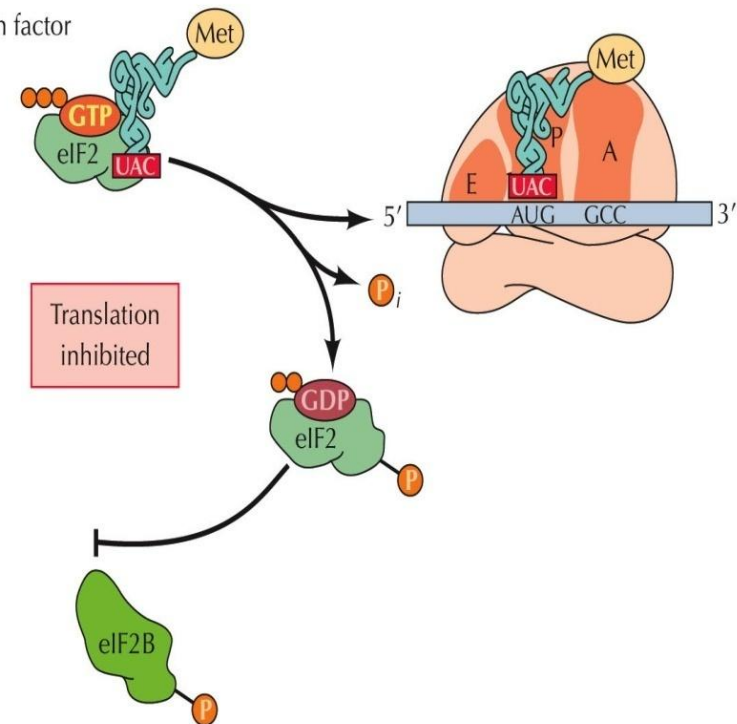


Fosforylacja eIF2 α uniemożliwia powstawanie trójskładnikowego kompleksu inicjującego poprzez zahamowanie wymiany GDP na GTP

(A) Adequate growth factor supply

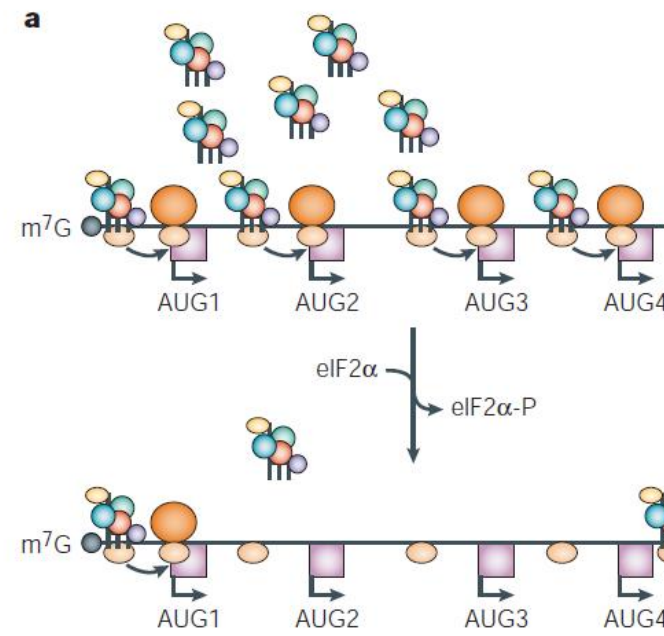
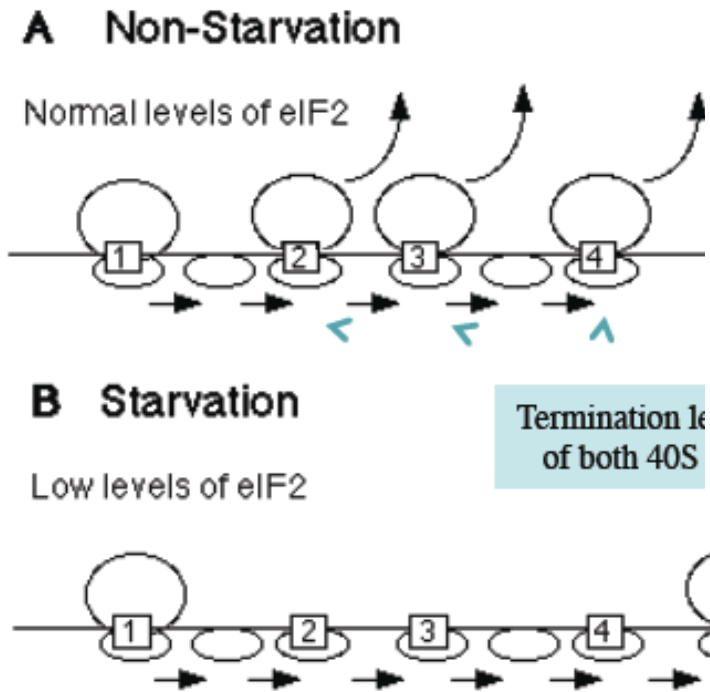


(B) Stress or growth factor starvation



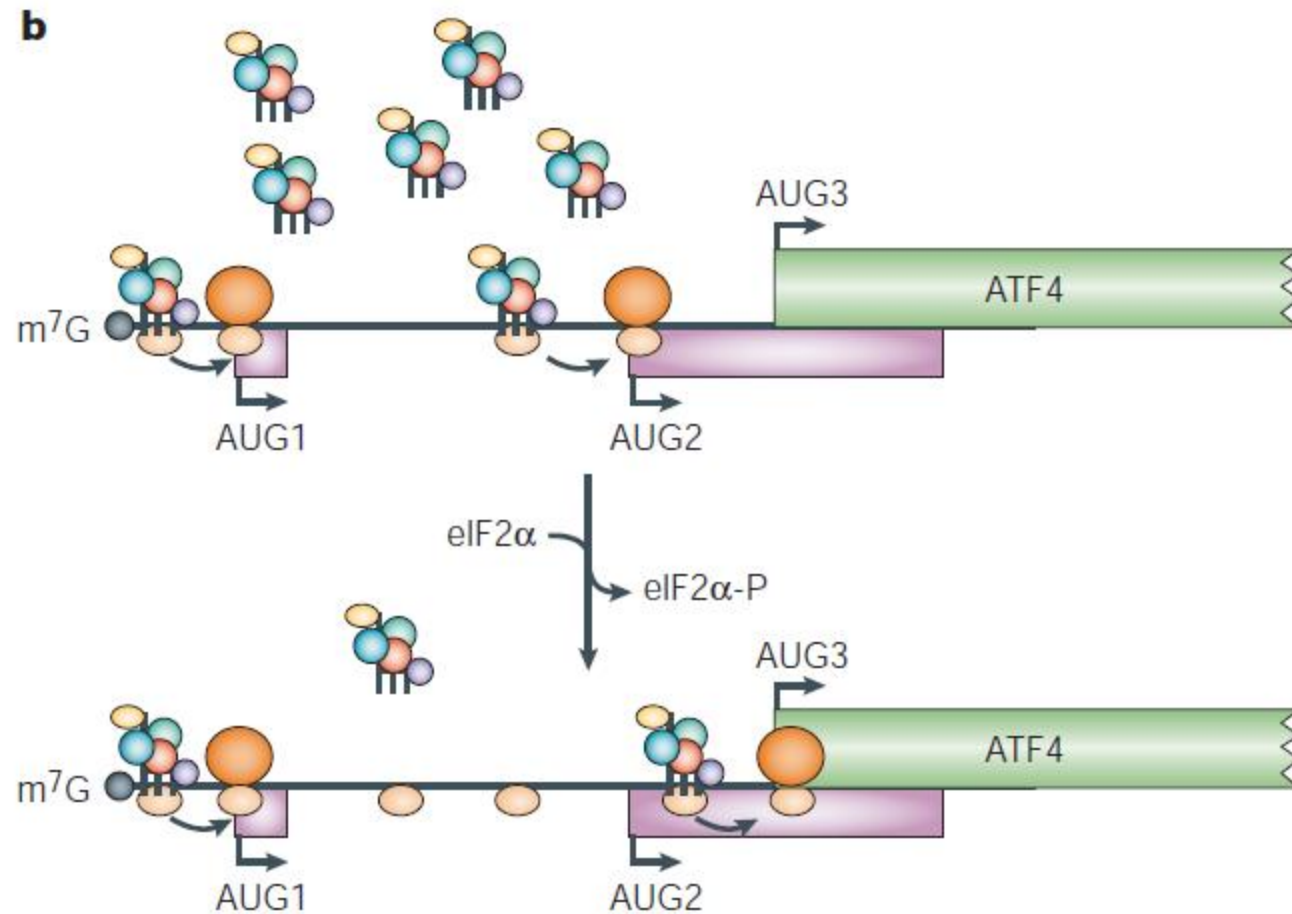
Rola małych otwartych ramek odczytu (uORF) w regulacji translacji u eukariontów (uORE – ang. small upstream open reading frames)

Około 10% mRNA kręgowców zawiera uORF, ale spośród nich 67 % to mRNA kodujące czynniki regulujące

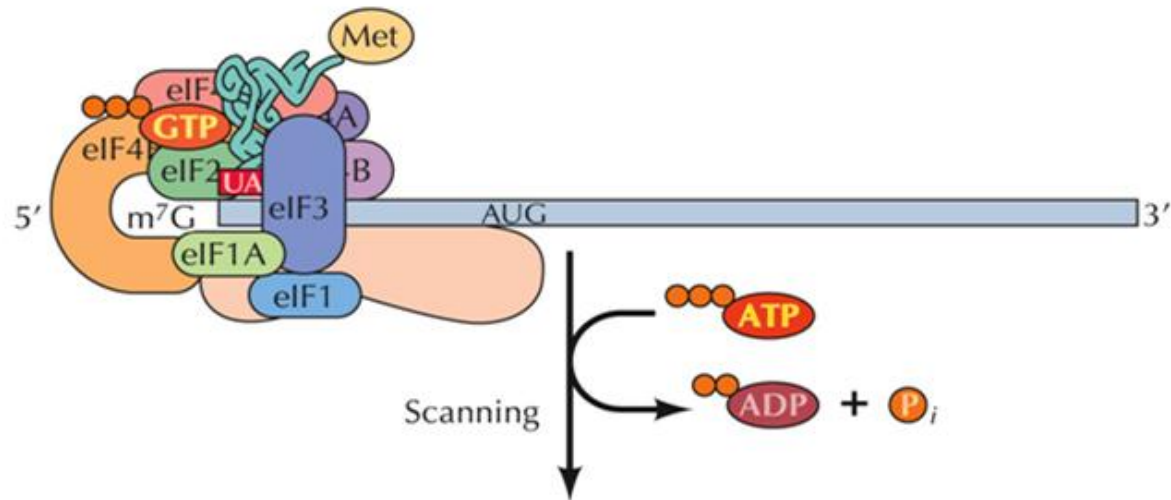


GCN4 translation is activated by amino-acid starvation

Translation of the mammalian activating transcription factor-4 (ATF4)



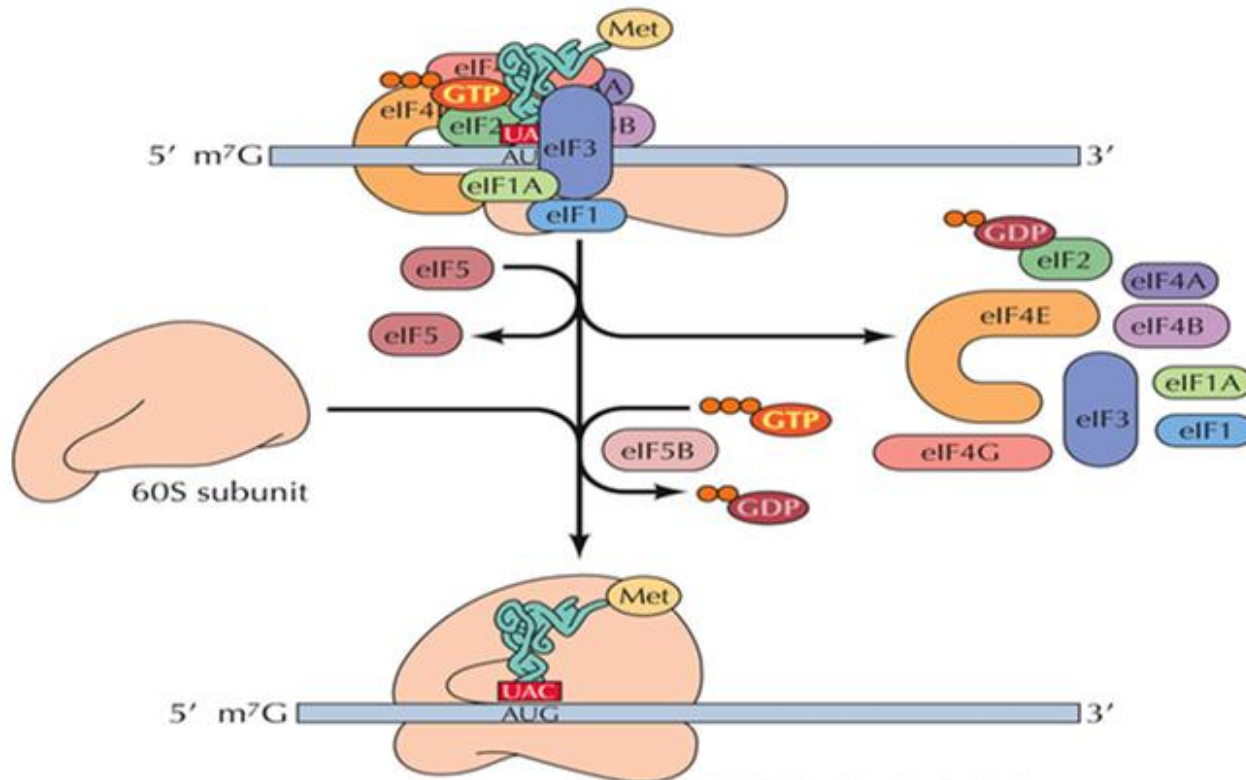
2. Inicjacja translacji – komórka eukariotyczna



THE CELL, Fourth Edition, Figure 6.11 (Part 2) © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Związanie wszystkich czynników eIF4 służy przyłączeniu mRNA do podjednostki 40S. Podjednostka 40S razem z pozostałymi czynnikami oraz tRNA „skanuje” mRNA w poszukiwaniu kodonu inicjacyjnego (AUG).

3. Inicjacja translacji – komórka eukariotyczna

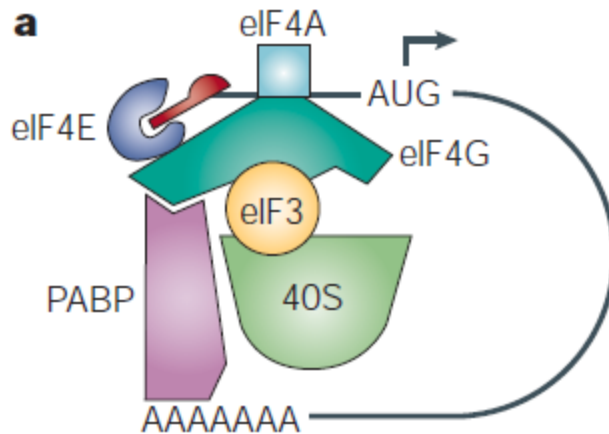


THE CELL, Fourth Edition, Figure B.11 (Part 3) © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

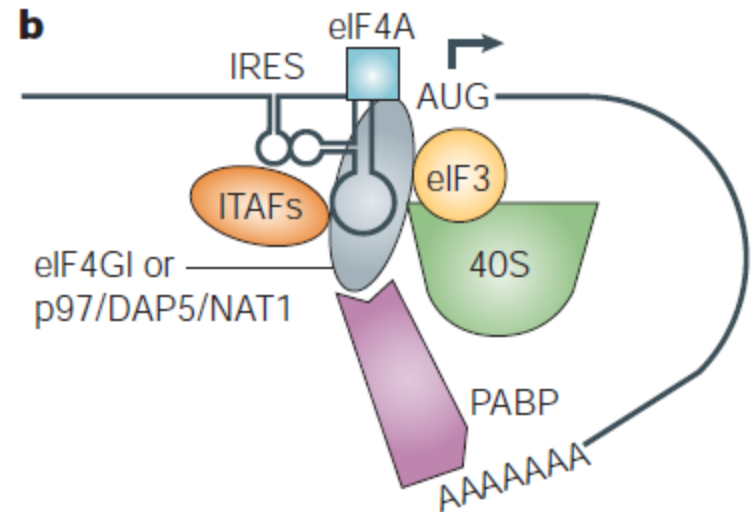
eIF5 inicjuje hydrolizę GTP przyłączonego do eIF2,
utrata grupy fosforanowej powoduje uwolnienie wszystkich czynników związanych z GDP
to jest sygnałem do związania podjednostki 60S rybosomu z 40S
powstanie kompleksu rybosomalnego inicjacyjnego 80S rozpoczyna etap elongacji translacji

Dwa mechanizmy regulacji translacji

Regulacja zależna od czapeczki



Regulacja zależna od sekwencji IRES (internal ribosome entry site)

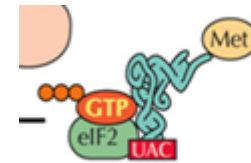
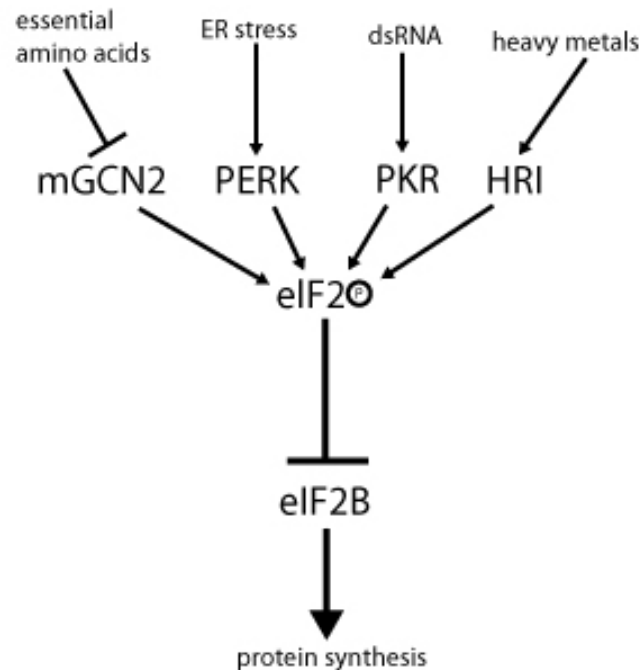


Regulacja translacji

Hipoksja, infekcja wirusowa, niedostatek aminokwasów i szok cieplny – hamowanie translacji

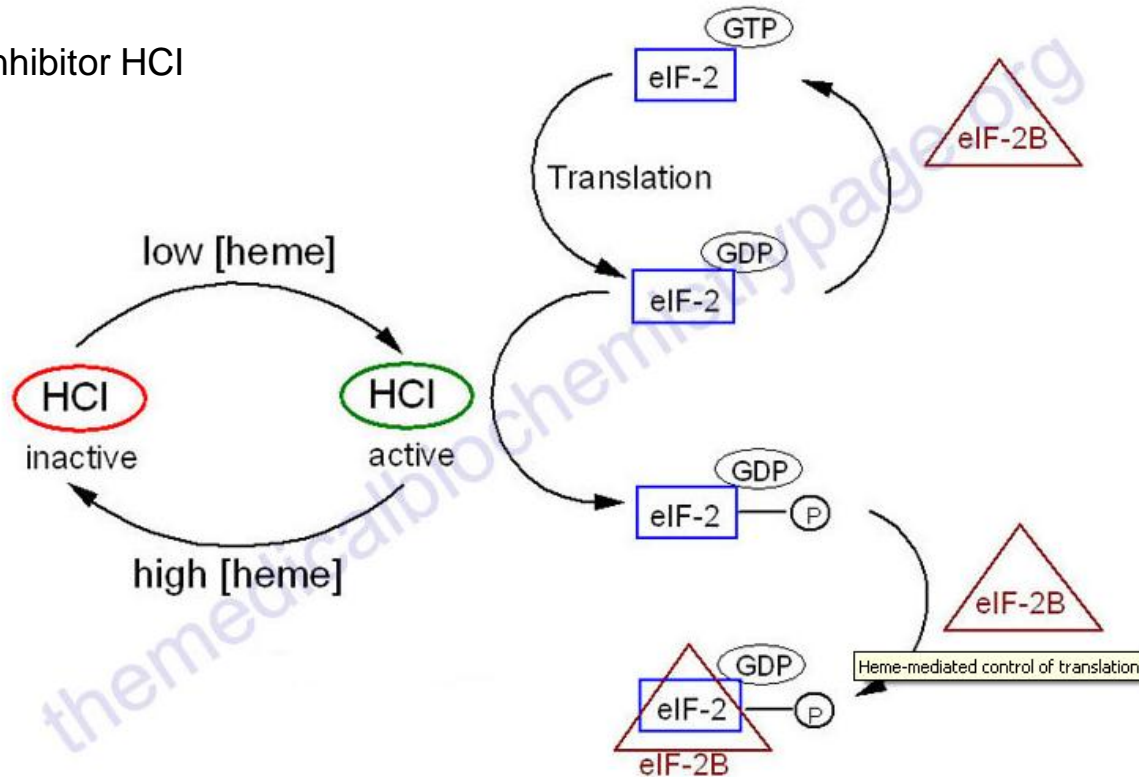
Fosforylacja eIF2 α uniemożliwia powstawanie trójskładnikowego kompleksu inicjującego poprzez zahamowanie wymiany GDP na GTP

Fosforylacja eIF2 α hamuje translację większości mRNA, zwiększa translację mRNA kodujących białka biorące udział w adaptacji do stresu i przywracaniu translacji.

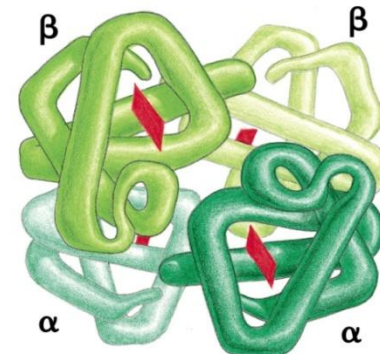


Regulacja translacji kontrolowana przez poziom hemu

Heme controlled inhibitor HCI



Hemoglobina



Główny mechanizm regulacji translacji u Eukariota - fosforylacja białek biorących udział w procesie inicjacji translacji

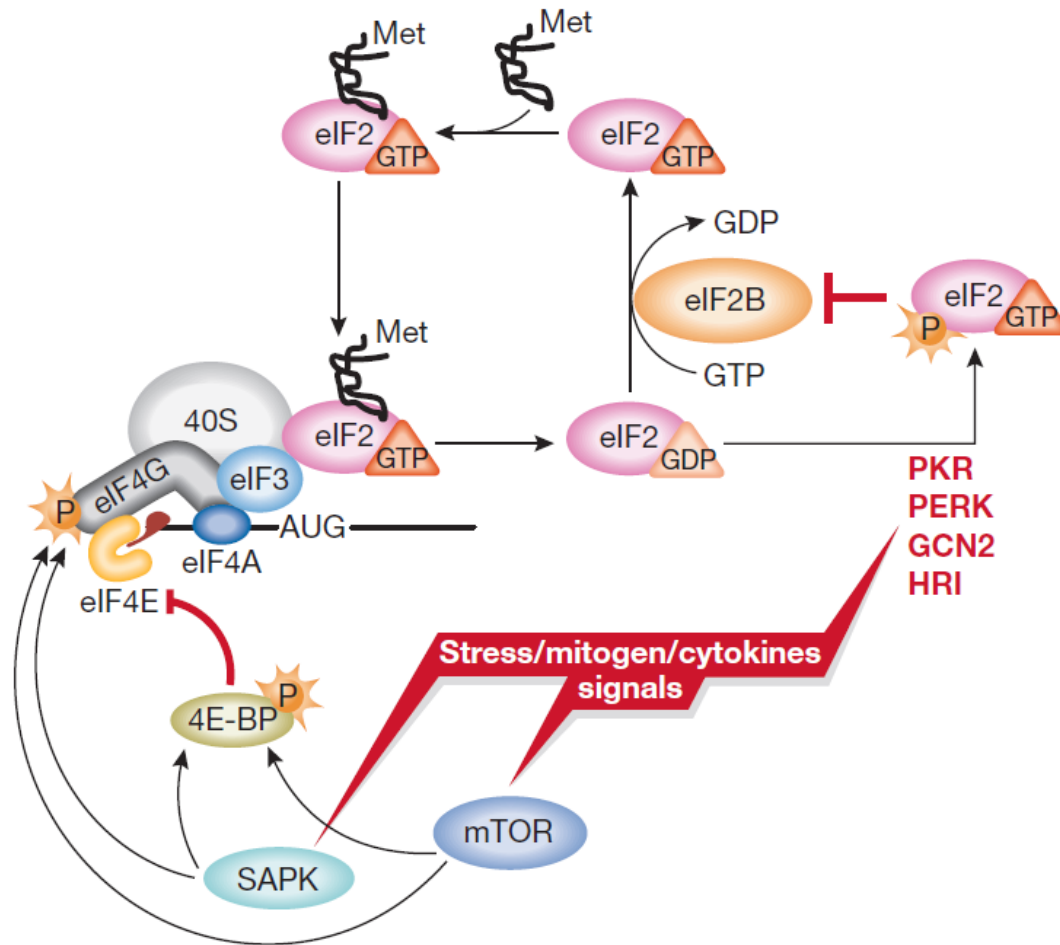
CPEB (cytoplasmic polyadenylation element binding oddziałuje z polyA)

S6 (składnik podjednostki 40S)

eIF4F

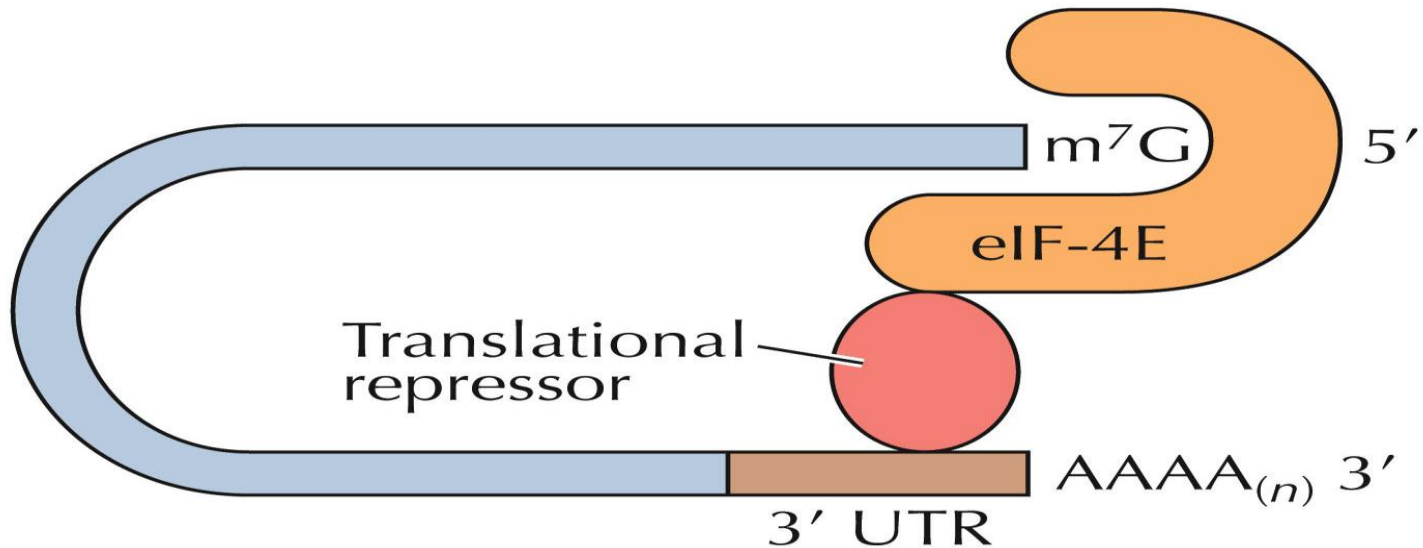
eIF2

Model regulacji procesu translacji w warunkach stresu.

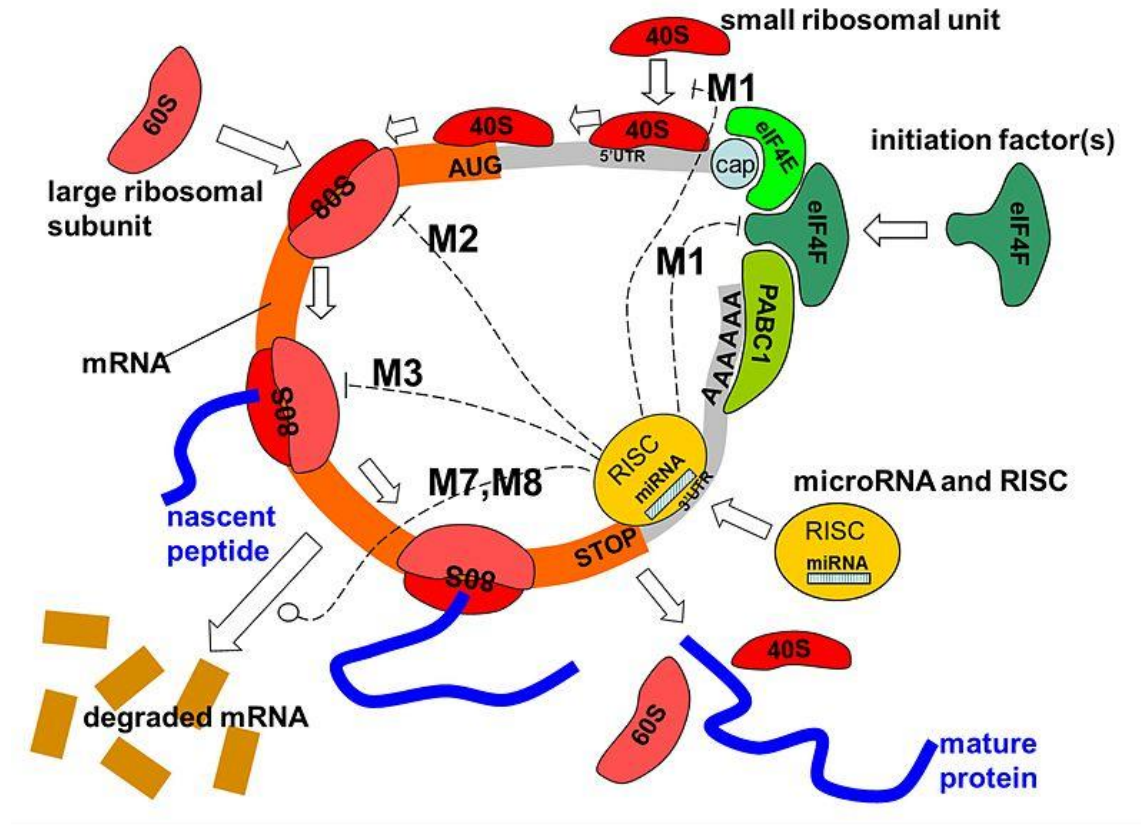


Translacja może być regulowana przez specyficzne wiązanie się czynników białkowych do 3'UTR mRNA

Lokalizacja mRNA w zdefiniowanych regionach komórki jajowej czy embrionu odgrywa istotną rolę w rozwoju

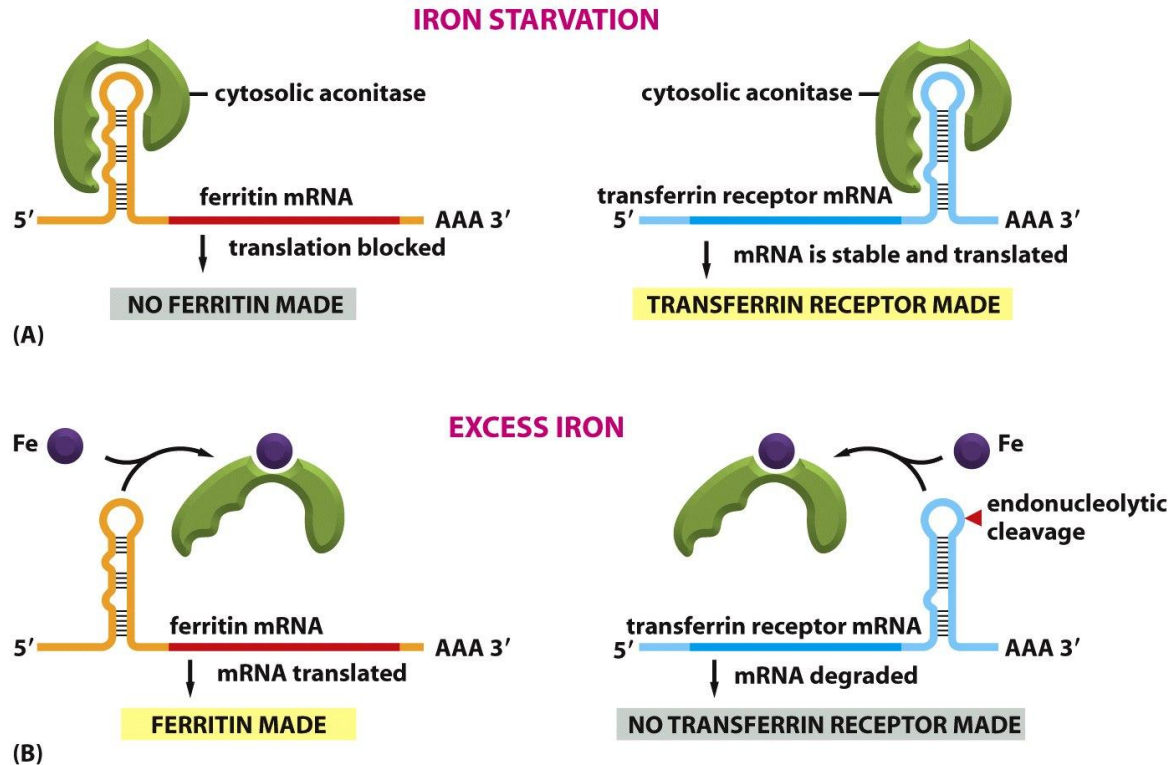


Rola miRNA w regulacji translacji



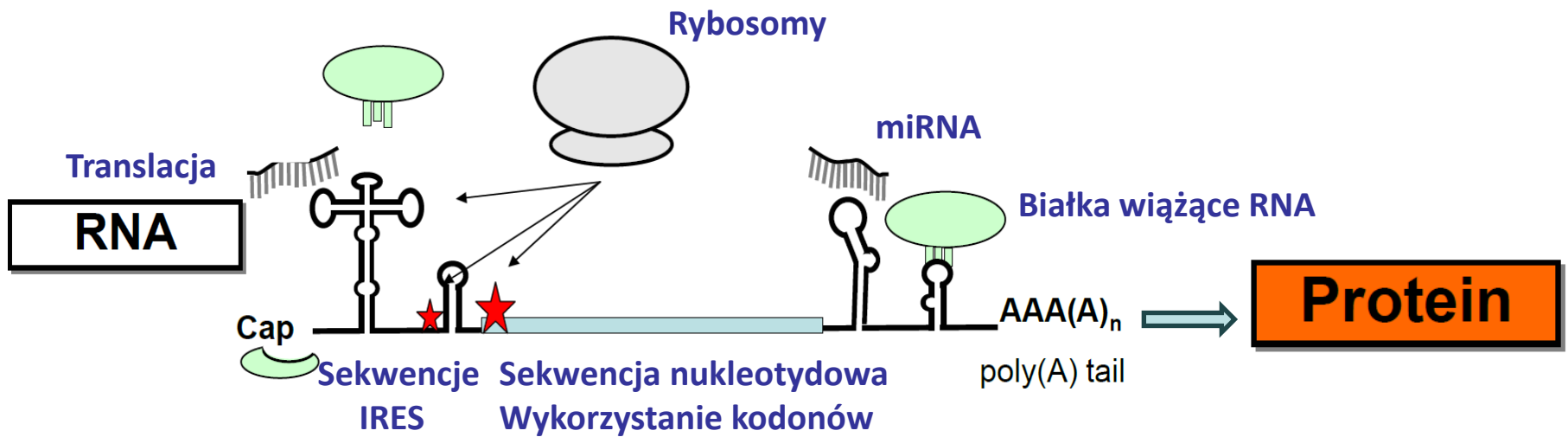
- M1 – uniemożliwia utworzenie kompleksu inicjacyjnego, hamuje rekrutację małej podjednostki rybosomu
- M2 – wpływa na związanie się podjednostek rybosomowych
- M3- hamuje elongację translacji
- M7,8 – degradacja RNA

Regulacja stabilności mRNA



Pobieranie żelaza zależne od receptora transferyny (TfR)
Przechowywanie w komórce - ferrytyna

Mechanizmy regulujące poziom ekspresji białek



Wpływ wirusów na regulację procesu translacji komórki gospodarza

Synteza białek wszystkich wirusów zależy od maszynerii translacyjnej gospodarza

Translacja – to „pole bitwy” pomiędzy gospodarzem, a atakującym wirusem

Hipoteza: W toku ewolucji organizmy eukariotyczne wykształciły monocistronowe mRNA oraz jądro komórkowe w obronie przed wirusami

**Wirusy (szczególni wirusy RNA)- Wchodzą do cytoplazmy komórkowej
mRNA=genom**

Oddzielenie syntezy mRNA od translacji umożliwiło oznaczenie mRNA jako cząsteczki własnej

**Wirusy wyewoluowały sposoby naśladowania i wykorzystania tych cech do własnych celów
Komórki na to odpowiedziały w toku ewolucji..... walka trwa**

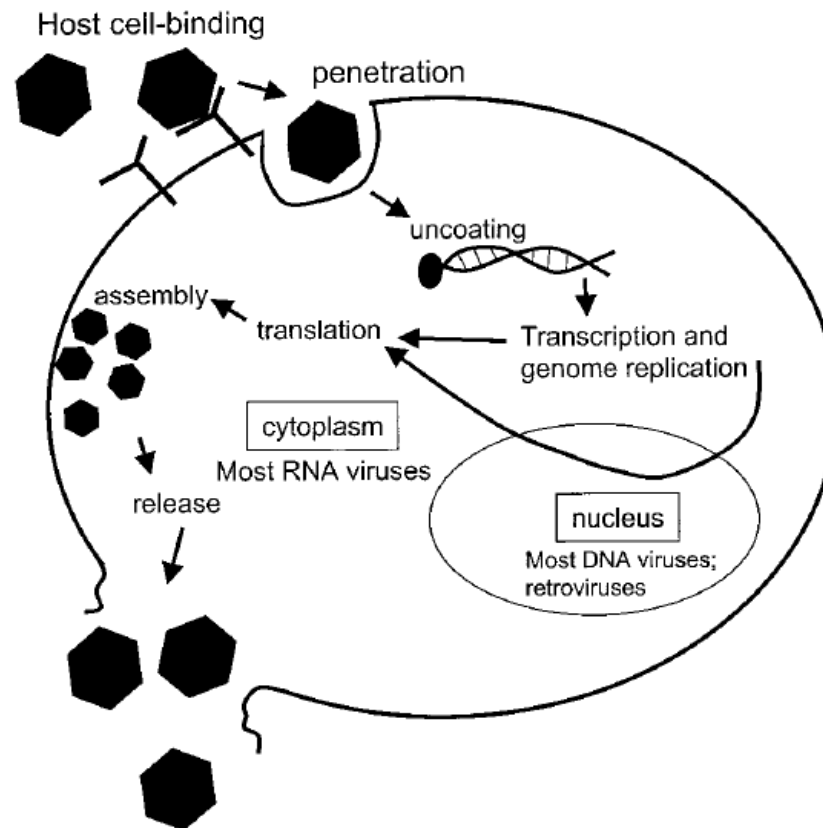
W związku z minimalizacją wielkości genomu wirusy wykształciły unikalne mechanizmy translacji

**Mały genom – bo ograniczona wielkość kapsydu
Np.geny zachodzące na siebie**

**Maszynaria translacyjna gospodarza odkodowuje zachodzące na siebie ramki odczytu
regulowana stechiometria białek wirusa**

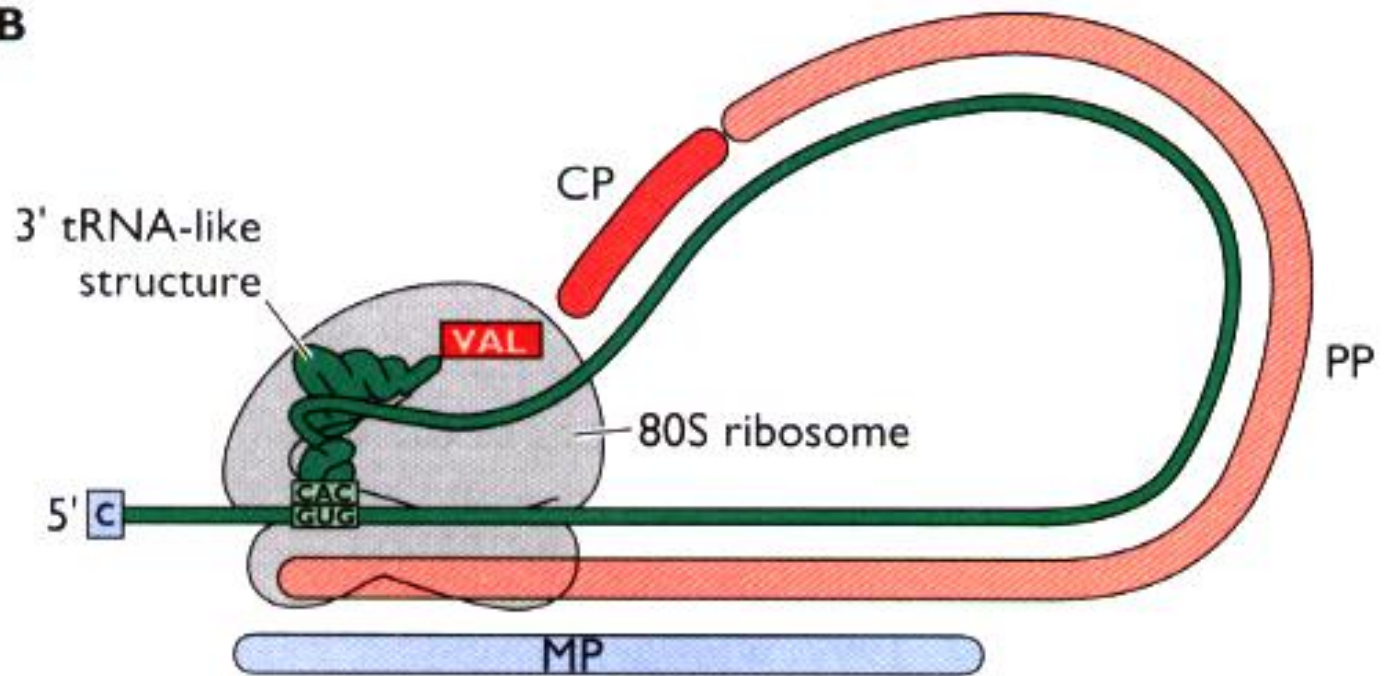
Policistronowe mRNA: pozwala na syntezę wielu białek z jednej cząsteczki mRNA

Uproszczony model replikacji wirusów eukariotycznych



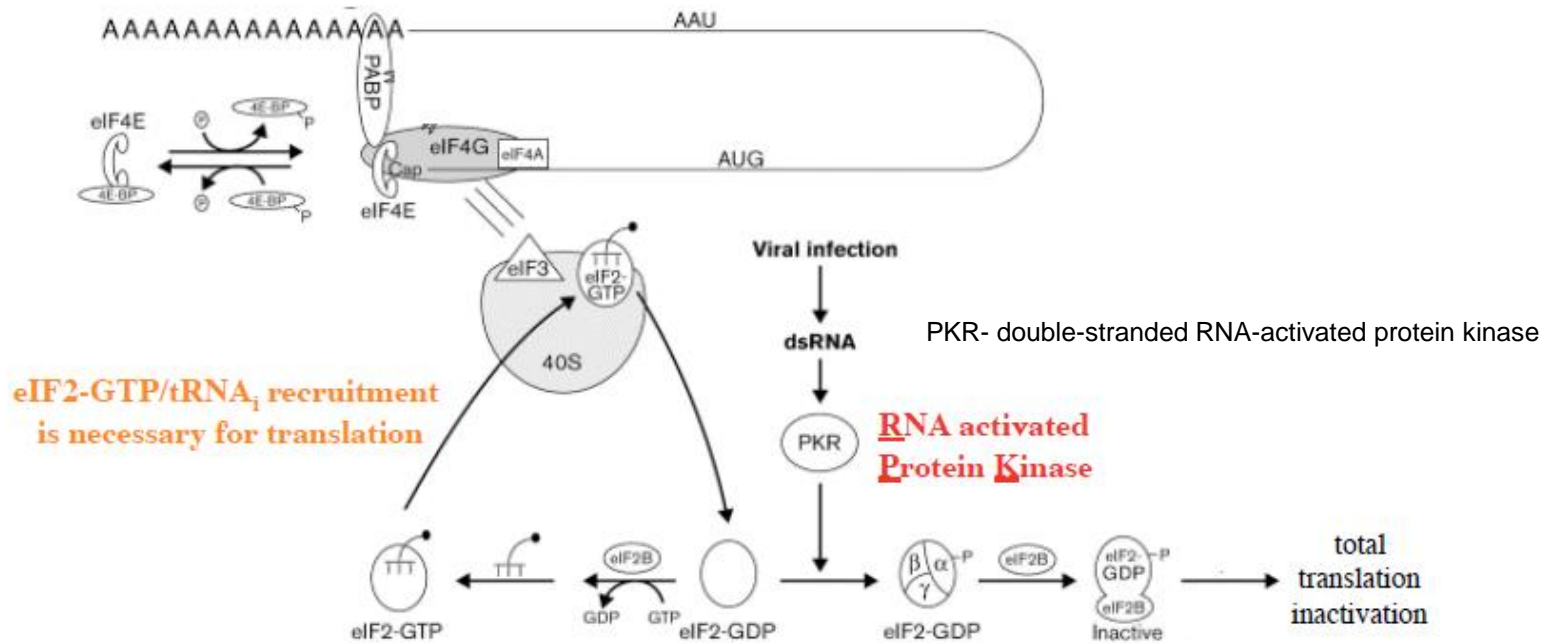
Strategie wirusów

B



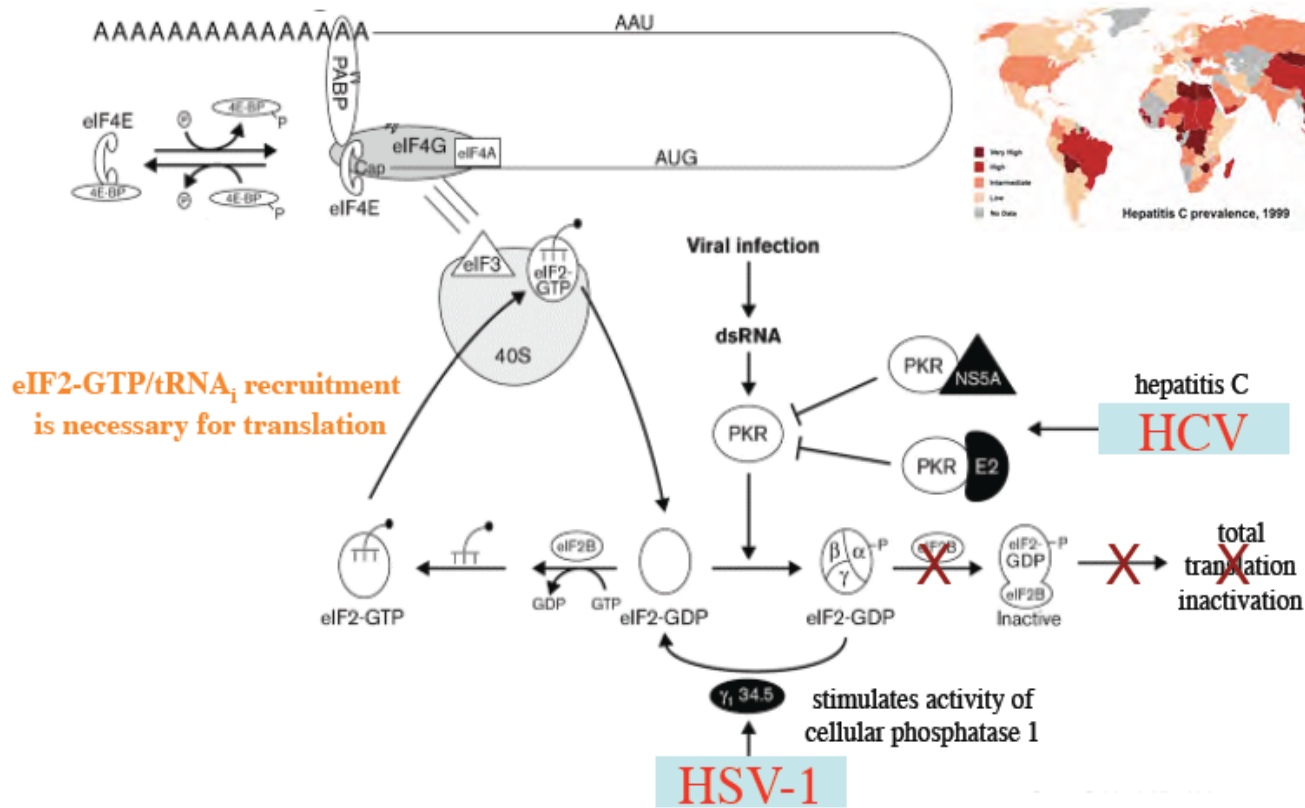
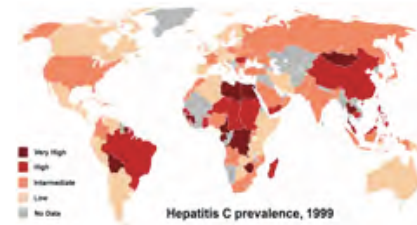
Odpowiedź komórki na infekcję wirusową

Fosforylacja czynnika eIF2 przez białkową kinazę PKR
inaktywacja czynnika - hamowanie translacji



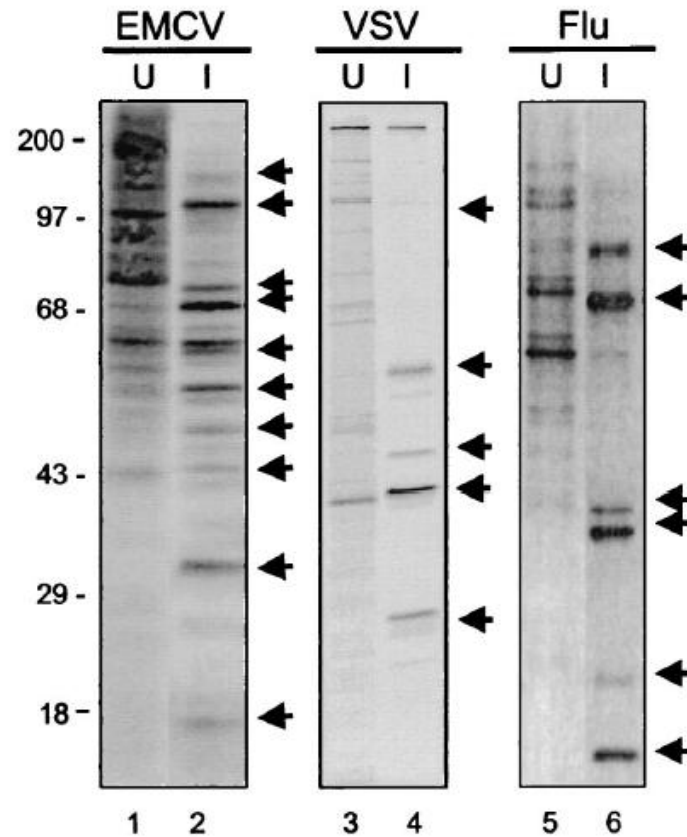
Odpowiedź wirusa na reakcję komórki

HCV
 3% of world infected (170 million);
 essentially incurable → end-stage liver
 disease and hepatocarcinoma



Adapted from Thompson and Sarnow (2000), Current Opinion in Microbiology 3:366-370

Wirusy hamują translację białek komórek gospodarza

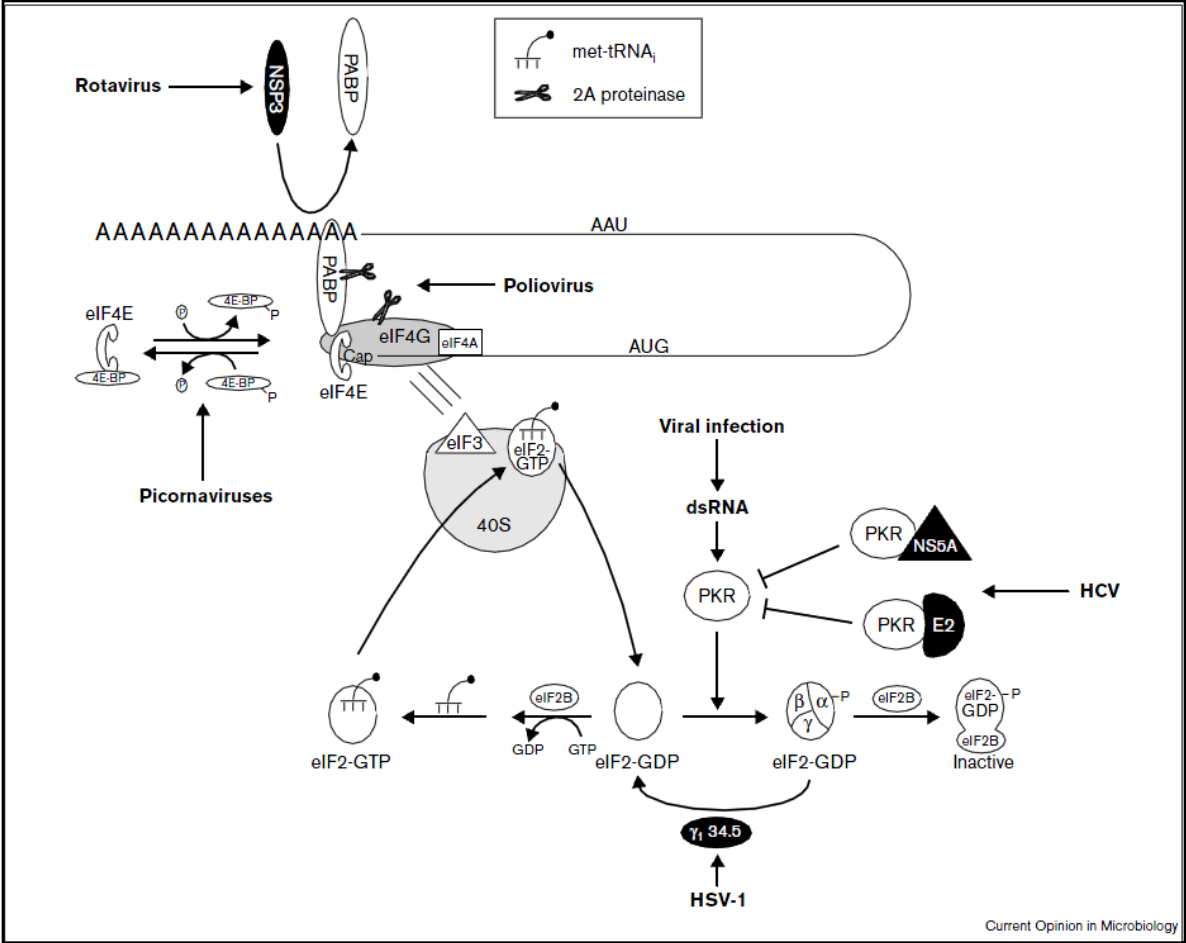


EMCV (Encephalomyocarditis Virus)
VSV (Vesicular Stomatitis Virus)

Cel wirusa – wyłączenie translacji gospodarza, ale nie własnej

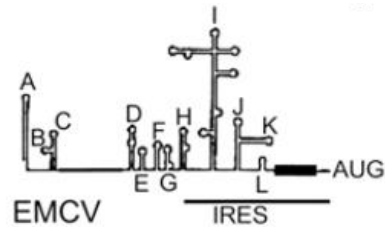
Sposób: zmiana specyficzności czynników inicjacyjnych translacji

Wpływ wybranych białek wirusowych na inicjację translacji komórkowych mRNA

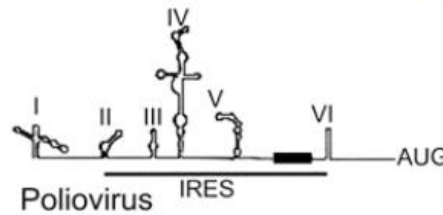


W jaki sposób zachodzi inicjacja translacji wirusowych mRNA przy nieaktywnych kompleksach białkowych wiążących się do struktury czapeczki

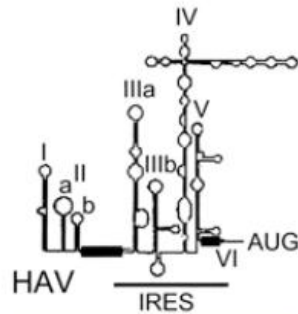
Obecność IRES pozwala na ominięcie struktury kapu w procesie translacji



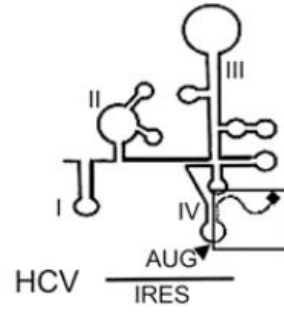
Encephalomyocarditis Virus



Poliovirus



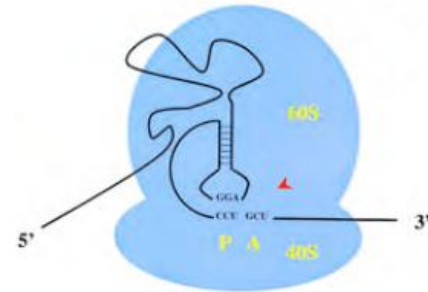
Hepatitis A Virus



Hepatitis C Virus

IRES przykład strukturalnej mimikry

Ala-tRNA^{ala}

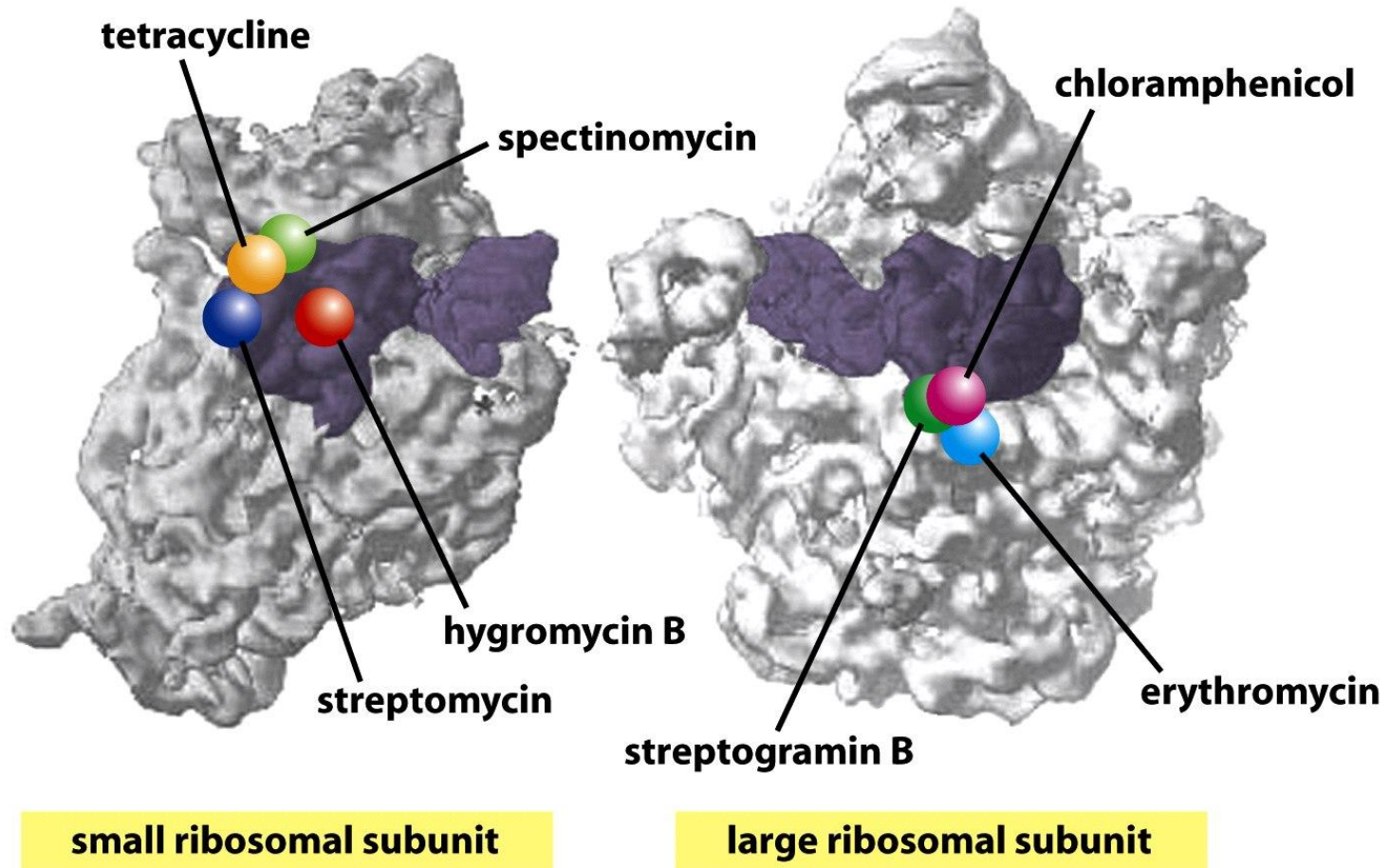


Cricket Paralysis-Like Virus

bypasses the need for tRNAi

Adapted from Thompson and Samow (2000), Current Opinion in Microbiology 3:366-370 and Bushell and Samow (2002), J Cell Biol. 158:395-9..

INHIBITORY TRANSLACJI



INHIBITORY TRANSLACJI

Inhibitor

Cel: Rybosom

Sposób działania

Inicjacja

Streptomycyna

Prokariotyczny

uniemożliwia formowanie kompleksu inicjacyjnego

Elongacja

Tetracyklina

Prokariotyczny

Wiąże 16S rRNA tuż nad miejscem A, co hamuje wiązanie Aminoacylo-tRNA

Erytromycyna

Prokariotyczny

Wiąże podjednostkę 50S, hamuje aktywność transferazy peptydylowej

Cyklohexymid

Eukariotyczny

Hamuje translokację peptydylo-tRNA

Przedwczesna Terminacja

Puromycyna

Pro i Eukariotyczny

Analoog amionoacylo-tRNA, akceptor reszty peptydylowej

Inaktywacja rybosomów

Rycyna

Eukariotyczny

Inaktywacja 28S rRNA

Translacja jest regulowana na wielu etapach

kontrola poziomu białek
pożyteczna w medycynie (antybiotyki)

Sekwestracja i modyfikacja (proteoliza/fosforylacja)
czynników eIF – kluczowy mechanizm regulacyjny

eIF2 (cel dla wirusów, a także regulacja gospodarza)
kompleks eIF4 (cel dla wirusów)

Zwijanie (fałdowanie) białek

(Protein Folding)

Aminokwasy, Białka

Niepolarne

UNCHARGED	Glycine Gly G	Alanine Ala A	Valine Val V	Leucine Leu L
	Cysteine Cys C	Methionine Met M	Proline Pro P	Isoleucine Ile I
POLAR UNCHARGED	Serine Ser S	Threonine Thr T	Tyrosine Tyr Y	Phenylalanine Phe F
	Asparagine Asn N	Glutamine Gln Q	Histidine His H	Tryptophan Trp W
CHARGED	Aspartic acid Asp D	Glutamic acid Glu E	Lysine Lys K	Arginine Arg R
	-1	-1	+1	+1

Polarne obojętne

Zasadowe i kwaśne

Aminokwasy, Białka:

- Białka są tworzone z liniowej sekwencji aminokwasów, połączonych wiązaniami peptydowymi

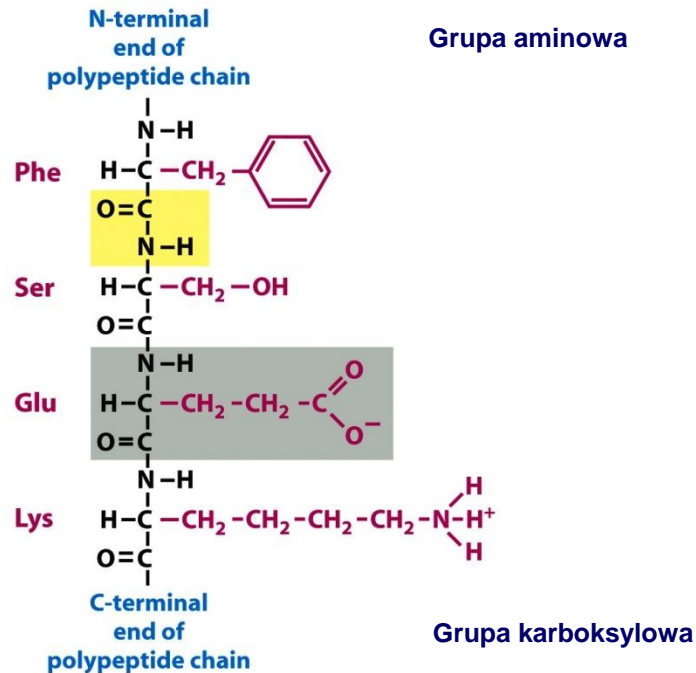


Figure 2-24 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

- Aminokwasy połączone wiązaniami peptydowymi stanowią strukturę pierwszorzędową białka

Struktura Białka:

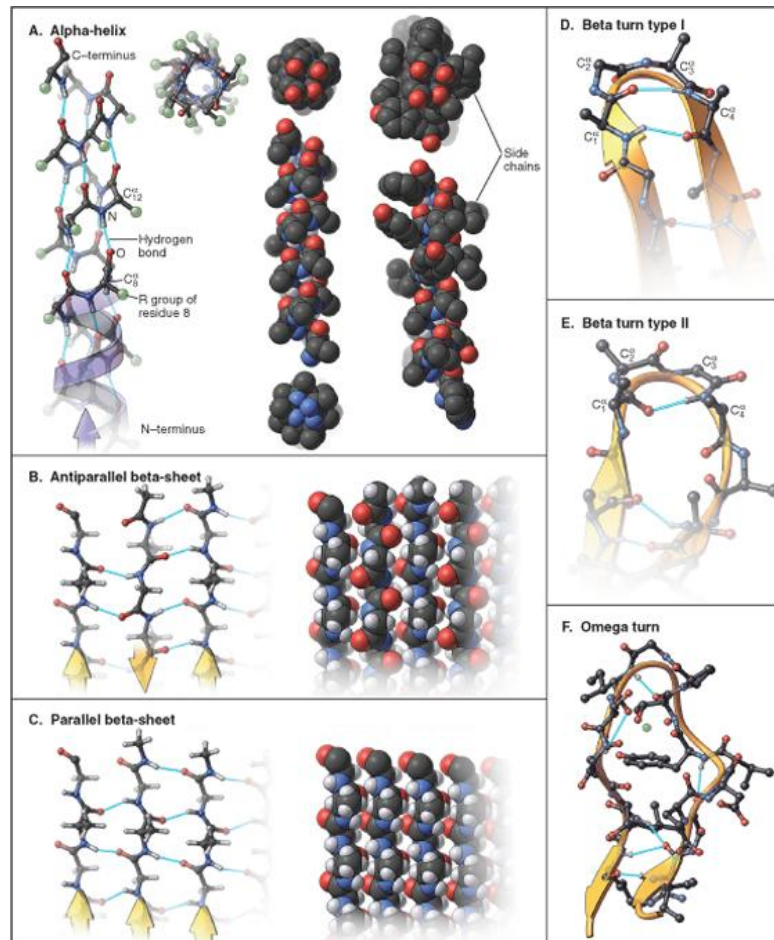
Przyjęcie konformacji o najniższej energii swobodnej

- Drugorzędowa

Oddziaływania aminokwasów z ich sąsiadami decydują o strukturze drugorzędowej

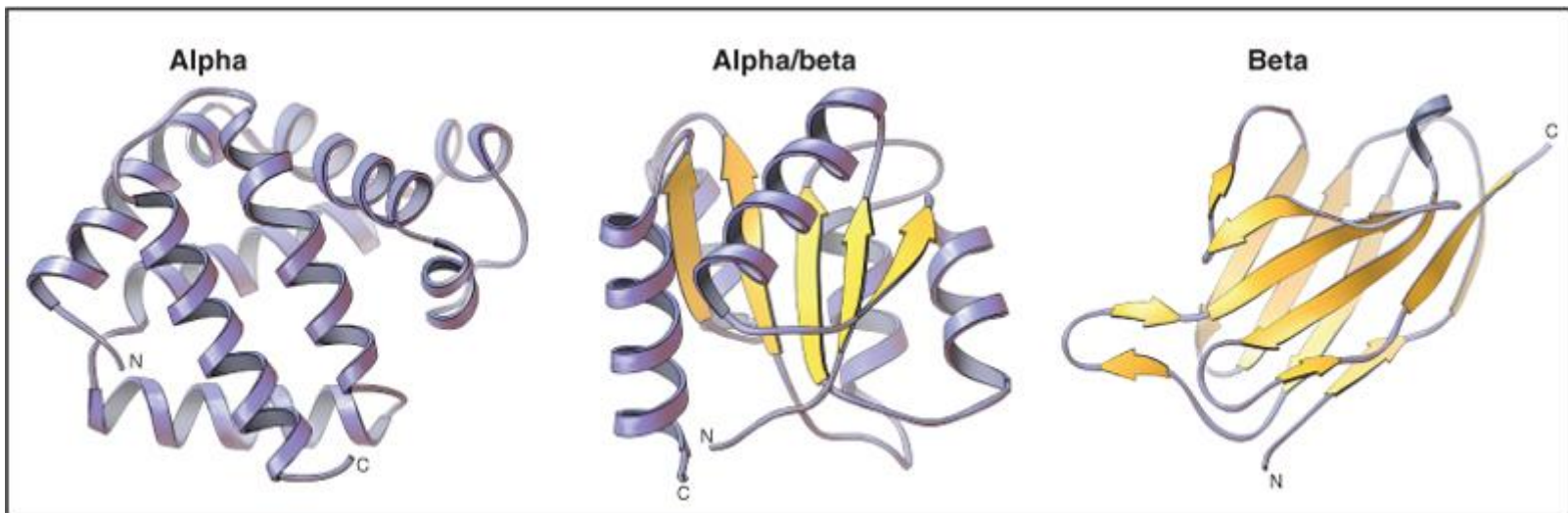
Stabilizowane przez:
wiązania wodorowe
mostki dwusiarczkowe
wiązania van der Waalsa
oddziaływania hydrofobowe
elektrostatyczne

Helisa alfa, harmonijka beta, zwroty



Struktura Białka:

- Trzeciorzędowa – polipeptyd zwinięty w strukturę przestrzenną (wiązania kowalencyjne i niekowalencyjne)

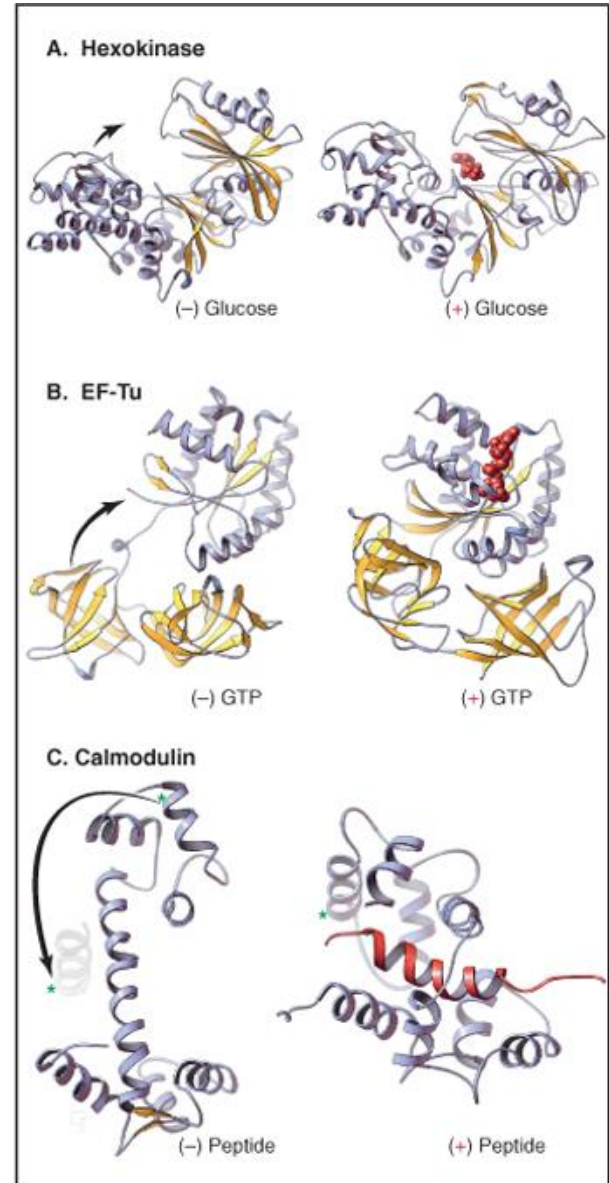


© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

- Czwartorzędowa – kompleksy wielu pojedynczych łańcuchów polipeptydowych

Dynamika Białek

- Wiązanie ligandu
- Aktywność wielu białek powiązana z dużymi zmianami konformacyjnymi



Fałdowanie i Modyfikacje białek:

- Białka wiążą inne białka przez dopasowanie powierzchni – specyficzne, może być silne

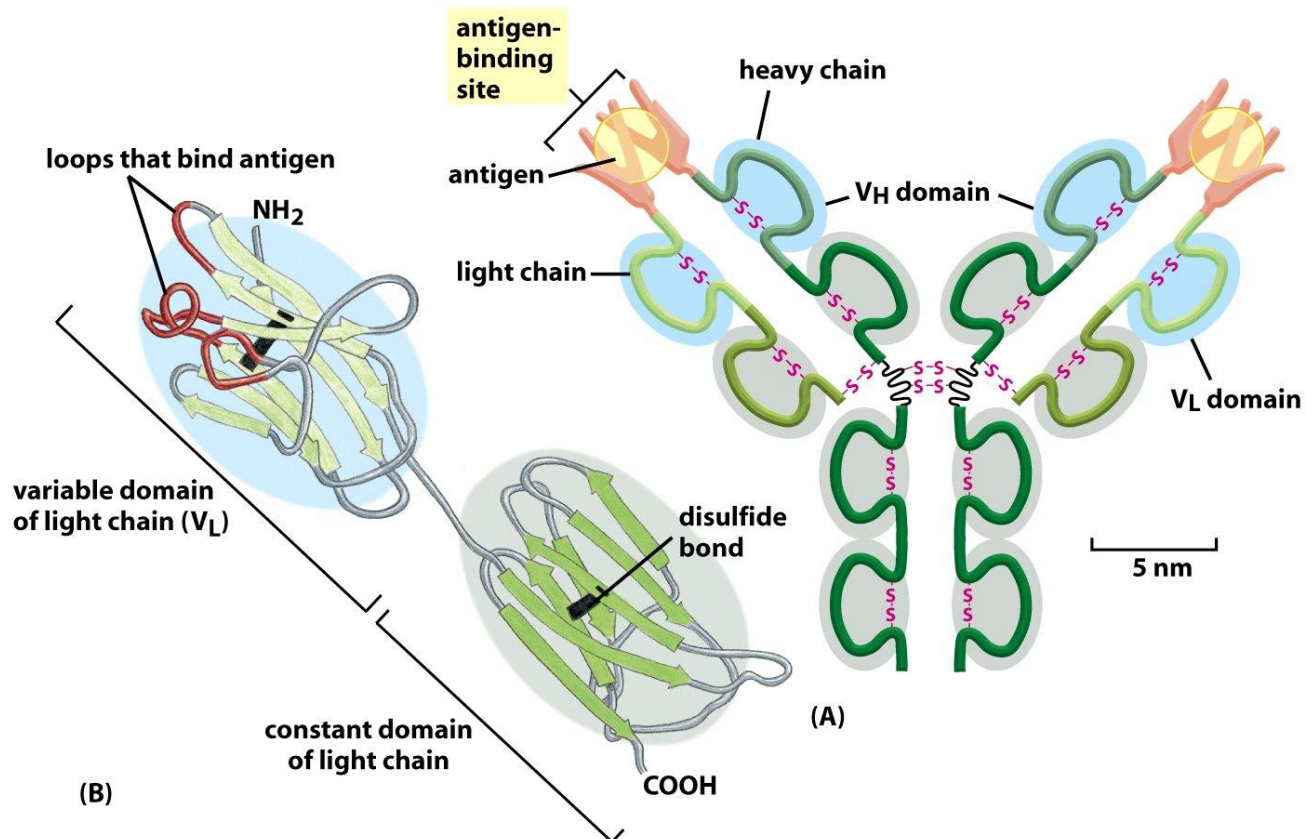


Figure 3-41 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Fałdowanie i Modyfikacje białek:

- Białka opiekuńcze „chaperones” pomagają przyjmować właściwą konformację białkom w trakcie procesu fałdowania.

Interagują z intermediatami powstałymi w trakcie fałdowania.

Hsp70, Hsp90 + co,

Chaperoniny

Małe białka szoku cieplnego

Wyspecjalizowane chaperony

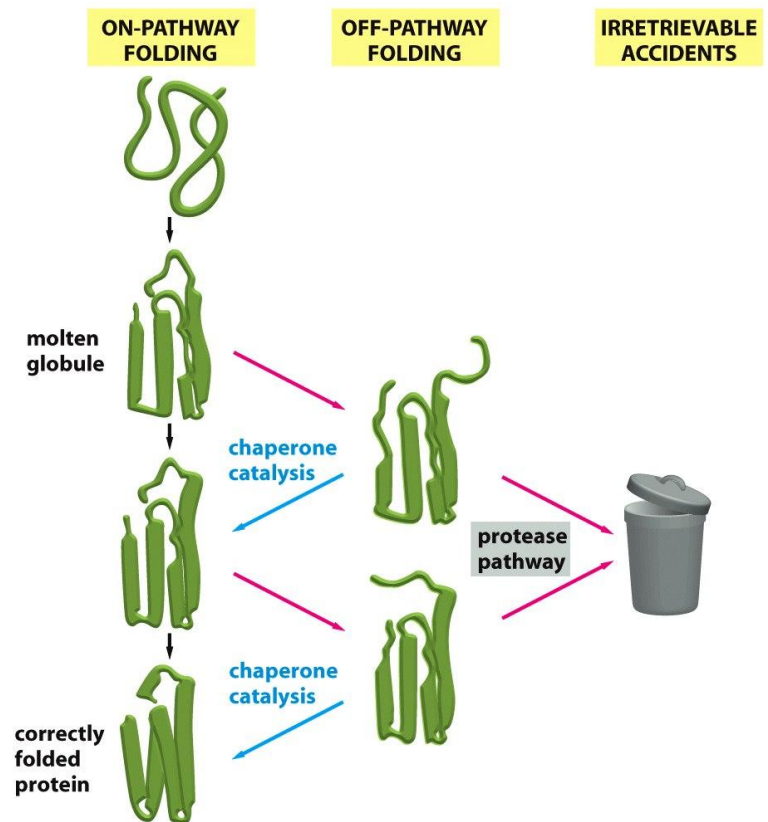


Figure 6-85 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Fałdowanie i Modyfikacje białek

Białka szoku cieplnego (Hsp) zaliczamy do białek opiekuńczych

Indukcja:

stres termiczny

stres oksydacyjny

zatrucie metalami ciężkimi

zatrucie alkoholem

inhibitory przemian energetycznych

zapalenie

Fałdowanie i Modyfikacje białek

Białka HSP

Dezagregacja białek wrażliwych na stres oraz ułatwianie proteolizy białek uszkodzonych

Większa szansa komórek na przeżycie w warunkach stresu

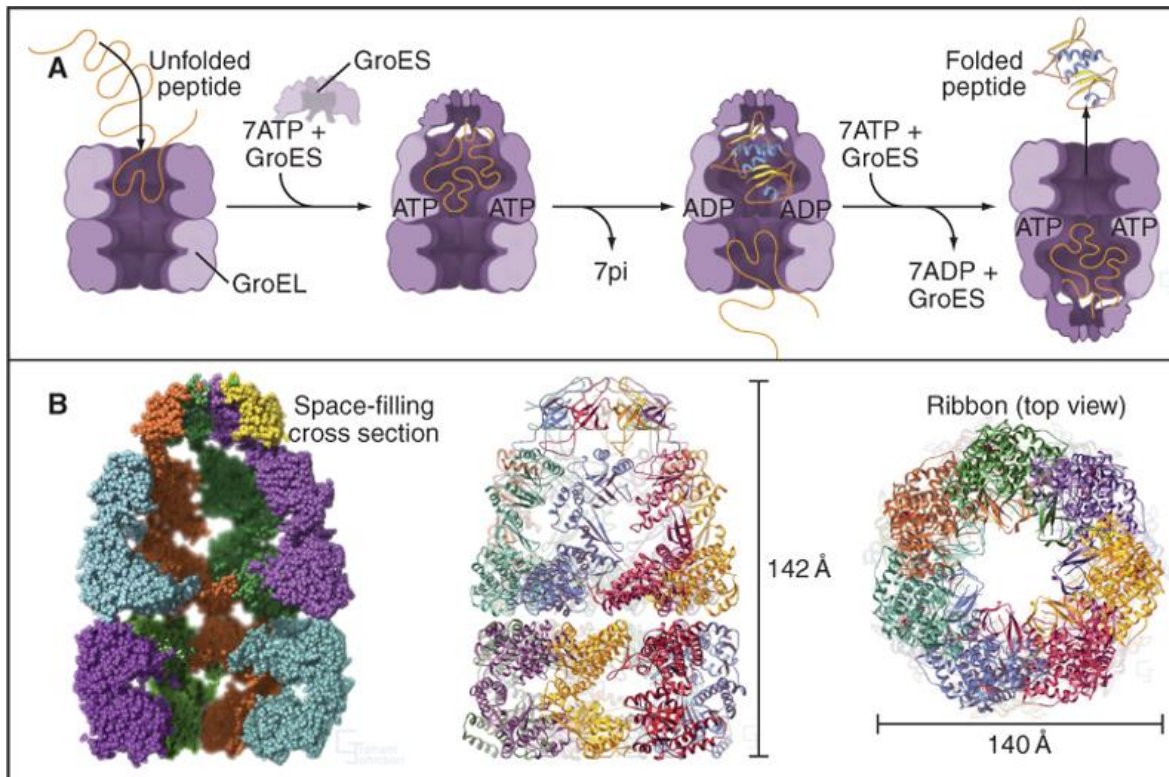
W warunkach normalnych regulują podstawowe procesy życiowe komórki, biorą udział w fałdowaniu i translokacji białek, ale także aktywują niektóre białka regulatorowe

Fałdowanie i Modyfikacje białek

- **Rodzina Hsp70 (70 kDa)** – u człowieka kodowana przez 11 różnych genów położonych na kilku chromosomach, stanowi 1-2% białek w komórce.
- **HSF - czynnika szoku cieplnego**, czynnik transkrypcyjny, który indukuje ekspresję genów HSP70 w warunkach stresu, na indukcję HSP70 wpływają także czynniki regulujące takie procesy jak cykl komórkowy, proliferacja i różnicowanie komórek
- Wykazano nadekspresję białek Hsp70 w neuronach i miocytach mutantów *Cyanorhabdis elegans* o wydłużonym czasie życia.

Fałdowanie i Modyfikacje białek

- Białka opiekuńcze wiążą segmenty hydrofobowe białek lub zapewniają odizolowane środowisko, najczęściej z użyciem energii. Zapobiegają agregacji.



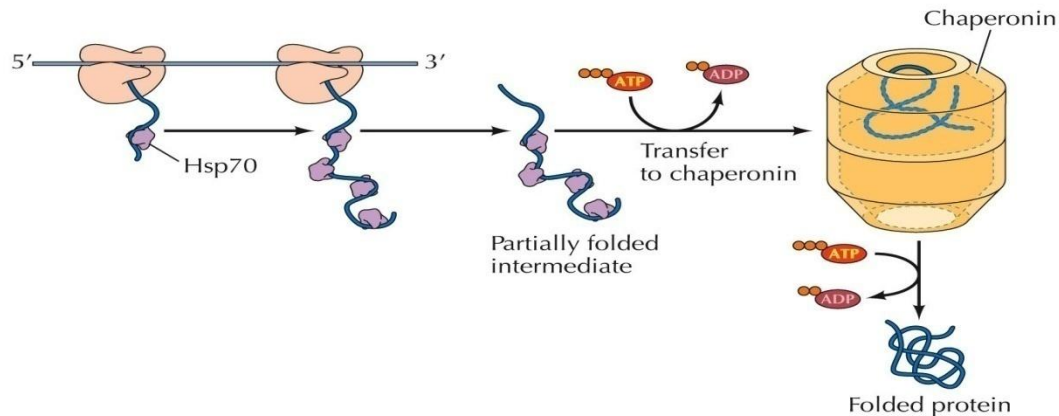
Fałdowanie i Modyfikacje białek

Klasyczna zasada dotycząca składania białek, mówi o tym, że w sekwencji aminokwasowej zawarta jest pełna informacja na temat trzeciorzędowej struktury białka ???

Molekularni opiekunowie – Białka opiekuńcze (chaperony)- pomagają w fałdowaniu białek

Wyróżniamy dwie podstawowe rodziny białek opiekuńczych uczestniczących w fałdowaniu białek: białka szoku cieplnego (ang.heat shock proteins) oraz chaperoniny

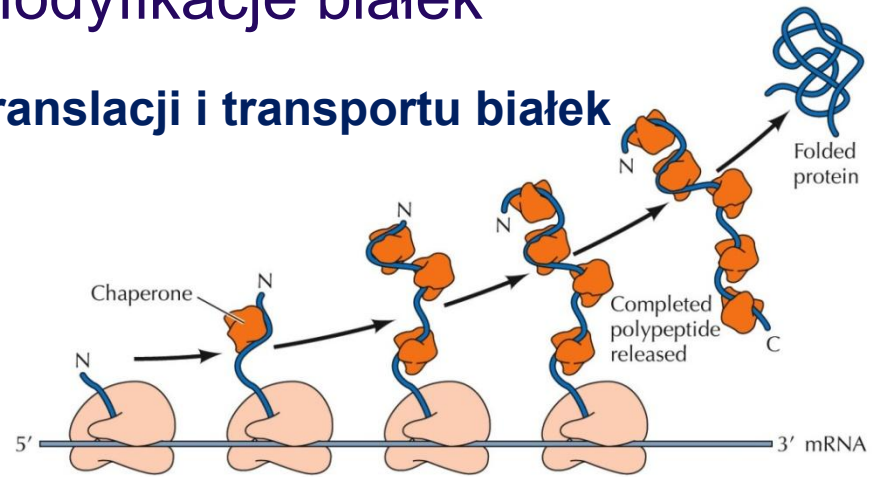
Niesfałdowany polipeptyd jest chroniony przez środowiskiem cytozolu wewnątrz chaperoniny



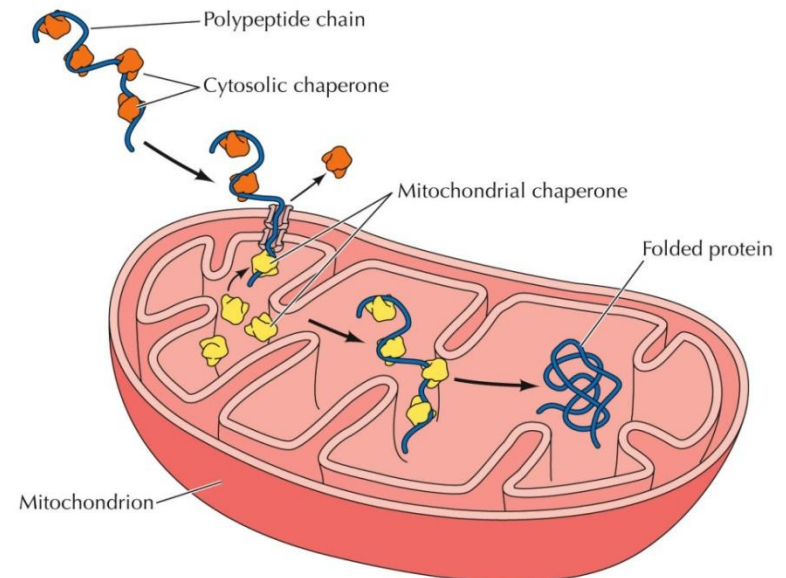
Fałdowanie i Modyfikacje białek

Funkcje białek opiekuńczych podczas translacji i transportu białek

Niektóre białka opiekuńcze wiążą się do powstającego polipeptydu w trakcie jego syntezy na rybosomach, w ten sposób **zapobiegają niewłaściwemu fałdowaniu białka lub powstawaniu agregatów** z części polipeptydu, który powstaje zanim synteza zostaje zakończona



THE CELL, Fourth Edition, Figure 8.21 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.



THE CELL, Fourth Edition, Figure 8.22 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Chaperony **stabilizują** niesfałdowane białka podczas ich transportu do docelowych organelli

Fałdowanie i Modyfikacje białek

- Mostki dwusiarczkowe wzmacniają strukturę białka, przyspieszają fałdowanie, pełnią również inne funkcje „regulacyjne”

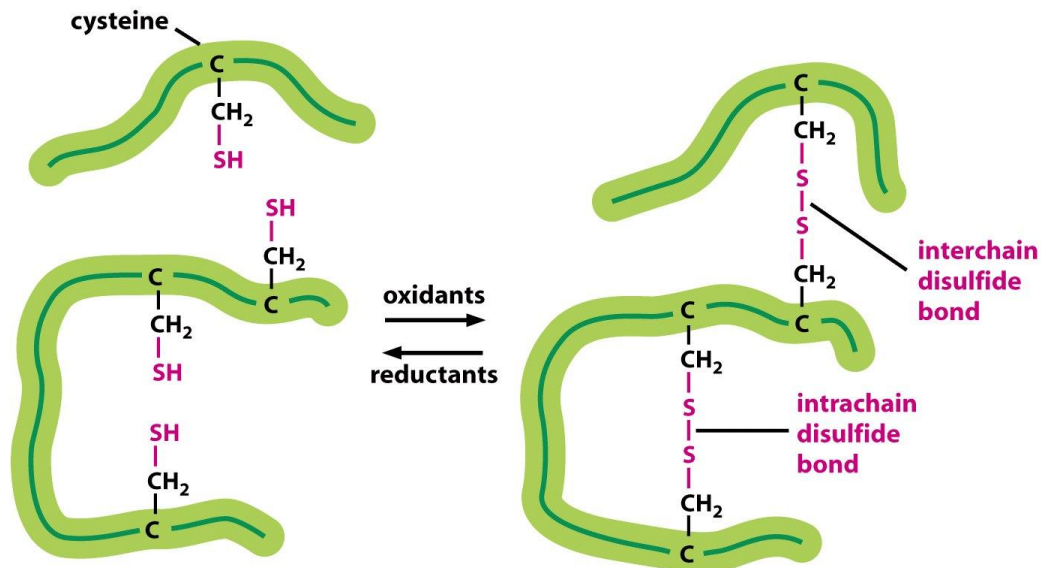
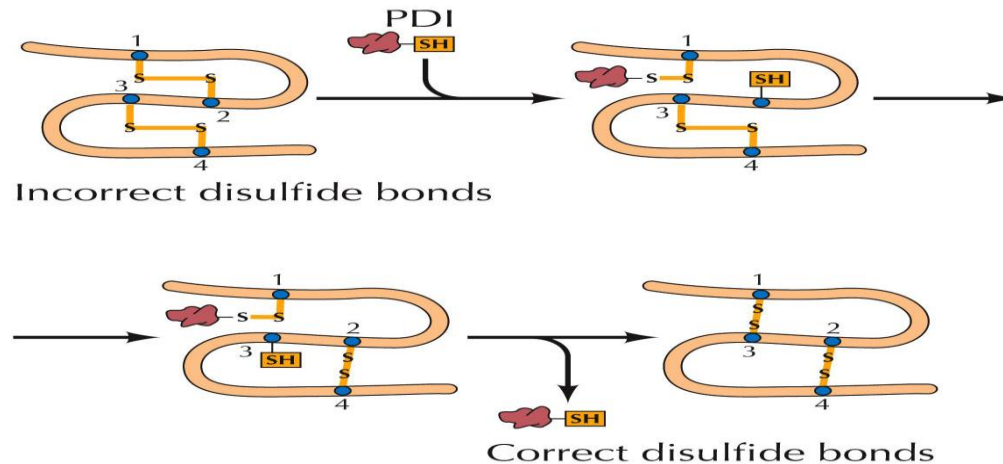


Figure 3-28 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Fałdowanie i Modyfikacje białek

Enzymy katalizujące fałdowanie białek – zwiększają tempo fałdowania cząsteczki białka

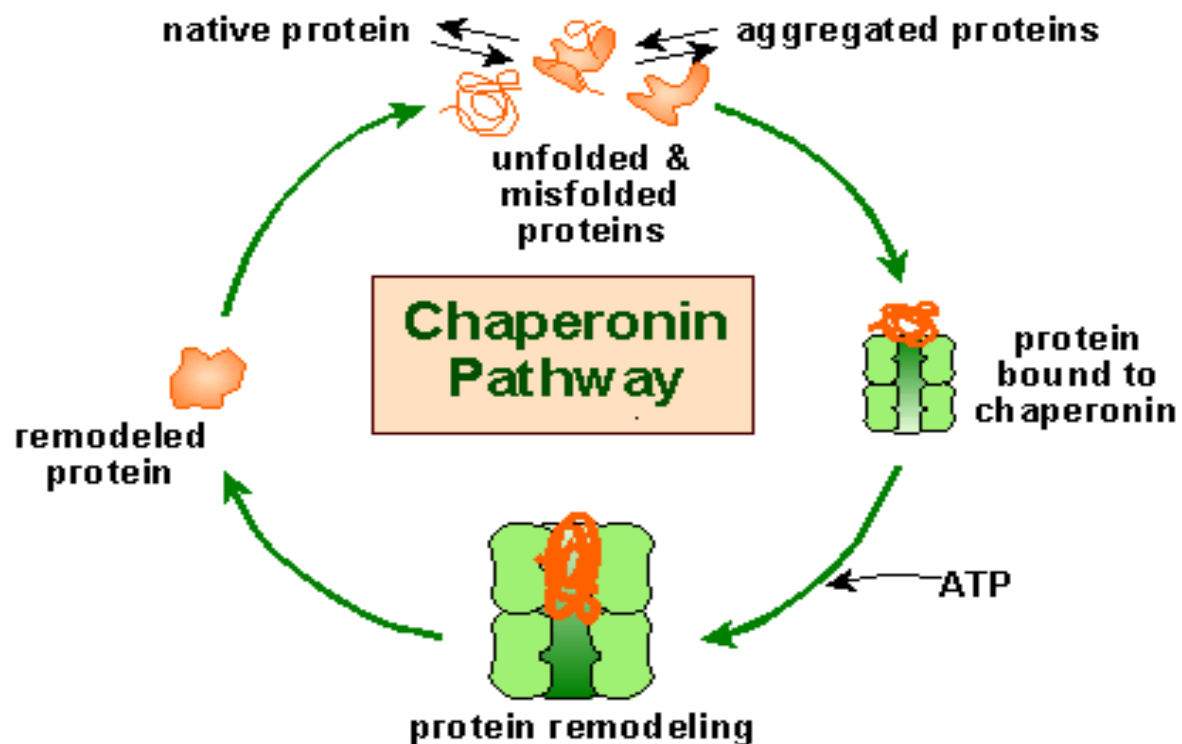
Disulfidoizomeraza białek PDI (Protein disulfide isomerase) katalizuje powstawanie mostków dwusiarczkowych i odgrywa ważną rolę, we właściwym ich formowaniu



THE CELL, Fourth Edition, Figure 8.24 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Izomeraza peptydylo-prolinowa (przyspiesza izomeryzację wiązań peptydowych X-prolina, które przyjmują konformację cis lub trans, niemal wszystkie pozostałe wiązania peptydowe są trans)

Protein folding, refolding, and degradation



Mutacje chaperonów i chaperonin we wrodzonych schorzeniach u człowieka

- **Syndrom McCusicka-Kaufmana - m.in.wrodzona wada serca**
- **Syndrom Bardet-Biedl - retinopatia, opóźnienie umysłowe, otyłość, dysfunkcja nerek**
- **Autosomalna recesywna ataksja Charlevoix-Saguenay - neuropatia motoryczna, atrofia mózdzku, hipermielinizacja siatkówki**
- **wrodzona katarakta**

Fałdowanie i Modyfikacje białek

- Nieprawidłowe fałdowanie może doprowadzić do utworzenia się nierozpuszczalnych agregatów i amyloidów.
- Choroby neurodegeneracyjne
- Priony i zaraźliwość (zakaźne gąbczaste encefalopatie)

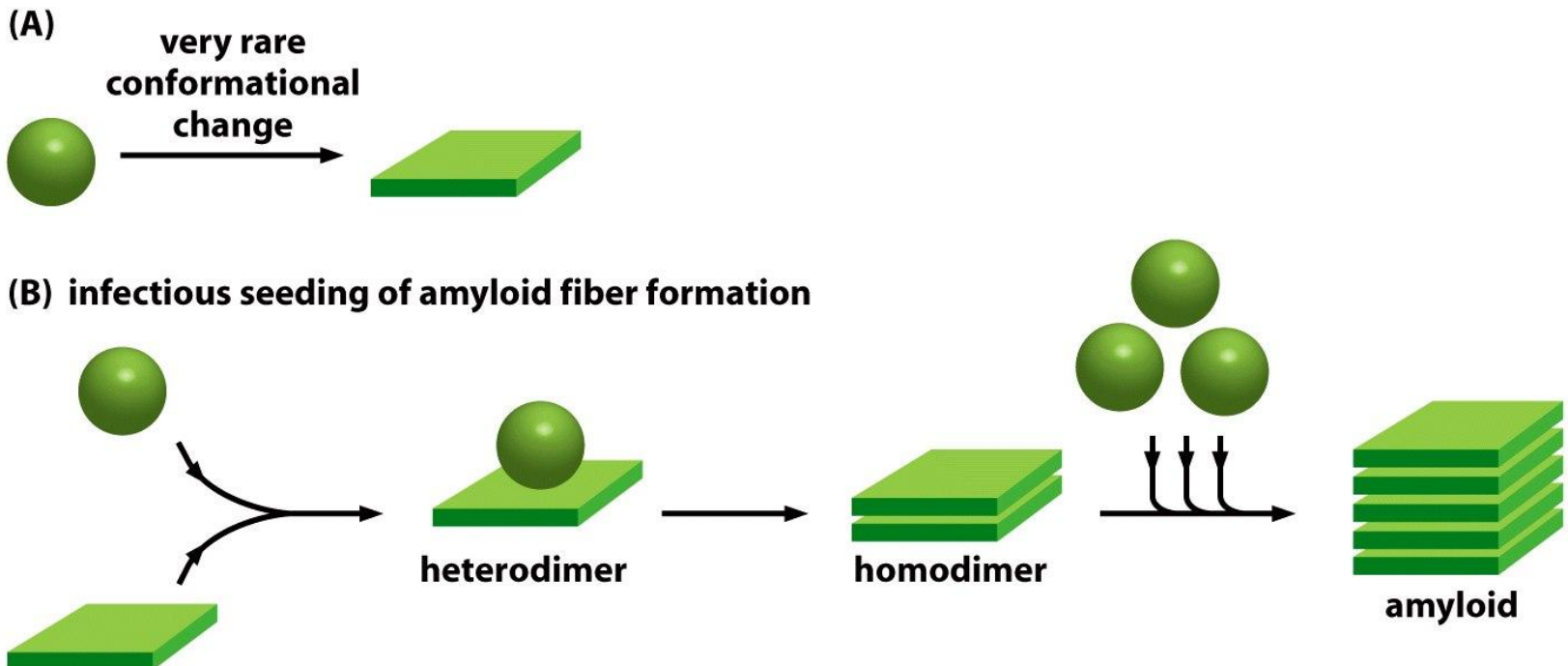


Figure 6-95ab Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Fałdowanie i Modyfikacje białek:

- Priony i zaraźliwość

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1997

Stanley B. Prusiner

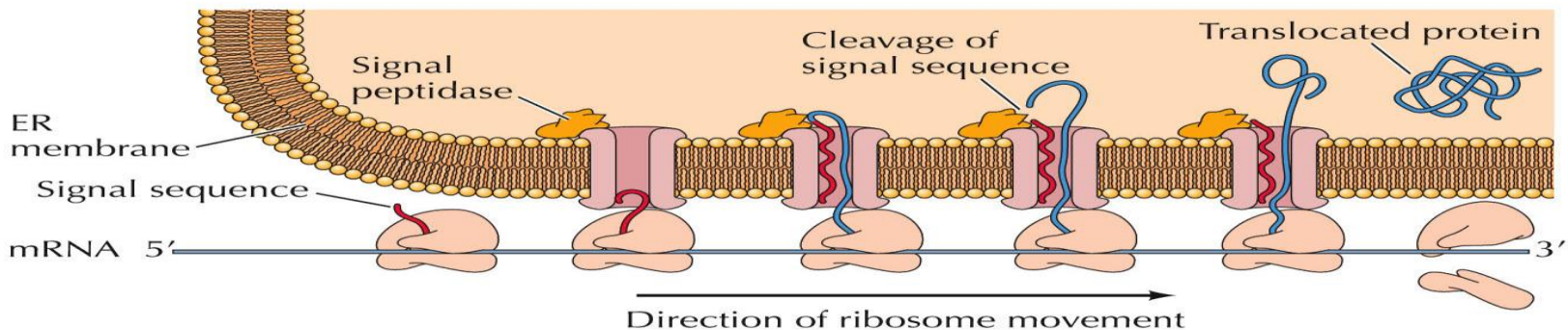
*"for his discovery of Prions –
a new biological principle of infection".*



Cięcie białek

Proteoliza jest ważnym etapem w dojrzewaniu wielu białek i wiąże się z cięciem łańcucha polipeptydowego

Sekwencje sygnałowe pozwalają na właściwą lokalizację białek w komórce, np. w retikulum endoplazmatycznym jeszcze w czasie trwania translacji



Cięcie białek

- Peptydazy sygnałowe należą do rodziny proteaz błonowych, które odcinają sekwencję sygnałową w czasie przechodzenia białka przez kanał błonowy podczas translacji
- Aktywne enzymy lub hormony, takie jak insulina powstają poprzez cięcie większych prekursorów

