

Translacja białek

Marta Koblowska
Zakład Biologii Systemów, UW

Etapy translacji (prokariota)

TABLE 27–5 Components Required for the Five Major Stages of Protein Synthesis in <i>E. coli</i>	
Stage	Essential components
1. Activation of amino acids	20 amino acids 20 aminoacyl-tRNA synthetases 32 or more tRNAs ATP Mg ²⁺
2. Initiation	mRNA N-Formylmethionyl-tRNA ^{fMet} Initiation codon in mRNA (AUG) 30S ribosomal subunit 50S ribosomal subunit Initiation factors (IF-1, IF-2, IF-3) GTP Mg ²⁺
3. Elongation	Functional 70S ribosome (initiation complex) Aminoacyl-tRNAs specified by codons Elongation factors (EF-Tu, EF-Ts, EF-G) GTP Mg ²⁺
4. Termination and ribosome recycling	Termination codon in mRNA Release factors (RF-1, RF-2, RF-3, RRF) EF-G IF-3
5. Folding and posttranslational processing	Specific enzymes, cofactors, and other components for removal of initiating residues and signal sequences, additional proteolytic processing, modification of terminal residues, and attachment of acetyl, phosphoryl, methyl, carboxyl, carbohydrate, or prosthetic groups

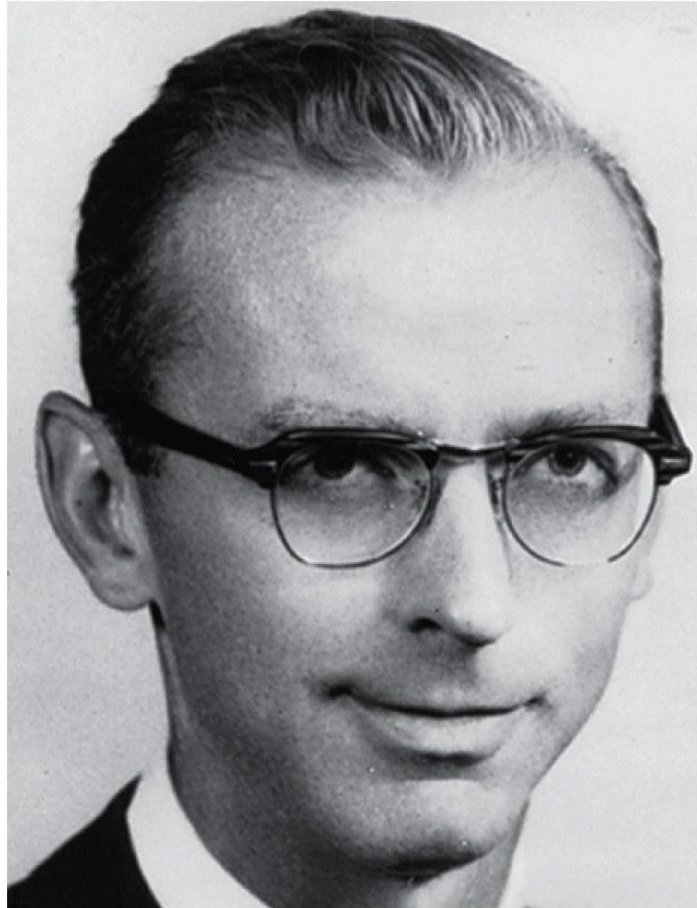
Table 27-5
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

Aktywacja aminokwasu

Aminokwasy nie posiadają powinowactwa do mRNA

tRNA – cząsteczka adaptorowa niezbędna do odczytywania sekwencji białka na podstawie matrycy mRNA

tRNA^{Gly1} tRNA^{Gly2} - izoakceptorowe tRNA rozpoznające glicynę



**Robert W. Holley,
1922–1993**

Unnumbered 27 p1080
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

tRNA

- Single chain contains 74-95 ribonucleotides
 - Many unusual bases
- **5' end** phosphorylated, usually **pG**
- **3' end** always **CCA**. Activated amino acid attached to 3'-OH of terminal adenosine
- About half of nucleotides in tRNA are base-paired to form double helices
 - 5 groups of bases not base-paired
 - the 3' *CCA terminal region*
 - the *TψC loop*
 - the *extra arm*
 - the *D arm*
 - the *anticodon loop*
- **Anticodon** loop has 7 bases
 - 5'-pyrimidine-U-X-Y-Z-modified purine variable base

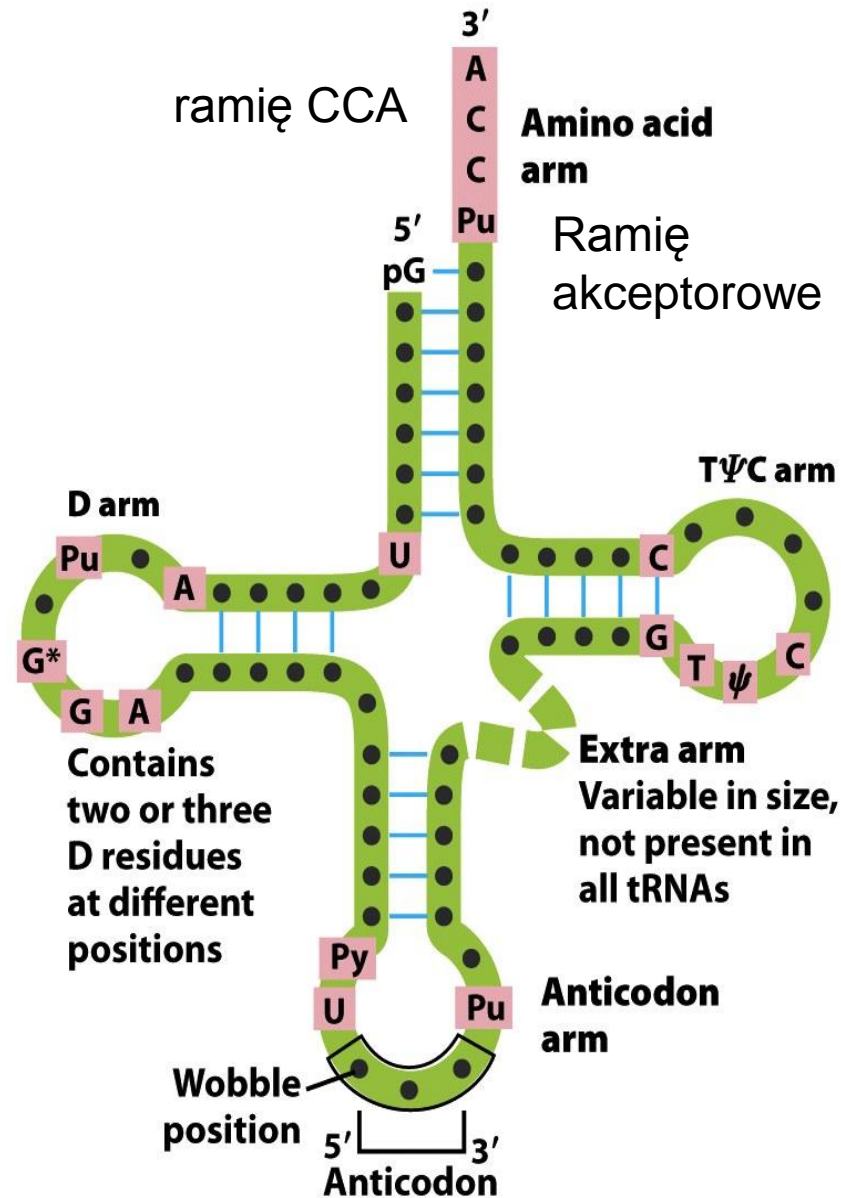


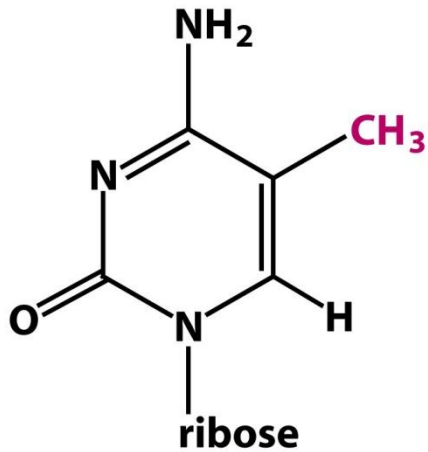
Figure 27-17

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

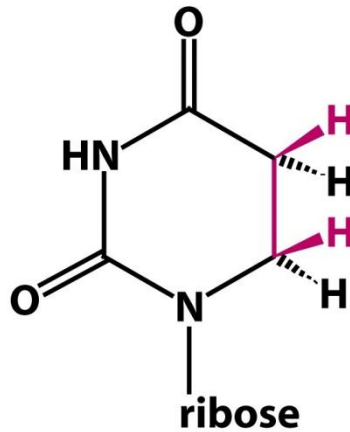
© 2008 W. H. Freeman and Company

Ramię antykodonowe

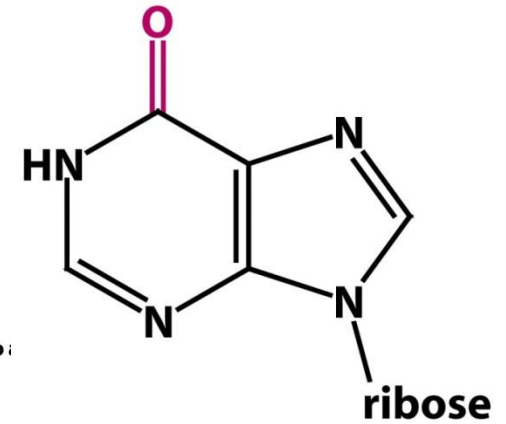
Nietypowe zasady w tRNA



5-Methylcytidine (mC)



Dihydrouridine (UH_2)



Inosine

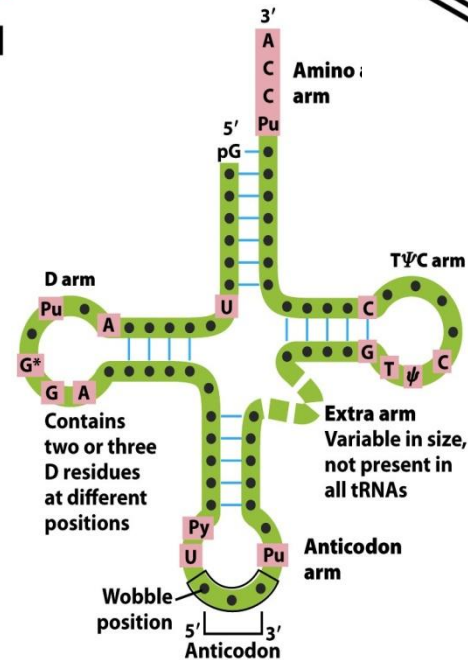
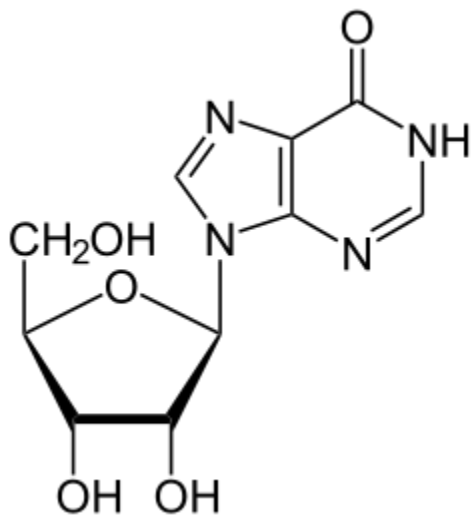
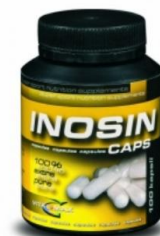


Figure 27-17
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company



Inozyna – nukleozyd purynowy zawierający hipoksantynę jako zasadę azotową.
Stanowi prekursor w biosyntezie AMP i GMP. Powstaje jako metabolit pośredni w rozkładzie adenozyiny



www.ateleta.pl

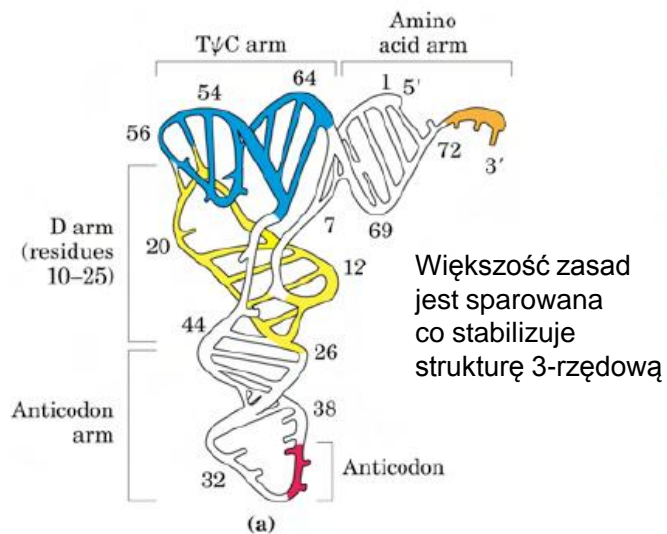
DIETETYCZNY ŚRODEK SPOŻYWCZY DLA SPORTOWCÓW I OSÓB
O WZMOŻONYM WYSIĘKU FIZYCZNYM

Inozyna to substancja zbudowana z hypoksantyny i rybozy. Jest znakomitym suplementem energetycznym mającym ogromny wpływ na jakość wysiłku fizycznego. Inozyna jest prekursorem ATP, które jest podstawowym źródłem energii w organizmie. Wzrost poziomu ATP powoduje możliwość wykonania dłuższego wysiłku i na wyższym poziomie treningowym. Inozyna powoduje wytworzenie natychmiastowej energii co jest szczególnie przydatne w sportach siłowych, wytrzymałościowych lub szybkościowych.

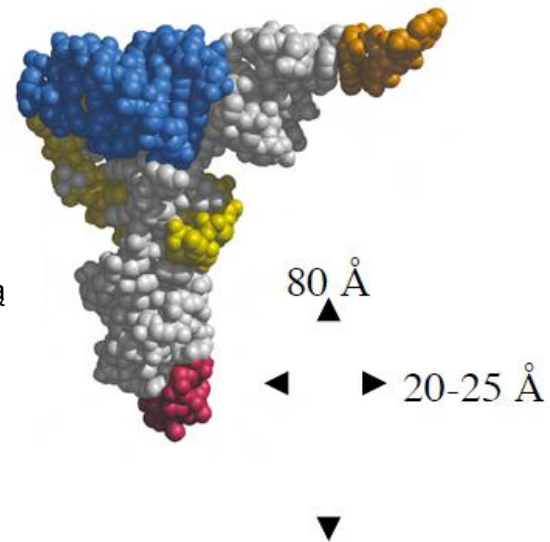
Inozyna Vitalmax charakteryzuje się najwyższą jakością i czystością komponentów.

Badana na II poziomie badań klinicznych w stwardnieniu rozsianym (MS) i chorobie Parkinsona.

Struktura drożdżowego tRNA^{Phe}



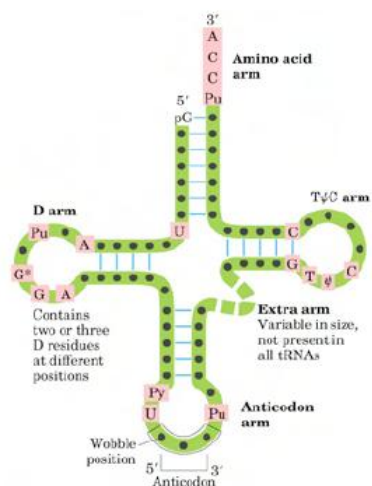
Dwuniciowe obszary tRNA przyjmują strukturę przypominającą małą i dużą bruzdę helisy DNA



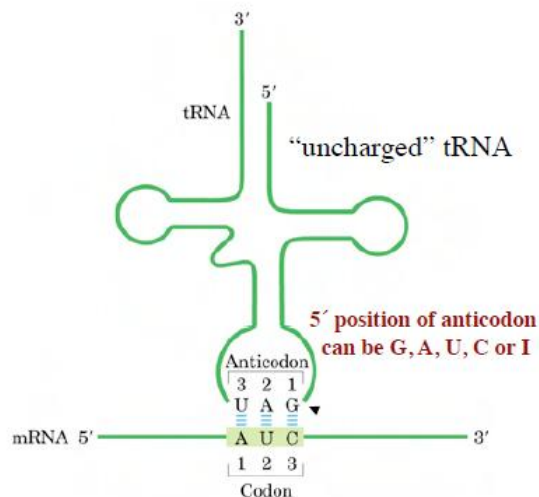
Wielkość 80 Å – wymagana, ponieważ centrum dekodujące małej podjednostki rybosomu i transferaza peptydylowa są o tyle odległe od siebie w rybosomie

Wielkość 20-25 Å – pozwala na związanie dwóch cząsteczek tRNA w centrum dekodującym rybosomu

tRNA – adaptorowe cząsteczki



D = dihydrouridine (common in tRNAs)
 TψC = invariant ribothymidine, pseudouridine, cytosine



„Hipoteza wahadła” (ang. wobble hypothesis)



How the Wobble Base of the Anticodon Determines the Number of Codons a tRNA Can Recognize*

1. One codon recognized:			
Anticodon	(3') X-Y-C (5')	(3') X-Y-A (5')	
Codon	(5') Y-X-G (3')	(5') Y-X-U (3')	
2. Two codons recognized:			
Anticodon	(3') X-Y-U (5')	(3') X-Y-G (5')	
Codon	(5') Y-X-A (3')	(5') Y-X-U (3')	
3. Three codons recognized:			
Anticodon	(3') X-Y-I (5')		
Codon	(5') Y-X-G (3')		

*X and Y denote complementary bases capable of strong Watson-Crick base pairing with each other. The bases in the wobble positions—the 3' position of codons and 5' position of anticodons—are shaded in red.

kodony

AUU	Ile
AUC	Ile
AUA	Ile
AUG	Met

5'-IAU-3' Rozpoznaje wszystkie 3 kodony dla Isoleucyny

The Wobble Hypothesis - Hipoteza wahadła

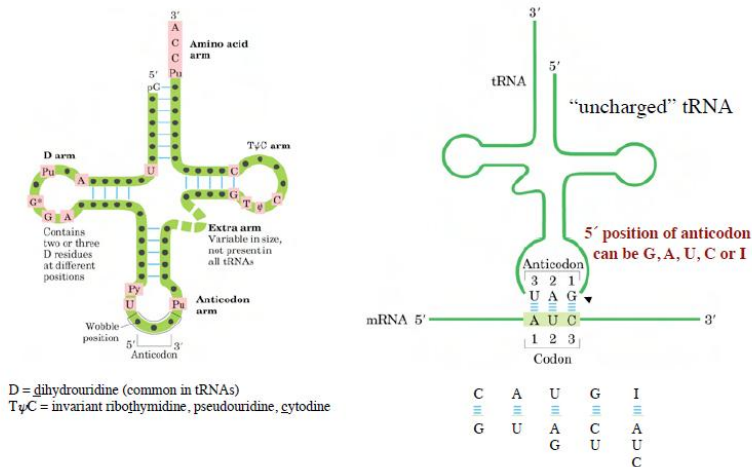
- Hipoteza ogólna

- Każda z zasad kodonu tworzy wiązanie typu Watson–Crick z komplementarną zasadą antykodonu w tRNA
- Dany antykodon rozpoznaje tylko jeden kodon.

- Hipoteza Crick's Wobble

Niektóre tRNA mogą rozpoznawać więcej niż jeden kodon

- Dwie pierwsze zasady kodonu są takie same, trzecia jest inna.



The Wobble Hypothesis - Hipoteza wahadła

- Dwie pierwsze zasady kodonu „parują” standardowo - rozpoznanie jest precyzyjne
- Na pozycji trzeciej obowiązuje mniej ścisła zasada parowania i mogą się tworzyć pary „niekanoniczne”.
- Pierwsza zasada antykodonu determinuje czy dany tRNA czyta jeden, dwa lub trzy rodzaje kodonów: C lub A (1 kodon), U lub G (2 kodony) lub I (3 kodony).



How the Wobble Base of the Anticodon Determines the Number of Codons a tRNA Can Recognize*

1. One codon recognized:	Anticodon	(3') X-Y-C (5')	(3') X-Y-A (5')
	Codon	(5') Y-X-G (3')	(5') Y-X-U (3')
2. Two codons recognized:	Anticodon	(3') X-Y-U (5')	(3') X-Y-G (5')
	Codon	(5') Y-X-A (3')	(5') Y-X-C (3')
3. Three codons recognized:	Anticodon	(3') X-Y-I (5')	
	Codon	(5') Y-X-U (3')	

*X and Y denote complementary bases capable of strong Watson-Crick base pairing with each other. The bases in the wobble positions—the 3' position of codons and 5' position of anticodons—are shaded in red.

Table 30.2 Allowed pairings at the third base of the codon according to the wobble hypothesis

First base of anticodon	Third base of codon
C	G
A	U
U	A or G
G	U or C
I	U, C, or A

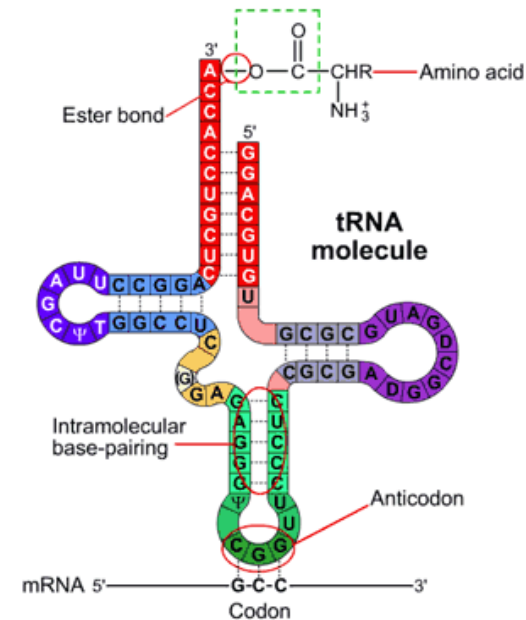
Table 30.2
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

- Zaleta systemu wahadła: dysocjacja tRNA z mRNA oraz synteza białka jest szybsza.

Translacja

tRNA jest cząsteczką adaptorową, aminokwas przyłączany jest do tRNA w dwuetapowej reakcji aminoacylacji

- Miejsce przyłączenia aminokwasu
 - Przenosi specyficzny aminokwas do miejsca syntezy białka
 - Grupa karboksylowa tego aminokwasu ulega reakcji estryfikacji z grupą hydroksylową 3' lub 2' rybozy na 3' końcu łańcucha tRNA.
 - Tworzy się aminoacyl-tRNA
- Miejsce rozpoznawania matrycy mRNA
 - Sekwencja 3 zasad nazywana jest antykodonem

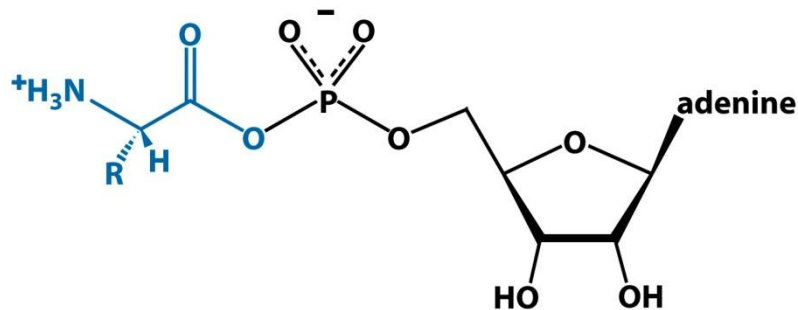


Produkt aminoacylacji

Aktywacja aminokwasu

Aminoacylo-tRNA powstaje w 2 etapach

1. Formowanie aminoacyloadenylnu



2. Przyłączenie grupy aminoacylowej do cząsteczki właściwego tRNA



Aminoacylacja tRNA – etap 2

Przeniesienie grupy aminoacylowej aminoacylo-AMP na cząsteczkę tRNA z utworzeniem aminoacylo-tRNA

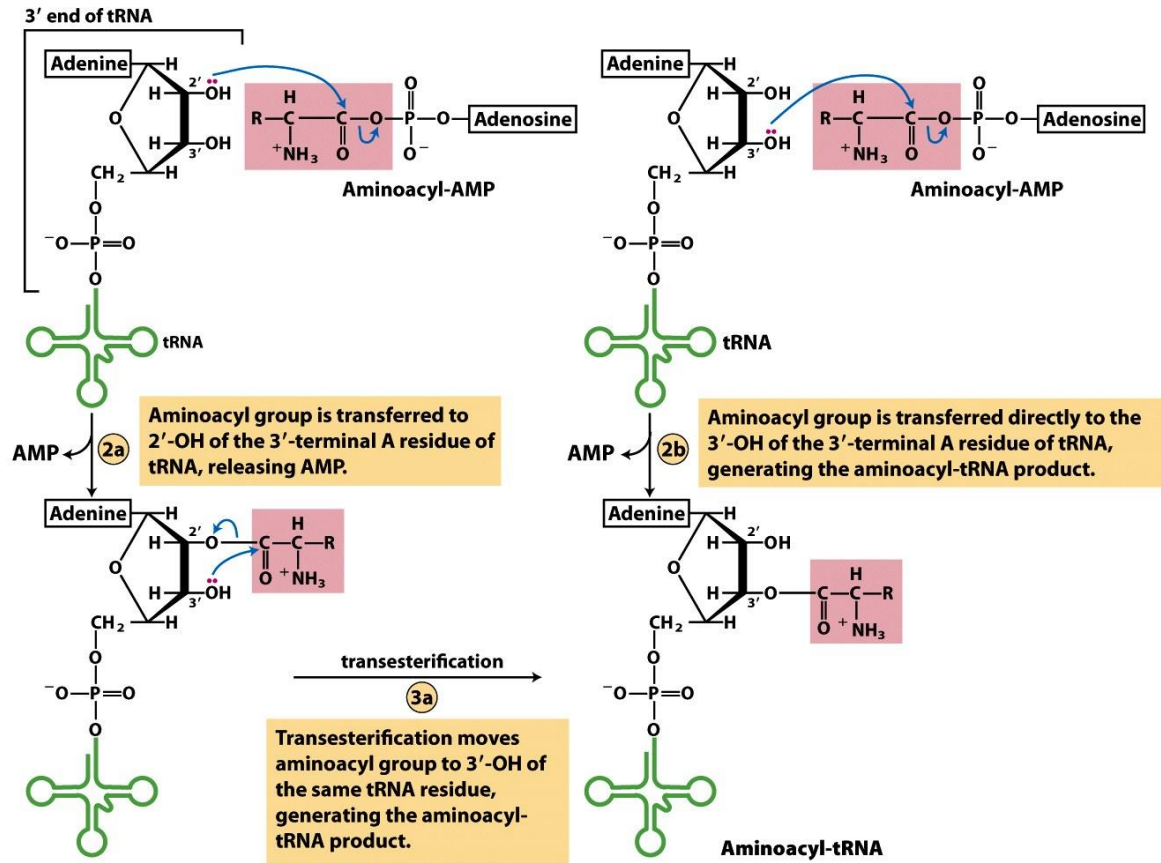


Figure 27-19 part 2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Reakcja aktywacji i przeniesienia aminokwasu jest katalizowana przez tę samą syntetazę aminoacylo-tRNA

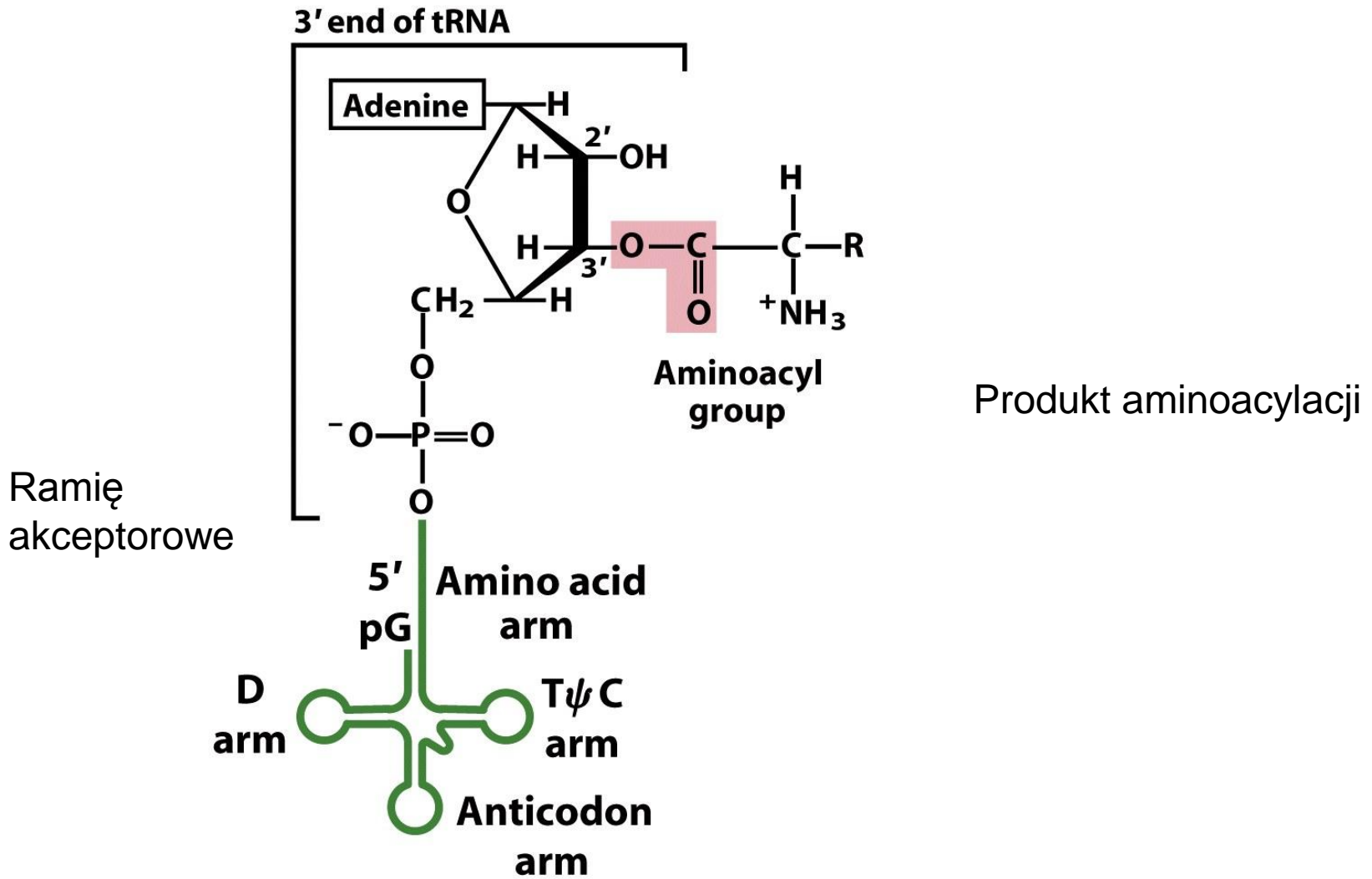


Figure 27-20
 Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

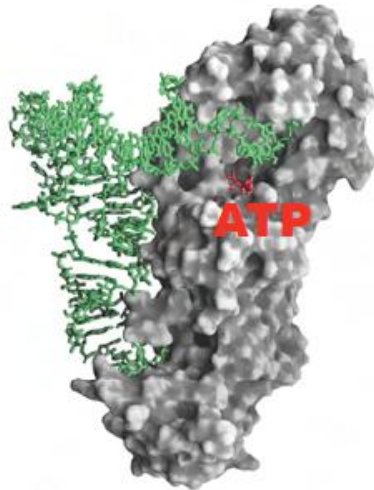
Dwie klasy syntetaz aminoacylo-tRNA:

- Klasa I - enzym aminoacyluje grupę 2'-OH tRNA
- Klasa II - enzym aminoacyluje grupę 3'-OH tRNA

Enzymy każdej z klas wiążąc ATP przybierają odmienną konformację.

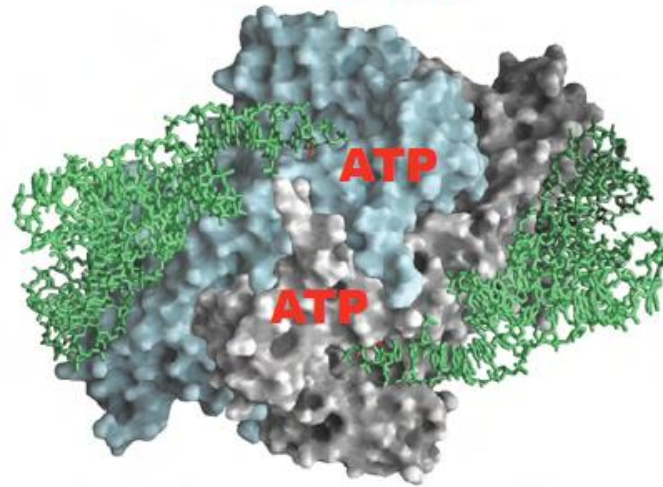
Syntetazy aminoacylo-tRNA przyłączają aminokwas do tRNA

Class I



- E. coli* Gln-tRNA synthetase
- mostly monomeric
 - **anti-codon recognition**
 - usually bind on minor groove side

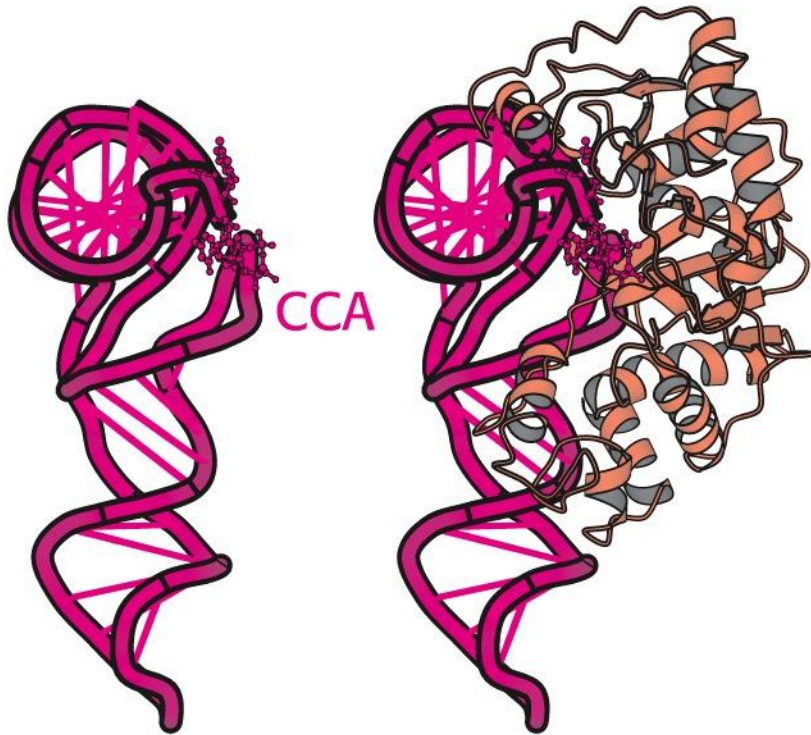
Class II



- S. cerevisiae* Asp-tRNA synthetase
- mostly dimeric (also oligomeric)
 - **no anti-codon recognition**
 - usually bind on major groove side

Każda z klas (I i II) syntetaz tRNA rozpoznaje inną płaszczyznę cząsteczki tRNA.
Ramię CCA tRNA przyjmuje różną konformację w kompleksie z każdą z dwóch klas syntetaz.

CLASS I



tRNA

Complex

CLASS II



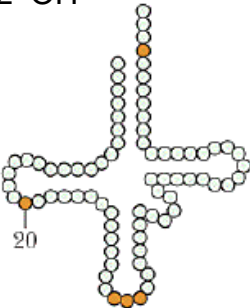
tRNA

Complex

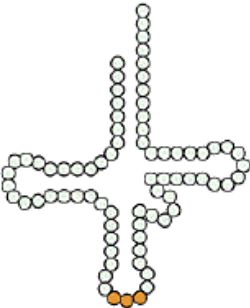
Syntetazy aminoacylo-tRNA odczytują kod genetyczny

It aminoacylates at the 2'-OH

Class I



tRNA^{Phe} (yeast)

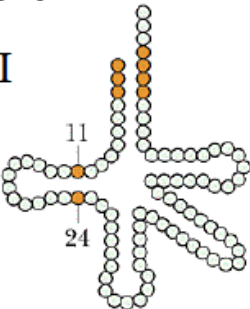


tRNA_F^{Met}

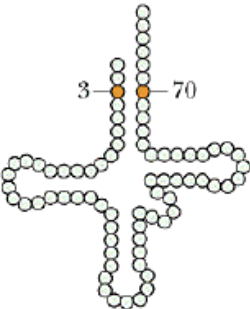
tRNA synthetases have great structural diversity and recognize subelements of target tRNAs

It aminoacylates at the 3'-OH

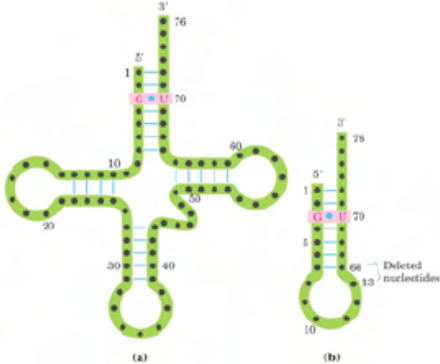
Class II



tRNA^{Ser}



tRNA^{Ala}



too short to reach peptidyl site

Threonyl-tRNA synthetase complex

Syntetazy rozpoznają dwa miejsca w tRNA:

- pętlę antykodonu
- ramie akceptorowe (CCA)

Jedyny enzym, który „zna” kod genetyczny

Dokładne rozpoznanie określonego tRNA oraz precyzyjny wybór pasującego aminokwasu przez aminoacyl-tRNA syntetazy jest kluczowe dla wysokiej wierności procesu syntezy białka

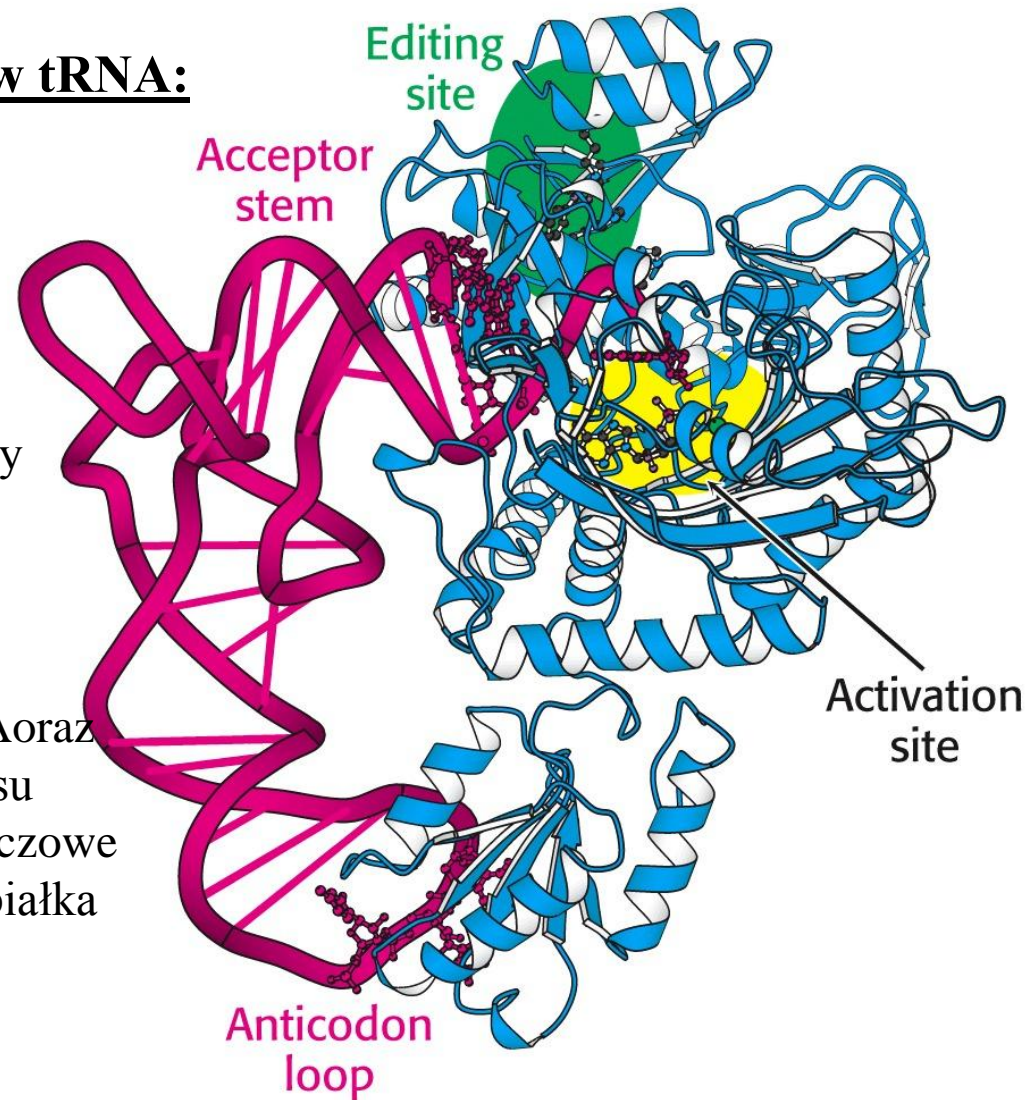


TABLE 27–7**The Two Classes of Aminoacyl-tRNA Synthetases**

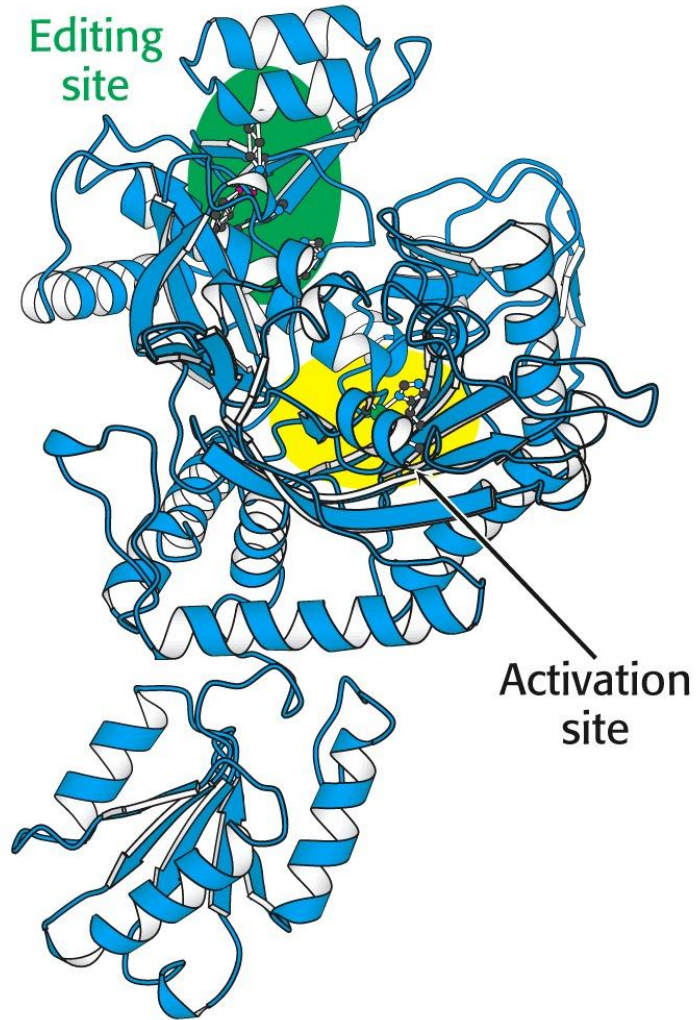
Class I		Class II	
Arg	Leu	Ala	Lys
Cys	Met	Asn	Phe
Gln	Trp	Asp	Pro
Glu	Tyr	Gly	Ser
Ile	Val	His	Thr

Note: Here, Arg represents arginyl-tRNA synthetase, and so forth. The classification applies to all organisms for which tRNA synthetases have been analyzed and is based on protein structural distinctions and on the mechanistic distinction outlined in Figure 27–19.

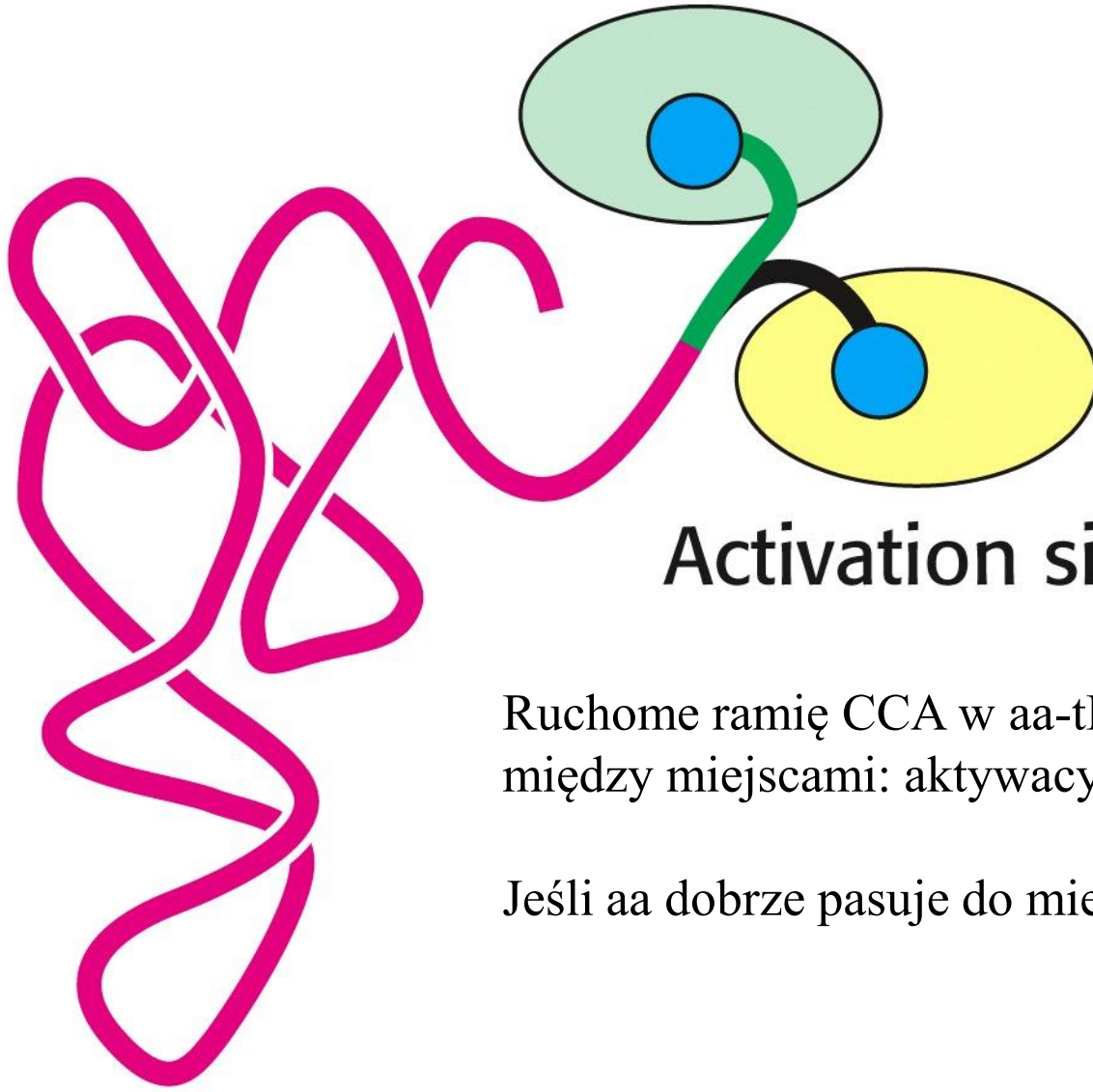
Właściwości syntetaz aminoacyl-tRNA

- aminoacyl-tRNA syntetazy są enzymami o bardzo dużej specyficzności
- **Jak osiągnięta jest tak wysoka specyficzność?**
 - Interakcja między strukturą aa a przypisanym mu enzymem
- Miejsce aktywacyjne enzymu rozpoznaje określony aminokwas
- Enzym ma także miejsce korekcyjne „proofreading” (editing site)

Zdolność do korekty „proofreading” przez aminoacyl-tRNA syntetazy podnosi wierność syntezy białka



Editing site



Activation site

Ruchome ramię CCA w aa-tRNA może przenosić aa między miejscami: aktywacyjnym i edytującym.

Jeśli aa dobrze pasuje do miejsca edycji jest **USUWANY!**

Podsumowanie aktywacji aminokwasu

tRNA – cząsteczka adaptorowa utrzymuje aminokwas w określonej odległości w stosunku do antykodonu (~80 Å)

tRNA jest „naładowany” przez syntetazy aminoacylo-tRNA , które używają lub nie antykodonu do rozpoznania właściwego tRNA

Klasy I i II syntetaz dołączają aminokwas odpowiednio do grupy 2' i 3' hydroksylowej rybozy tRNA

Do utworzenia aminoacylo-tRNA zostaje wykorzystana energia zmagazynowana w wysokoenergetycznych wiązaniach fosforanowych

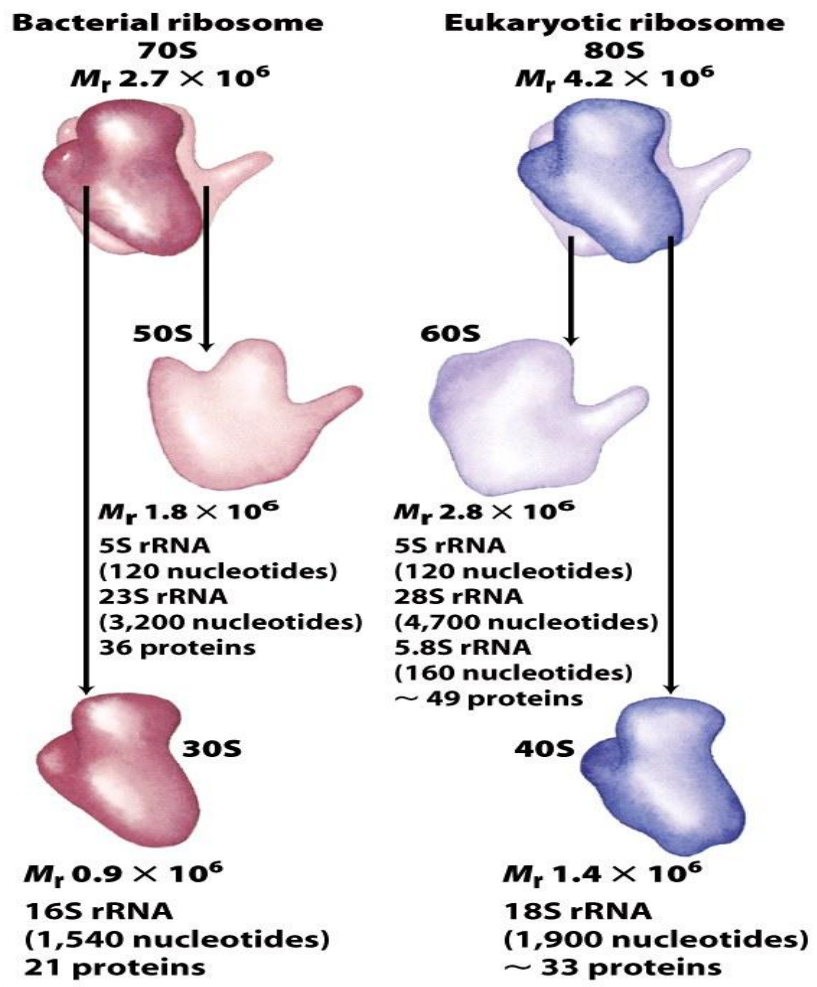
Synteza białka u eukariontów jest bardzo podobna do syntezy bakteryjnej.

Translacja jest procesem silnie konserwowanym ewolucyjnie.

W translacji eukariotycznej bierze udział zdecydowanie większa liczba białek niż u prokariotów.

Różnice

1. Rybosomy eukariotyczne - duża podjednostka 60S, mała podjednostka 40S



Rybosomy stanowią ~25% masy komórkowej

Figure 27-15
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

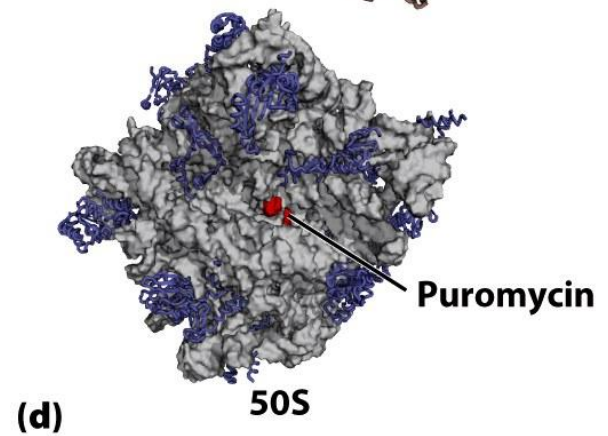
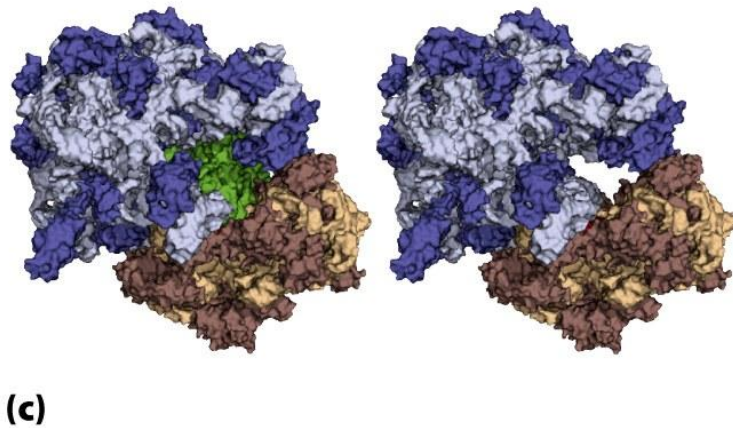
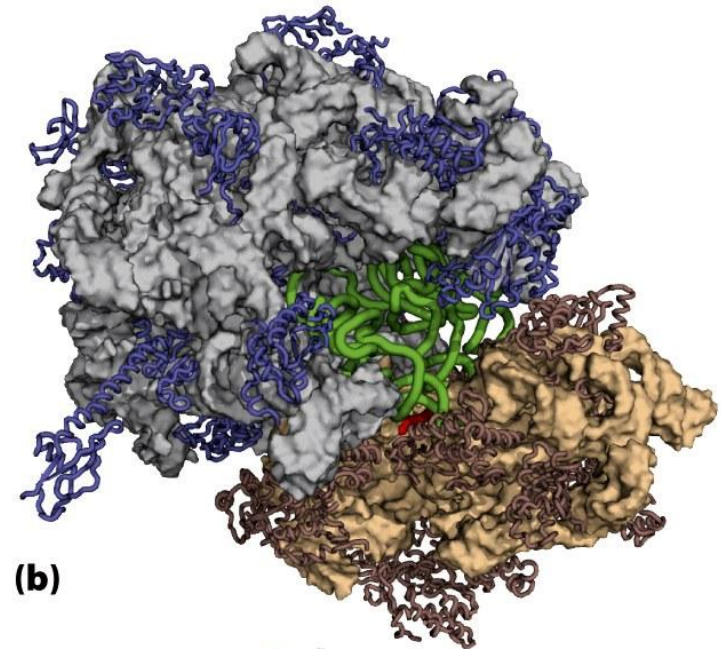
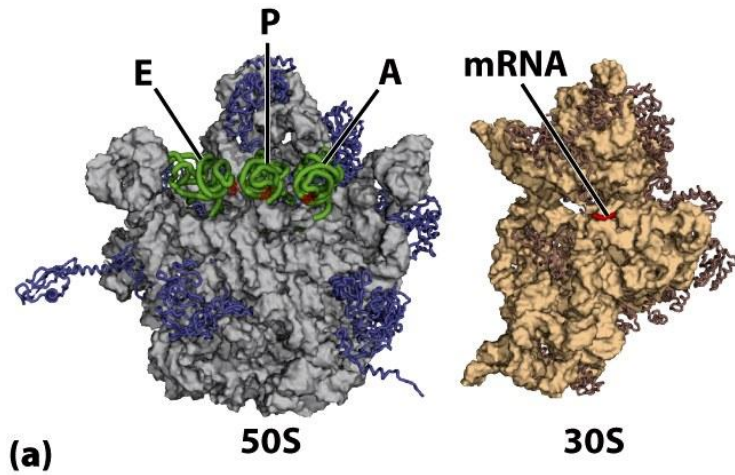
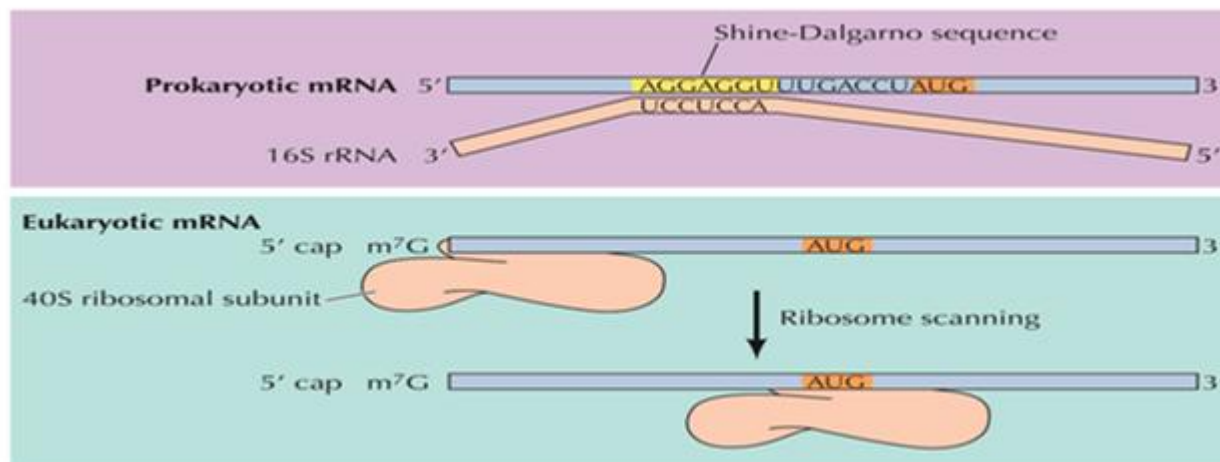


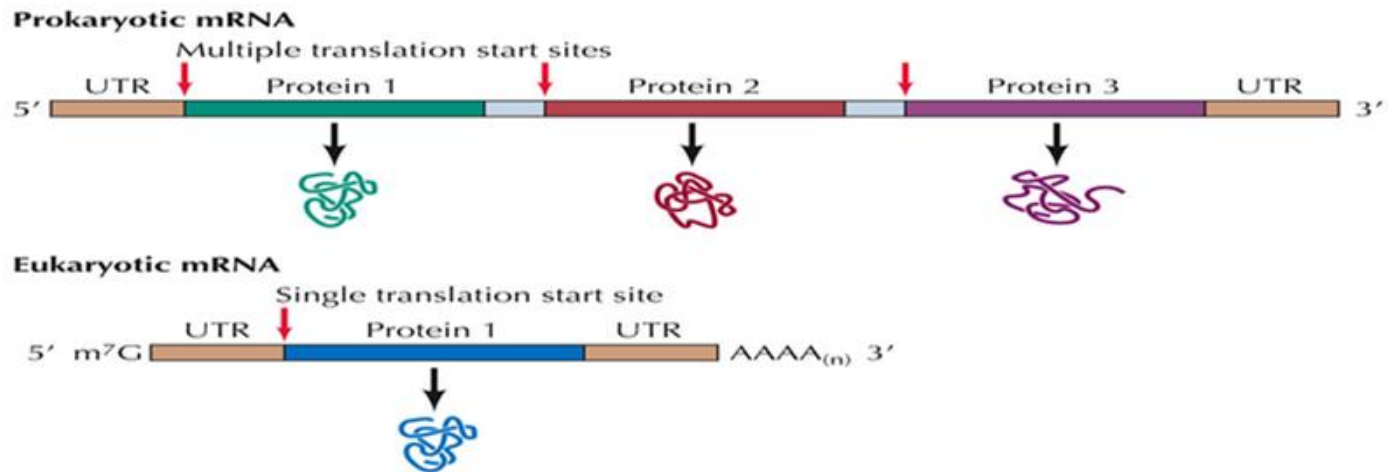
Figure 27-13
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W.H. Freeman and Company

1. Inicjatorowy tRNA – aminokwasem rozpoczynającym syntezę białka jest metionina, u prokariotów to N-formylmetionina. Inicjatorowy aminoacylo-tRNA nazywa się Met-tRNA_i;
3. Inicjacja - Zawsze AUG (metionina) u eukariotów, u prokariotów 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



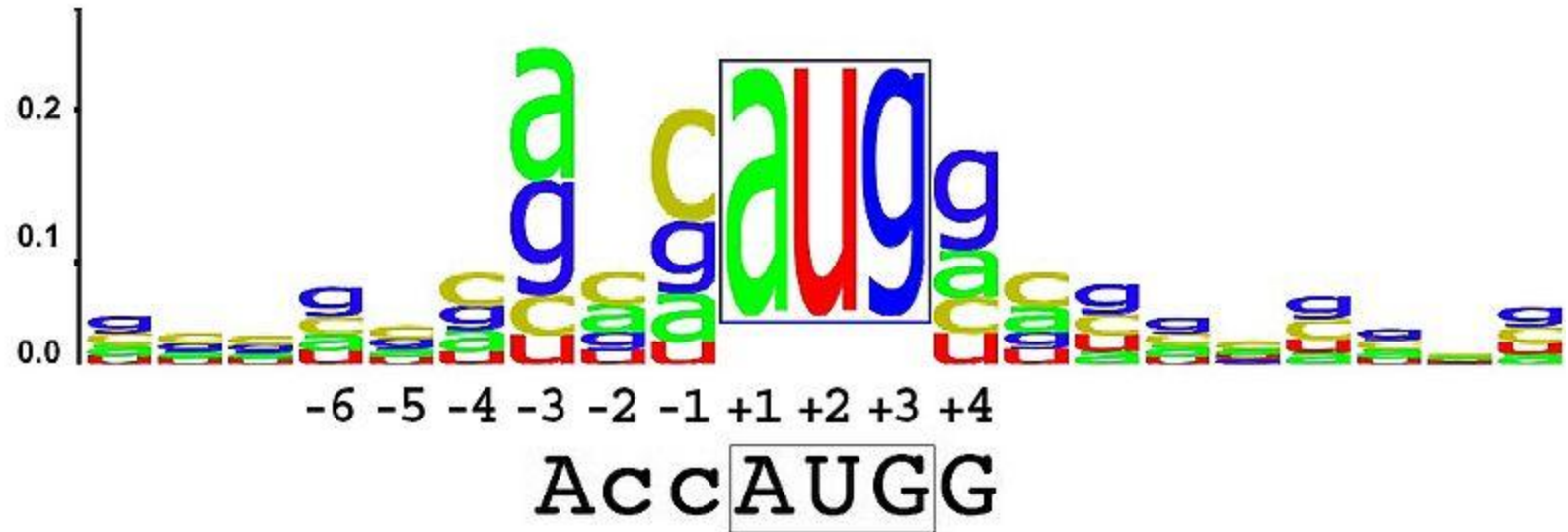
Inicjacja – większa liczba czynników inicjujących eIF – eukaryotic initiation factor

table 27-9

Protein Factors Required for Initiation of Translation in Bacterial and Eukaryotic Cells	
Bacterial	
Factor	Function
IF-1	Prevents premature binding of tRNAs to A site
IF-2	Facilitates binding of fMet-tRNA ^{fMet} to 30S ribosomal subunit
IF-3	Binds to 30S subunit; prevents premature association of 50S subunit; enhances specificity of P site for fMet-tRNA ^{fMet}
Eukaryotic	
Factor ^a	Function
eIF2	Facilitates binding of initiating Met-tRNA ^{Met} to 40S ribosomal subunit
eIF2B, eIF3	First factors to bind 40S subunit; facilitate subsequent steps
eIF4A	RNA helicase activity removes secondary structure in the mRNA to permit binding to 40S subunit; part of the eIF4F complex
eIF4B	Binds to mRNA; facilitates scanning of mRNA to locate the first AUG
eIF4E	Binds to the 5' cap of mRNA; part of the eIF4F complex
eIF4G	Binds to eIF4E and to poly(A) binding protein (PAB); part of the eIF4F complex
eIF5	Promotes dissociation of several other initiation factors from 40S subunit as a prelude to association of 60S subunit to form 80S initiation complex
eIF6	Facilitates dissociation of inactive 80S ribosome into 40S and 60S subunits

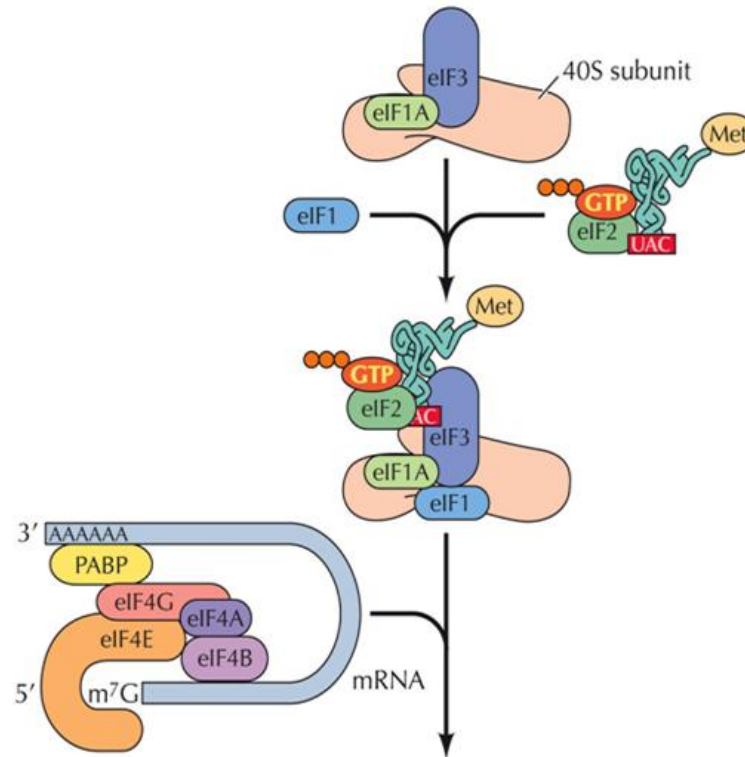
^aThe prefix "e" identifies these as eukaryotic factors.

Sekwencja Kozak, właściwe otoczenie dla AUG - ACCAUGGA



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

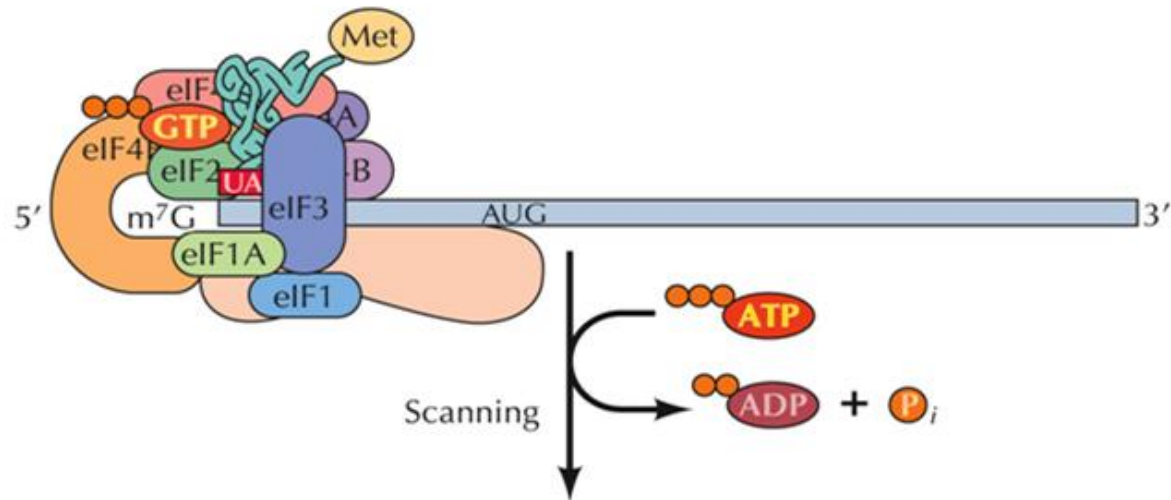
1. Inicjacja translacji – komórka eukariotyczna



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

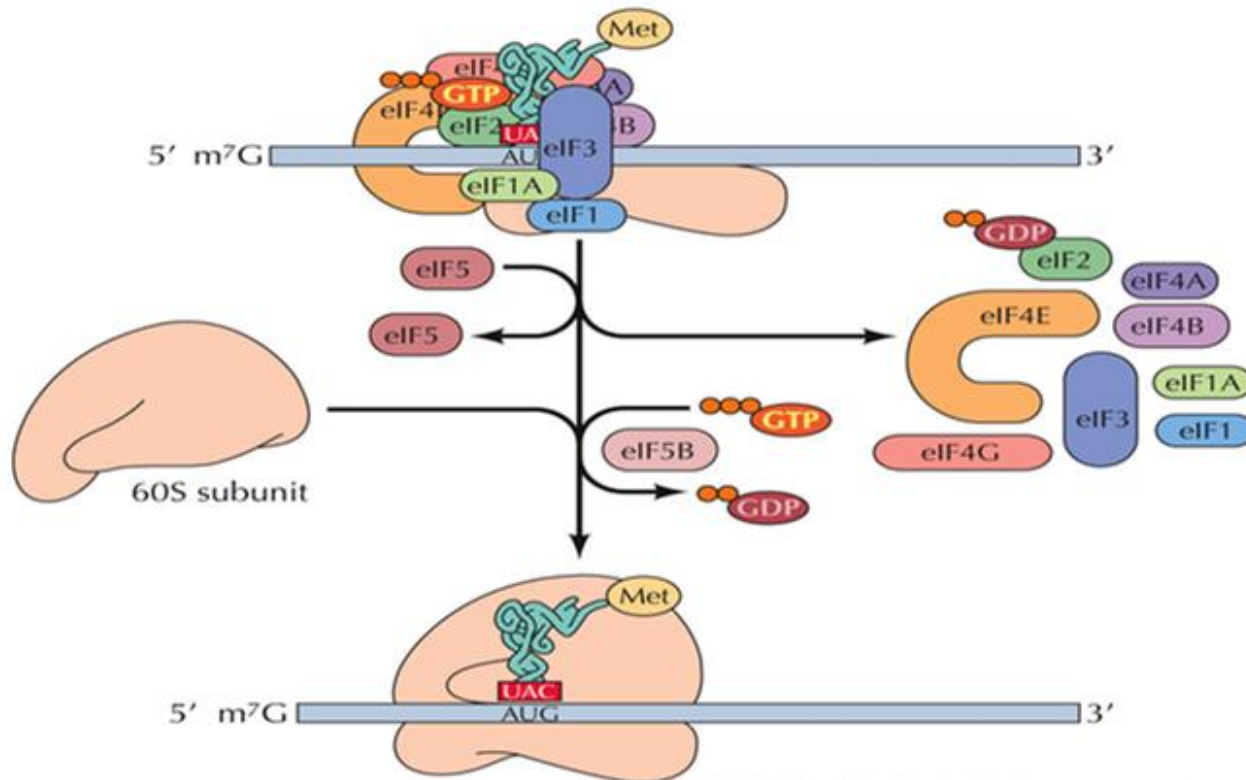
2. Inicjacja translacji – komórka eukariotyczna



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

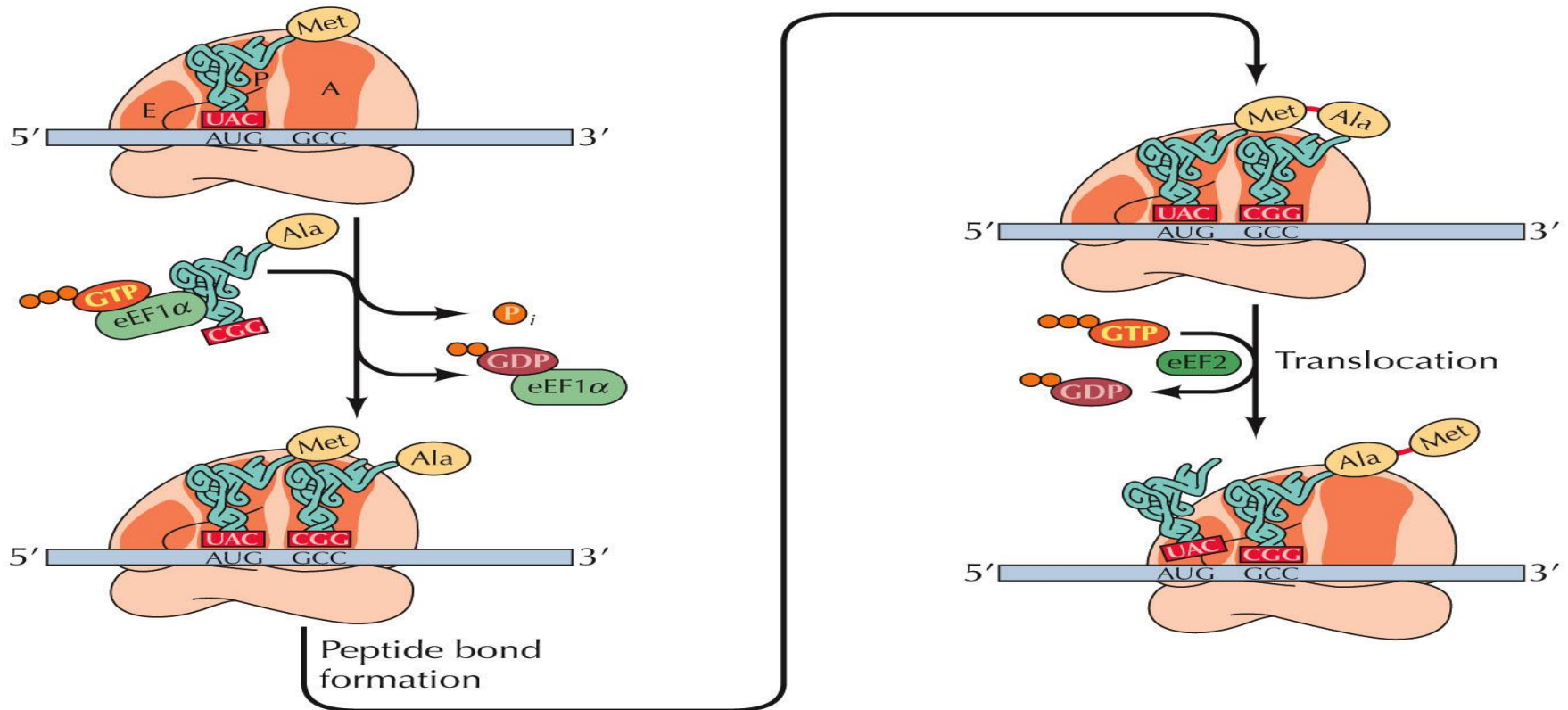


THE CELL, Fourth Edition, Figure 8.11 (Part 3) © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

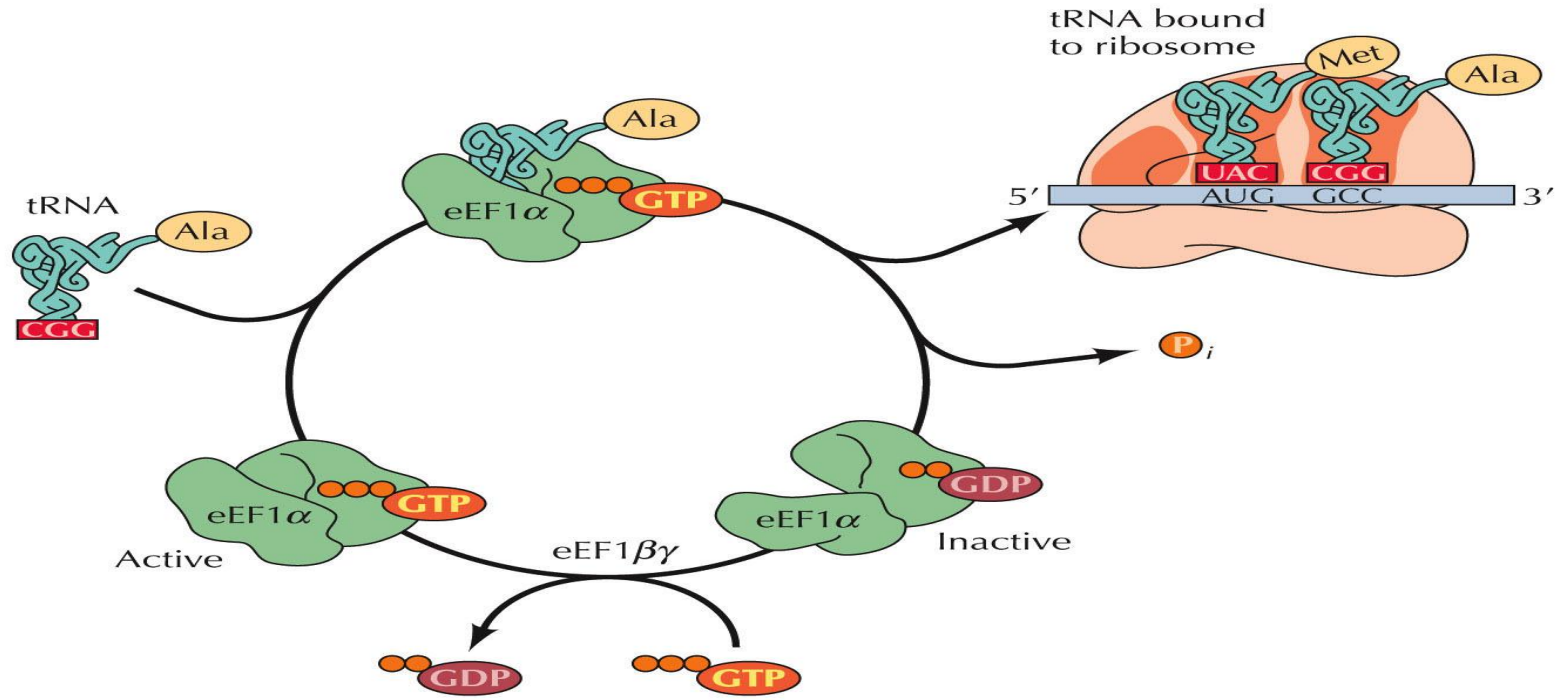
eIF5 inicjuje hydrolizę GTP przyłączonego do eIF2, utrata grupy fosforanowej powoduje uwolnienie wszystkich czynników związanych z GDP to jest sygnałem do związania podjednostki 60S rybosomu z 40S powstanie kompleksu rybosomalnego inicjacyjnego 80S rozpoczyna etap elongacji translacji

Czynniki elongacyjne występują w kompleksie z GTP i dostarczają aminoacylo-tRNA do rybosomów

Kolejnym etapem elongacji jest translokacja, która wymaga kolejnego czynnika elongacyjnego i wiąże się z hydrolizą GTP



W trakcie elongacji czynniki eEF1 α i EF-Tu, które są uwalniane z rybosomu i związane są z GDP, aby stać się aktywne muszą ponownie związać się z GTP



Tworzy się wiązanie peptydowe między dwoma aminokwasami.

1992 - Harry Noller odkrył, że wiązanie to jest tworzone przy pomocy 23S rRNA (peptydylotransferaza) u prokariota. U eukariota – 28S rRNA

Rybosom jest rybozymem

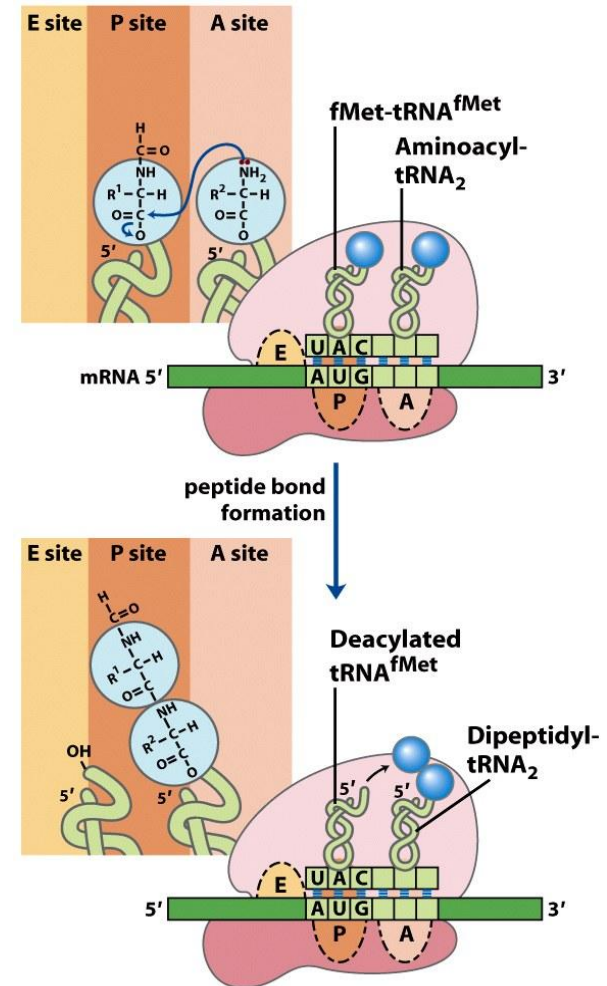


Figure 27-29
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Etap translacji

- Rybosom przesuwa się o jeden kodon w kierunku 3' końca mRNA
 - Energia pochodzi z hydrolizy GTP związanego z translokazą - EF-G
- Ruch rybosomu przesuwa dipeptidyl-tRNA z miejsca A na miejsce P
 - deacylowany-tRNA jest wypychane do cytoplazmy
- This goes on and on. The ribosome moves from codon to codon along the mRNA toward 3' end, adding one amino acid residue at a time UNTIL.....

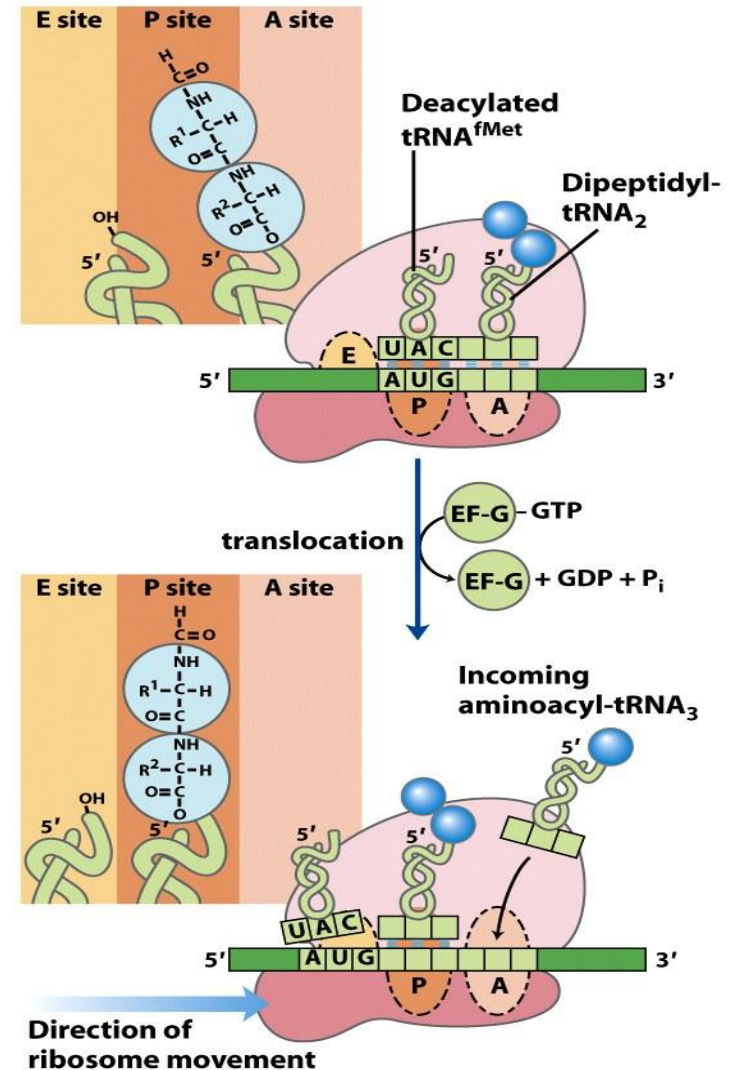


Figure 27-30a

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

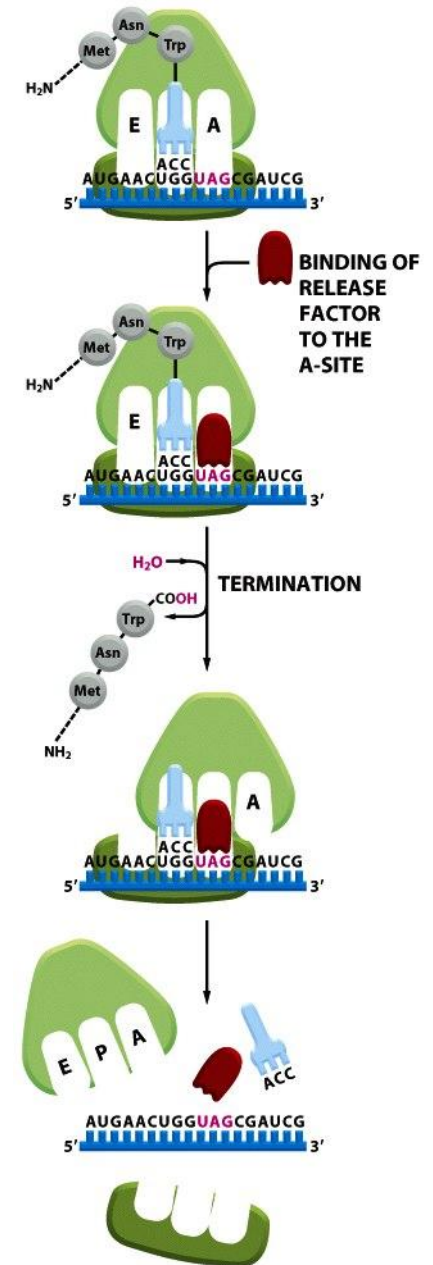
Terminacja

Terminację sygnalizuje jeden z kodonów STOP.

- UAA
- AUG
- UGA

U bakterii są 3 czynniki uwalniające:
RF1, RF2, RF3

U eukariota jeden eRF rozpoznaje wszystkie 3 kodony terminacyjne



Białka syntetyzowane są przez sukcesywne przyłączanie aminokwasów do końca karboksylowego rosnącego łańcucha polipeptydowego

- w 1963 roku Howarth Dintzis pokazał, że białka syntetyzowane są od N-końca
- Hemoglobina (Hb) produkowana jest w retikulocytach. Komórki traktowano znakowaną leucyną, izolowano białko Hb w punktach czasowych i analizowano je pod kątem obecności (dystrybucji) znakowanej Leu w jego sekwencji:
 - **W najwcześniejszych próbkach koniec -COOH był radioaktywny**
 - **W późniejszych - koniec -NH₂ był radioaktywny**

Kod genetyczny jest KOLINEARNY - kolejność ułożenia aminokwasów w białku jest wiernym odzwierciedleniem ułożenia odpowiednich kodonów mRNA.

Direction of chain growth



Amino terminus

Carboxyl terminus

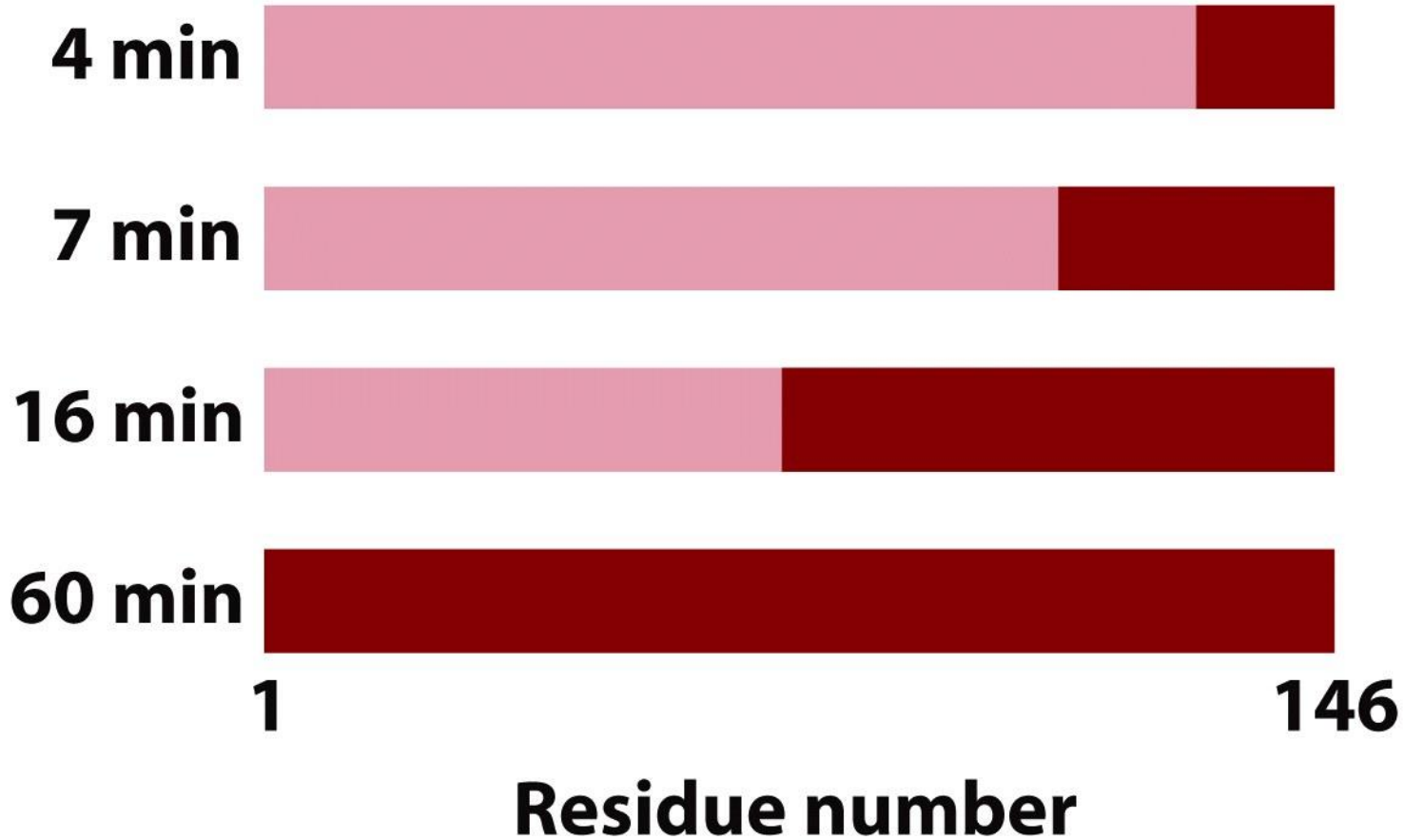
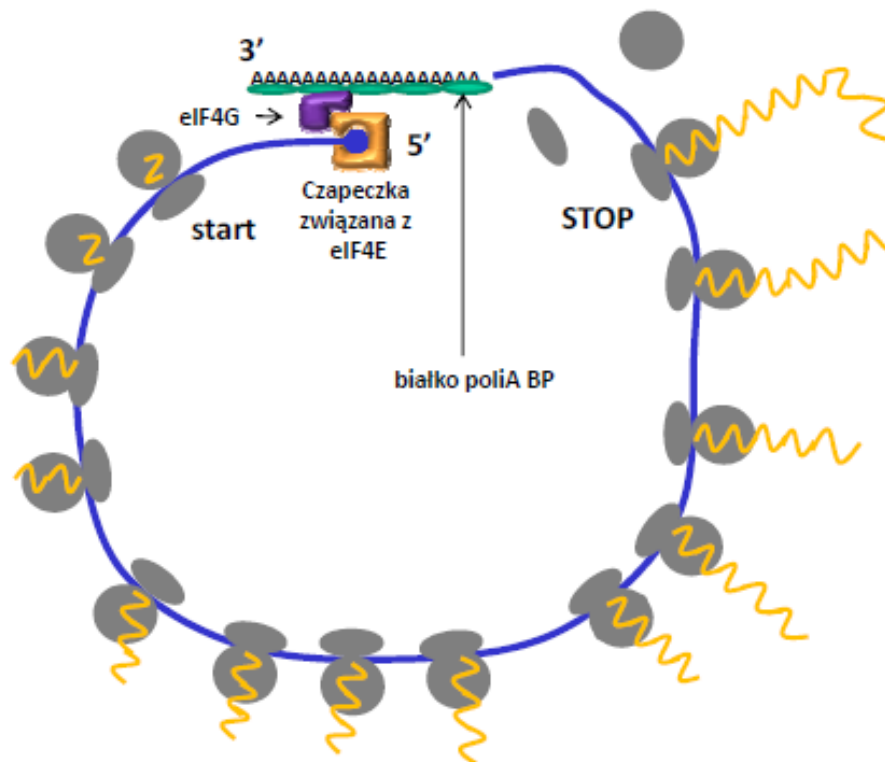


Figure 27-24

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Z jedną cząsteczką mRNA najczęściej łączy się wiele rybosomów produkujących ten sam polipeptyd. Takie polirybosomy można łatwo zauważyć w mikroskopie elektronowym.



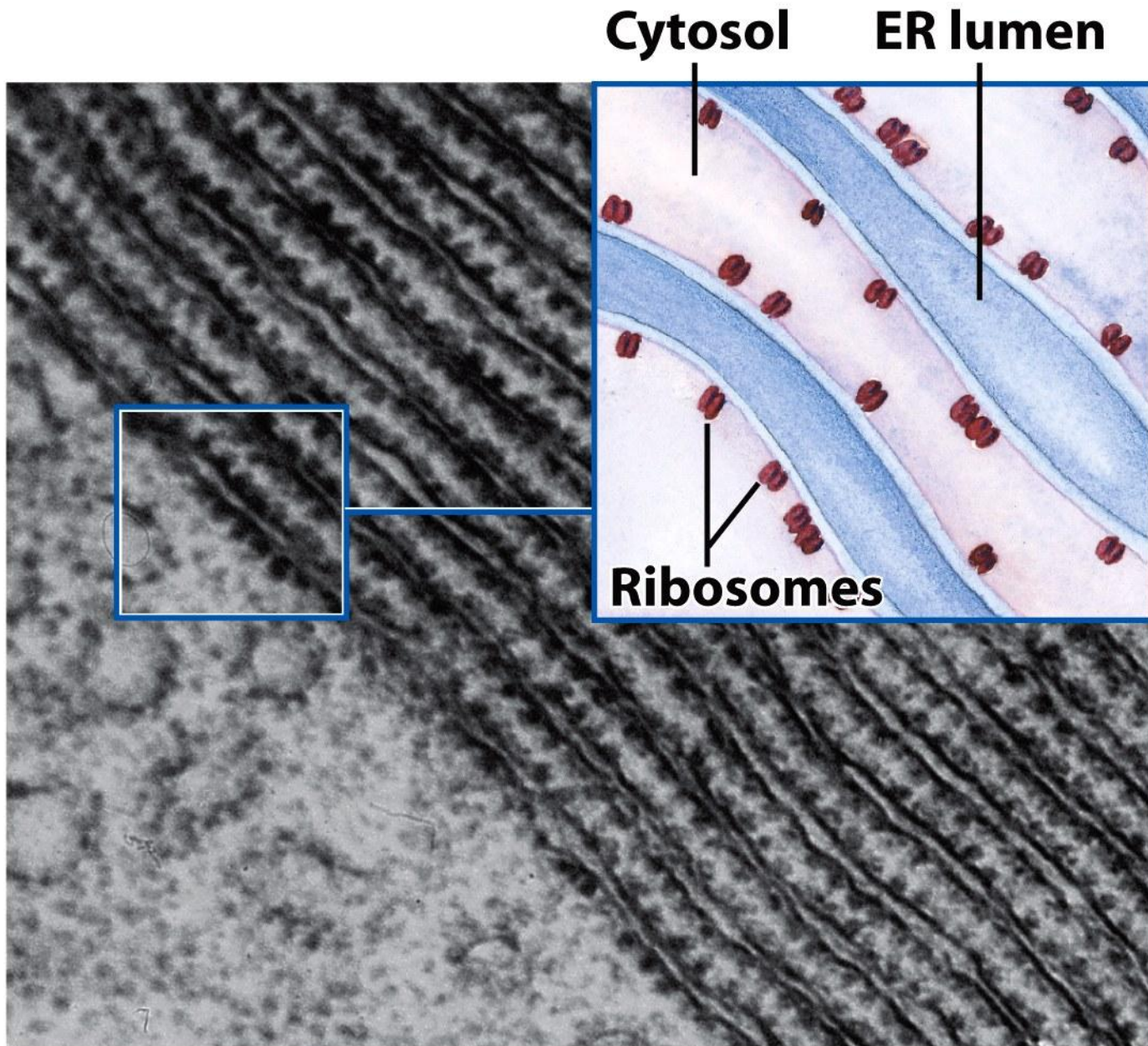


Figure 27-1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Cells typically contain many thousands of ribosomes. Each ribosome can bind one mRNA and up to three tRNAs.