Základy biochemie KBC/BCH

Biosyntéza proteinů

Inovace studia biochemie prostřednictvím e-learningu
CZ.04.1.03/3.2.15.3/0407

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky.

Osnova

- Charakteristika genetického kódu
- Prokaryotní biosyntéza proteinů
- a)Struktura a funkce transferové (přenosové) tRNA
- b)Ribosom - nukleoproteinová částice
- c)Mechanismus biosyntézy proteinů
- d)Role proteinových faktorů při proteosyntéze
- e)Tři vazebná místa pro tRNA na ribosomech
- f)Mechanismus translokace
- g)Terminace proteosyntézy – stop kodon
- Eukaryotní biosyntéza proteinů
- Antibiotika jako inhibitory proteosyntézy

Genetický kód

- **Genetický kód je vztah mezi sekvencí bází v DNA (nebo RNA přepisu= mRNA) a sekvencí aminokyselin v proteinech.**
- Genetický kód byl postulován v roce 1961 F. Crickem a S. Brennerem a dalšími badateli.

- **1.Tři nukleotidy kódují aminokyselinu (abeceda mRNA)**. Je dvacet proteinogenních aminokyselin, stačilo by tedy dvacet trojic – tripletů – kodonů. Kodonů je v genetickém kódu 64.
- **2.Kodony se nepřekrývají**. V sekvenci bází ABCDEF kódují první tři písmena ABC jednu aminokyselinu a druhé tři DEF druhou aminokyselinu. Každý nukleotid patří jednomu kodonu. Výjimky – různé čtecí rámce.
- **3.V sekvenci kódu nejsou tečky** !!! Při translaci se čtou kodony jeden za druhým.
- **4.Genetický kód je degenerovaný**. Některé aminokyseliny jsou kódovány více než jedním kódem. Ze čtyř písmen sestavujeme triplety, kde se mohou písmena opakovat a záleží na pořadí. Dostaneme tak 4^3 možností = 64. Tři triplety kódují zakončení proteosyntézy. Na kódování 20 aminokyselin zbývá 61 kodonů. Pouze Trp a Met mají jeden kodon. Aminokyseliny Leu, Arg a Ser mají kodonů šest.

Genetický kód – vlastnosti.

- **5. Genetický kód je uspořádaný.** Vícenásobné kodony pro danou aminokselinu a kodony pro aminokyseliny se stejnými chemickými vlastnostmi jsou příbuzné a obvykle se odlišují jedním nukleotidem. (Leu –CUU, CUC, CUA, CUG; Ile – AUU, AUC, AUA; Val – GUU, GUC, GUA, GUG). SYNONYMA !!
- **6. Genetický kód obsahuje iniciační a terminační kodony.**

  Iniciační (AUG = Met), terminační (UAA, UAG a UGA)

  7. Genetický kód je téměř univerzální. S malými výjimkami mají kodony stejný smysl ve všech živých organismech od virů po člověka.

  Luštění genetického kódu v 60. letech min. století. Dva typy experimentů:

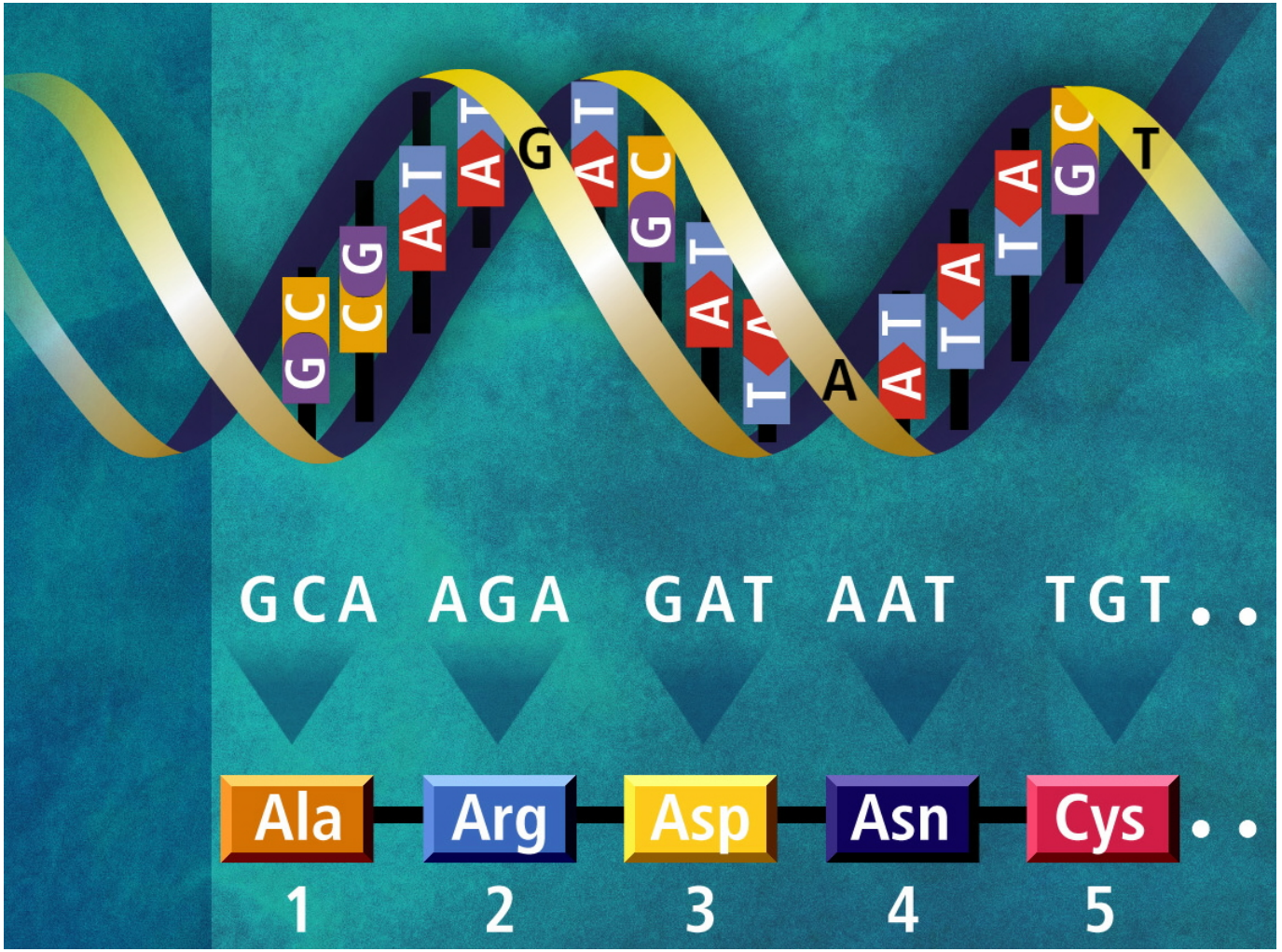
  a) Translace umělých molekul mRNA in vitro a zjišťovalo se, která z 20 AMK se začleňuje do proteinů.

  b) Aktivace ribosomů krátkými mini mRNA o délce pouhých tří nukleotidů. Poté se zjišťovalo, které aminoacyl-tRNA byly stimulovány k vazbě na ribosomy aktivované jednotlivými trinukleotidy.

Milníky luštění genetického kódu

- Nierenberg, M.W (Nobelova cena 1968). a Matthaei, J.H. (1961) Kys. polyuridylová řídí syntézu polyPhe (Phe = UUU)
- Nierenberg a Severo Ochoa (Nobelova cena 1959). Náhodné kopolymery obsahující stejné množství A a C, umělá mRNA. Poly(AC) začleňuje Asn, Gln, His, Lys, Pro a Thr.
- H. Ghobind Korana (Nobelova cena 1968) vyvinul postup syntézy kopolymerů se známými opakovanými sekvencemi di-, tri- a tetranukleotidů. Např. mRNA s opakující se dinukleotidovou sekvencí UG řídila syntézu polypeptidů obsahujících střídavě Cys a Val. ..UGU GUG UGU GUG…
- Závěr: UGU určuje Cys, UUG Leu a GUU Val.
- Nierenbeg a P. Lederer (1964) miniRNA (3 nukleotidy) – vazba aminoacyl-tRNA na syntetizované trinukleotidy.

Genetický kód v abecedě DNA



Smysl degenerace genetického kódu

- Jaký je biologický smysl degenerovaného genetického kódu?
- Pokud by kód nebyl degenerovaný, pak by dvacet kodonů určovalo dvacet aminokyselin a zbylých 44 by kódovalo ukončení řetězce.
- Pravděpodobnost mutace ve smyslu terminace řetězce by v takovém případě byla velká ve srovnání s nedegenerovaným kódem. Terminace řetězce obvykle vede k nedokončenému inaktivnímu proteinu, zatímco změna jedné aminokyseliny není tak tragická.

Genetický kód

PRVNÍ POZICE (5´ konec)	DRUHÁ POZICE				TŘETÍ POZICE (3´ konec)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Poznámky k tabulce „Genetický kód"

- Tabulka „Genetický kód" je sestavena v abecedě mRNA.

- V tabulce jsou vyznačeny aminokyseliny kódované triplety. Např. kodon 5´AUG 3´ určuje Met, kodon CAU určuje His. UAA , UAG a UGA jsou „STOP" neboli terminační signály. AUG je startovací signál – proteosyntéza zahajuje methioninem!!!

- Kodony, které určují stejné aminokyseliny, se nazývají synonyma.
- Např. CAU a CAC jsou synonyma pro His. Většina synonym se liší pouze bází na třetím místě.

- Genetický kód je téměř, ale ne absolutně univerzální.
- Odlišnosti se nacházejí u lidské mitochondrie a řasnatých prvoků.
- Prvoci se liší od ostatních organismů ve čtení UAA a UAG – u prvoků určují aminokyseliny, u ostatních STOP. Jejich jediným STOP signálem je UGA.

Genetický kód, rozdílné kodony lidské mitochondrie

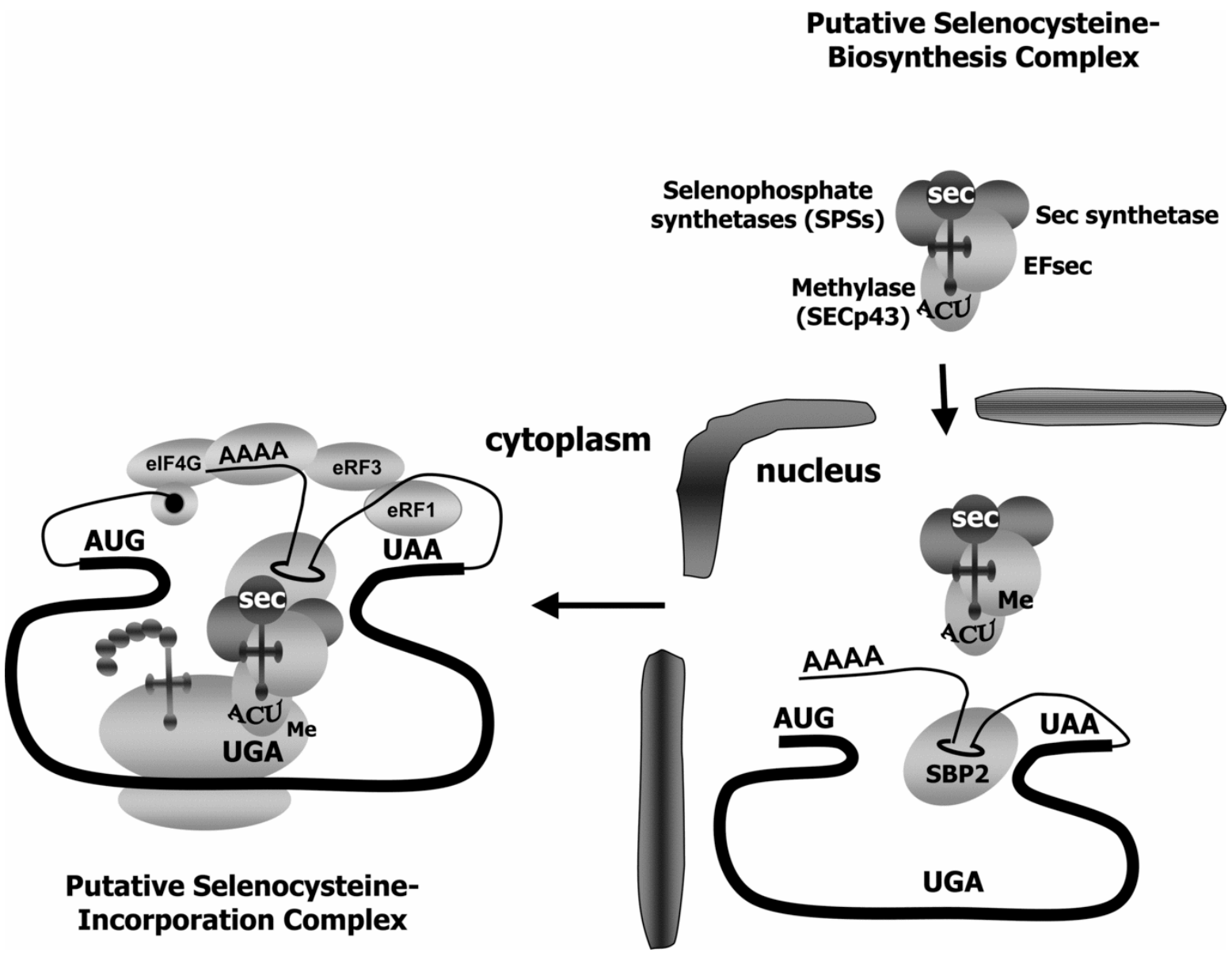
Kodon	Standardní kód	Kód mitochondrie
UGA	STOP	Trp
UGG	Trp	Trp
AUA	Ile	Met
AUG	Met	Met
AGA	Arg	STOP
AGG	Arg	STOP

K zamyšlení.

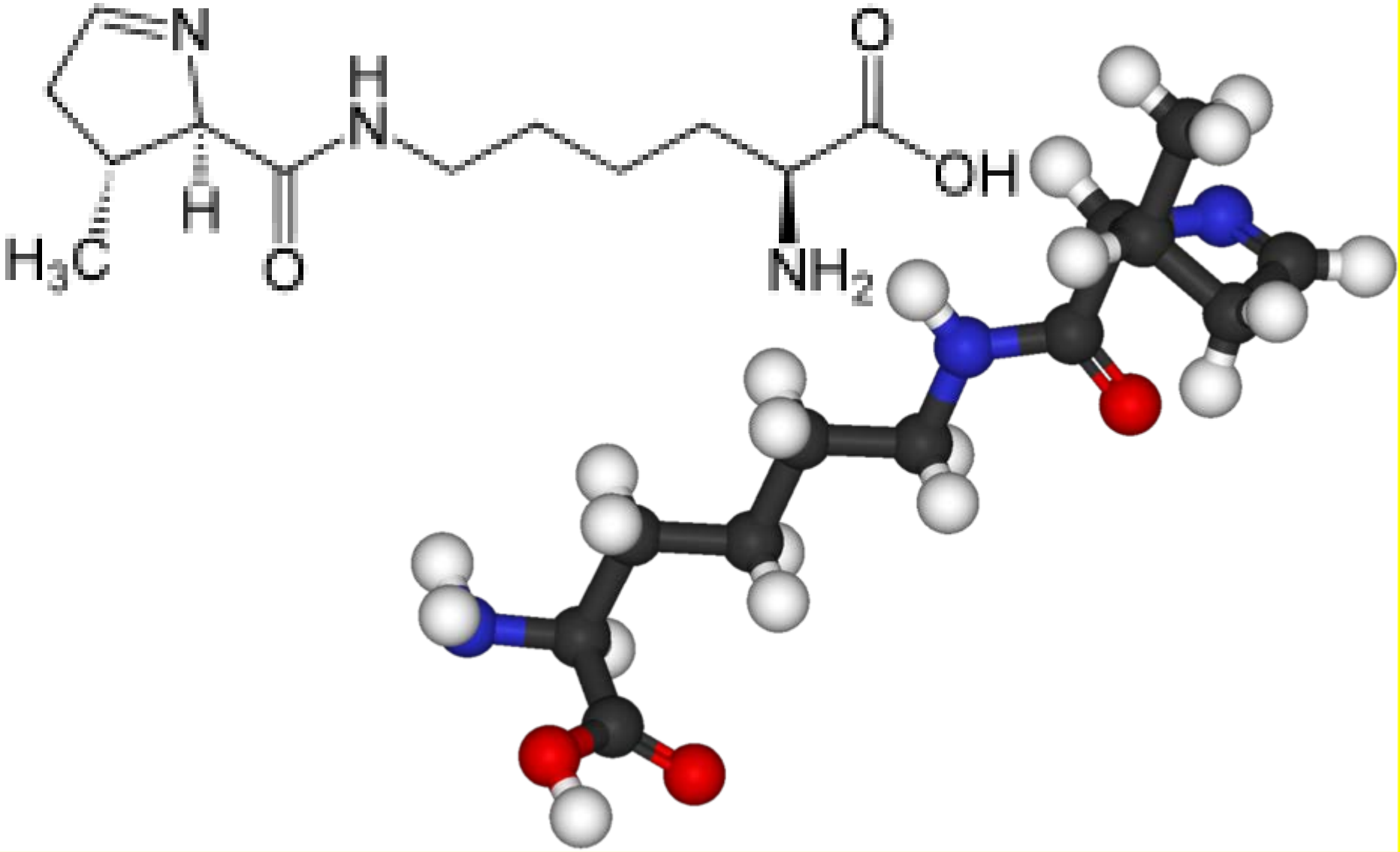
- Gen standardního typu obsahuje trinukleotidovou sekvenci:
- 5´-GAG-3´
- 3´-CTC-5´
- Tento triplet určuje Glu. Kdyby se druhý pár bází v této části genu změnil z A na T a z T na A. za vzniku sekvence:
- 5´-GTG-3´
- 3´-CAC-5´
- Bude stále kódovat Glu ?

Selenocystein – jednadvacátá proteinogenní aminokyselina

- Selenocystein, Sec a U (zkratky).
- Selenový analog cysteinu (SeCys, záměna síry za selen); vzácná aminokyselina obsažená savčí glutathionperoxidase{EC 1.11.1.9}, tetraiodothyronine 5' deiodinases,thioredoxin reductases, formate dehydrogenases, glycine reductases a některých hydrogenázách). (21. proteinogenní aminokyselina). Je kódován kodonem UGA, který běžně působí jako STOP-kodon; mRNA pro selenocystein má zvláštní sekundární strukturu, která umožňuje rozpoznat okolí kodonu UGA a zajistit, aby Sec byl při translaci inkorporován do bílkoviny.
- tRNA-vázaný Ser je převeden na tRNA-Sec pyridoxalfosfátovým enzymem – selenocysteinsynthasou.


Putative Selenocysteine-Biosynthesis Complex
Selenophosphate synthetases (SPSs)
sec
Sec synthetase
EFsec
Methylase (SECp43)
ACU
cytoplasm
nucleus
eIF4G
AAAA
eRF3
eRF1
AUG
UAA
sec
ACU
Me
UGA
sec
Me
ACU
AAAA
AUG
SBP2
UAA
UGA
Putative Selenocysteine-Incorporation Complex

Pyrolysin, zkratky Pyr a O.Methyltransferasy.Kodon UAG, antikodon CUA.



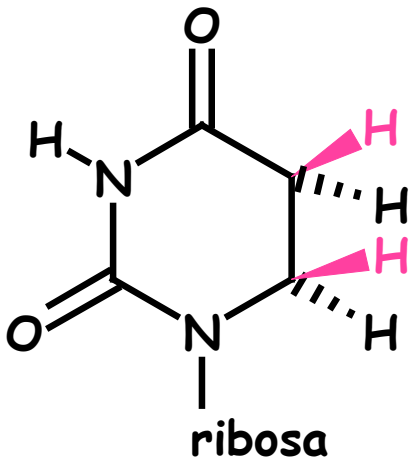
Biosyntéza proteinů

- **Biosyntéza proteinů vyžaduje:**
- Translaci (tj. překlad) nukleotidové sekvence do sekvence aminokyselin (mRNA —> protein).
- Aminoacyl-transfer RNA synthetasu, která rozpoznává a využívá informace dané genetickým kódem.
- Ribosomy - ribonukleoproteiny. Ribosom (70S) je složen z malé podjednotky (30S) a velké podjednotky (50S).
- A další proteinové faktory nutné k syntéze.
- Prokaryotní syntéza proteinů se liší od eukaryotní – hlavně v translaci!!! Budeme probírat prokaryotní syntézu (je propracovanější a známější) s poznámkami o odlišnosti eukaryotní proteosyntézy.

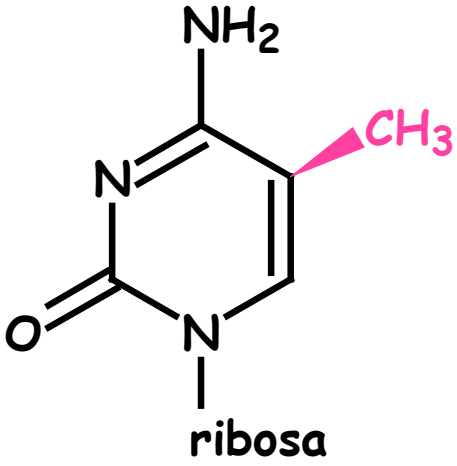
Struktura a funkce transferové (přenosové) RNA

- tRNA slouží jako adaptorová molekula vážící se na specifický kodon a nesoucí aktivovanou aminokyselinu ke včlenění do polypeptidového řetězce.
- První sekvenci bází u tRNA stanovil po sedmiletém bádání R. Holley v roce 1965. Byla to kvasničná alanyl-tRNA. Ukázalo se, že všechny tRNA mají mnoho společných strukturních znaků.
- 1.Každá tRNA je samostatný řetězec mající mezi 73 až 93 ribonukleotidy (cca 25 kDa).
- 2.tRNA obsahují mnoho neobvyklých bází – asi tak mezi 7 až 15 na molekulu. Např. methylované nebo dimethylované.
- 3.Asi polovina nukleotidů v tRNA se páruje za tvorby dvojité helix.
- 4.Pět skupin bází nevytváří páry:
  - 3´CCA konec - akceptorový stonek.
  - TΨC smyčka (Ψ reprezentuje pseudouridin).
  - Variabilní (extra) raménko – obsahuje variabilní počet nukleotidů.
  - DHU smyčka - obsahuje několik dihydrouracilů.
  - Antikodonová smyčka - reaguje s komplementárním kodonem na mRNA.

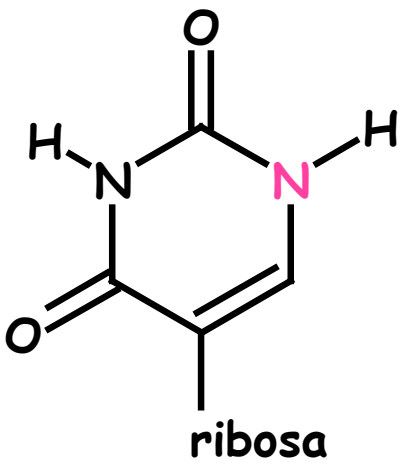
Tři z možných neobvyklých bází tRNA



Dihydrouridin
(UH_2)

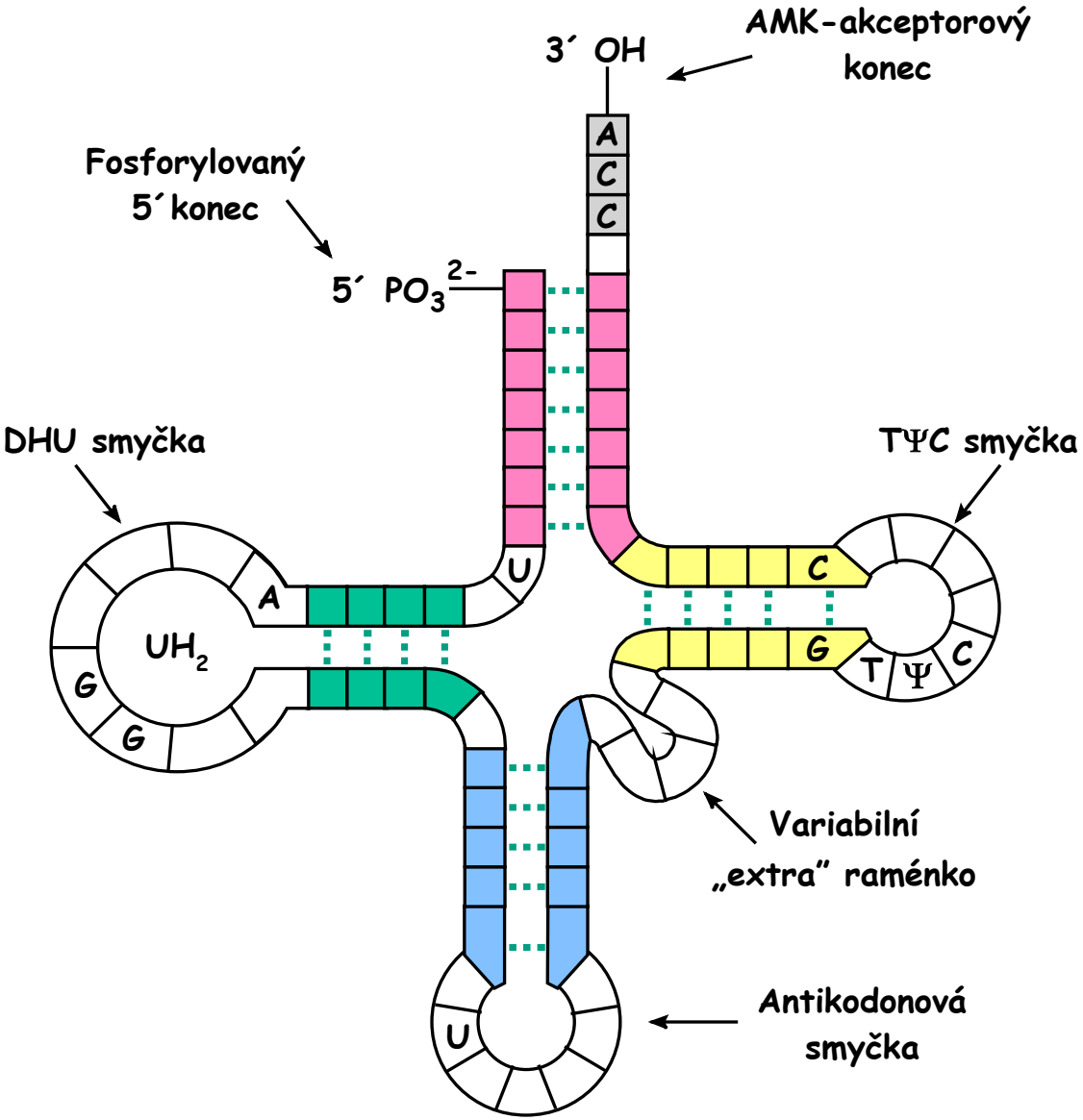


5-Methylcytidin



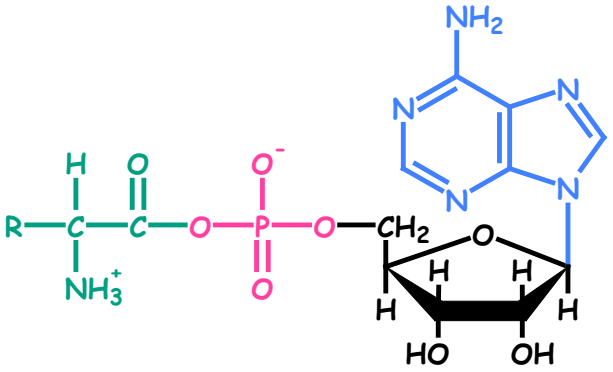
Pseudouridin
(Ψ)

Obecná struktura tRNA

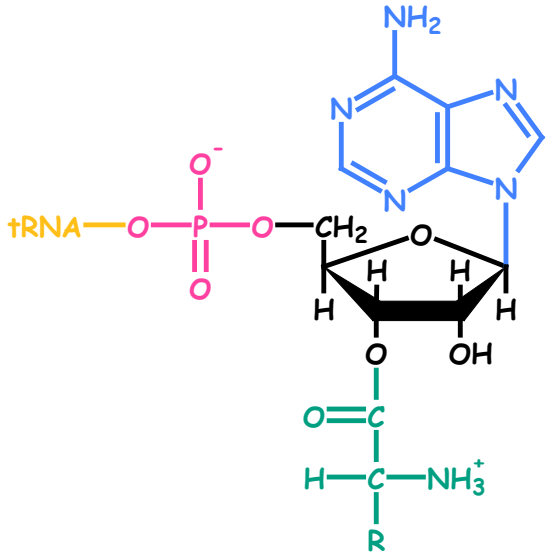


Aminoacyltransfer-tRNA synthetasa

- Aminoacyl-tRNA synthetasy jsou specifické aktivační enzymy.
- Prvním krokem aktivace aminokyseliny je tvorba aminoacyladenylátu (aminoacyl-AMP) z aminokyseliny a ATP.
- Druhým krokem je přenos aminoacylskupiny z aminoacyl-AMP na příslušnou tRNA za tvorby aminoacyl-tRNA.
- Aminokyselina + ATP + tRNA + $H_2O \leftrightarrow$ aminoacyl-tRNA + AMP + 2 P_i
- Spotřebuje se ekvivalent dvou molekul ATP.



Aminoacyladenylát



Aminoacyl-tRNA

Ribosom - nukleoproteinová částice

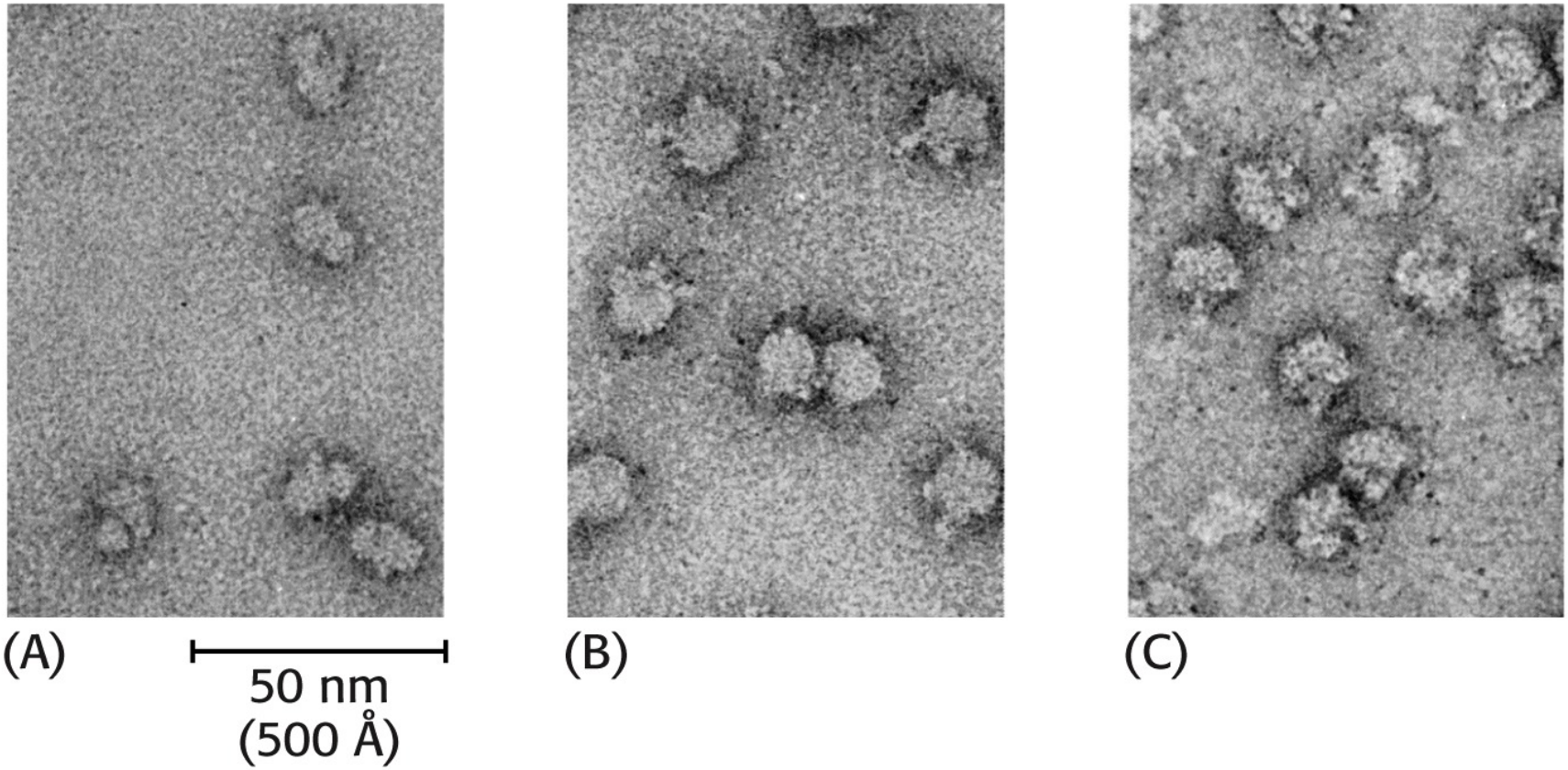
- Ribosomy jsou molekulární prostředky (nukleoproteiny) koordinující souhru mezi aktivovanou aminoacyl-tRNA, mRNA a proteiny, vedoucí k syntéze proteinů.
- Ribosom z E. coli má hmotnost 2 700 kDa, průměr asi 200 Å a sedimentační koeficient 70S.
- Ribosom disociuje na velkou podjednotku (50S) a malou podjednotku (30S).
- Obě podjednotky obsahují mnoho různých proteinů a rRNA.
- Ribosom eukaryot (savčí), 80S (podjednotky 60S a 40S).

- Ribosomální RNA hrají ústřední roli při syntéze proteinů.
- Proteiny jsou syntetizovány ve směru od N konce k C konci. Sekvence aminokyselin v proteinu je překládána z nukleotidové sekvence mRNA. Směr translace je $5' \rightarrow 3'$.

- Na molekule mRNA se může v daném čase vyskytovat více paralelně uspořádaných ribosomů – tvoří tzv. polyribosomy či polysomy.

Mikrofotografie ribosomu z elektronového mikroskopu

A) Podjednotka 30S, B) Podjednotka 50S a C) Ribosom 70S.

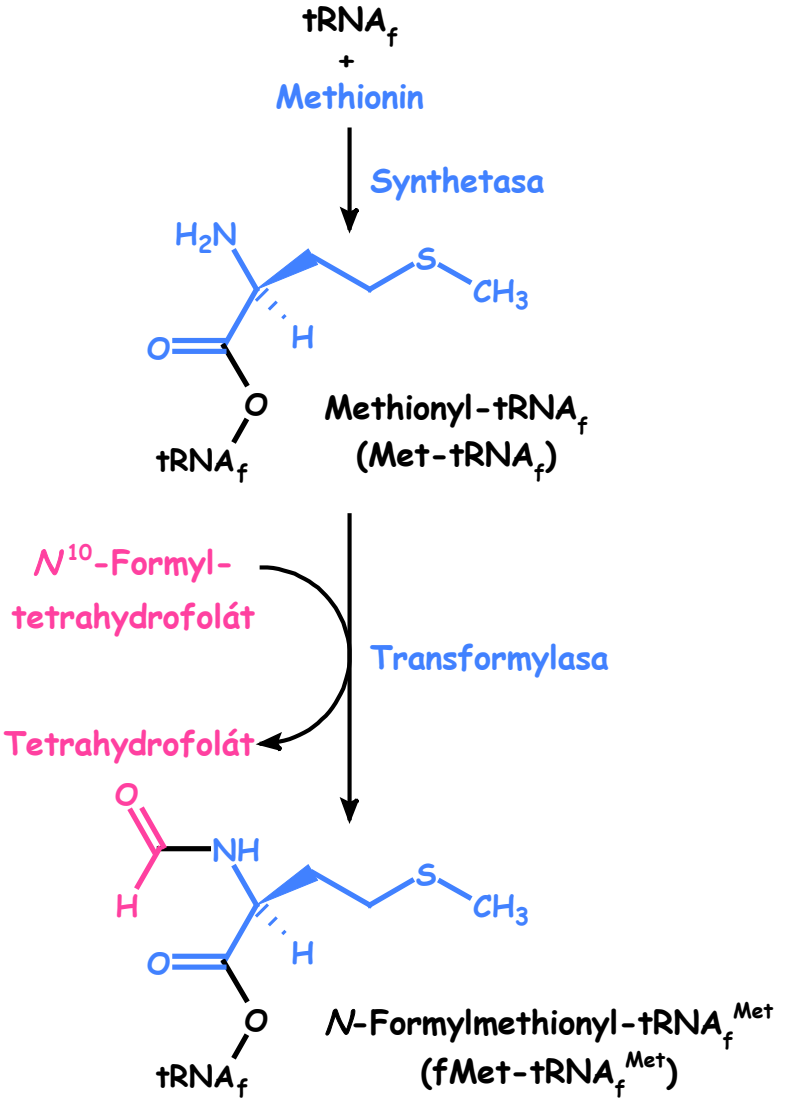


Start biosyntézy proteinů (prokaryota).

- Startovacím signálem je kodon AUG (nebo GUG), kterému předchází na mRNA několik tzv. iniciačních bází (iniciační region), které se vážou na 3´konec 16S RNA (součást 30S).
- Iniciační region = nukleotidová sekvence v 5´-nepřekládané části molekuly mRNA, tzv. Shineova-Delgarnova sekvence.

Druhou podmínkou startu proteosyntézy je párování iniciačního kodonu na mRNA s antikodonem iniciační molekuly tRNA.

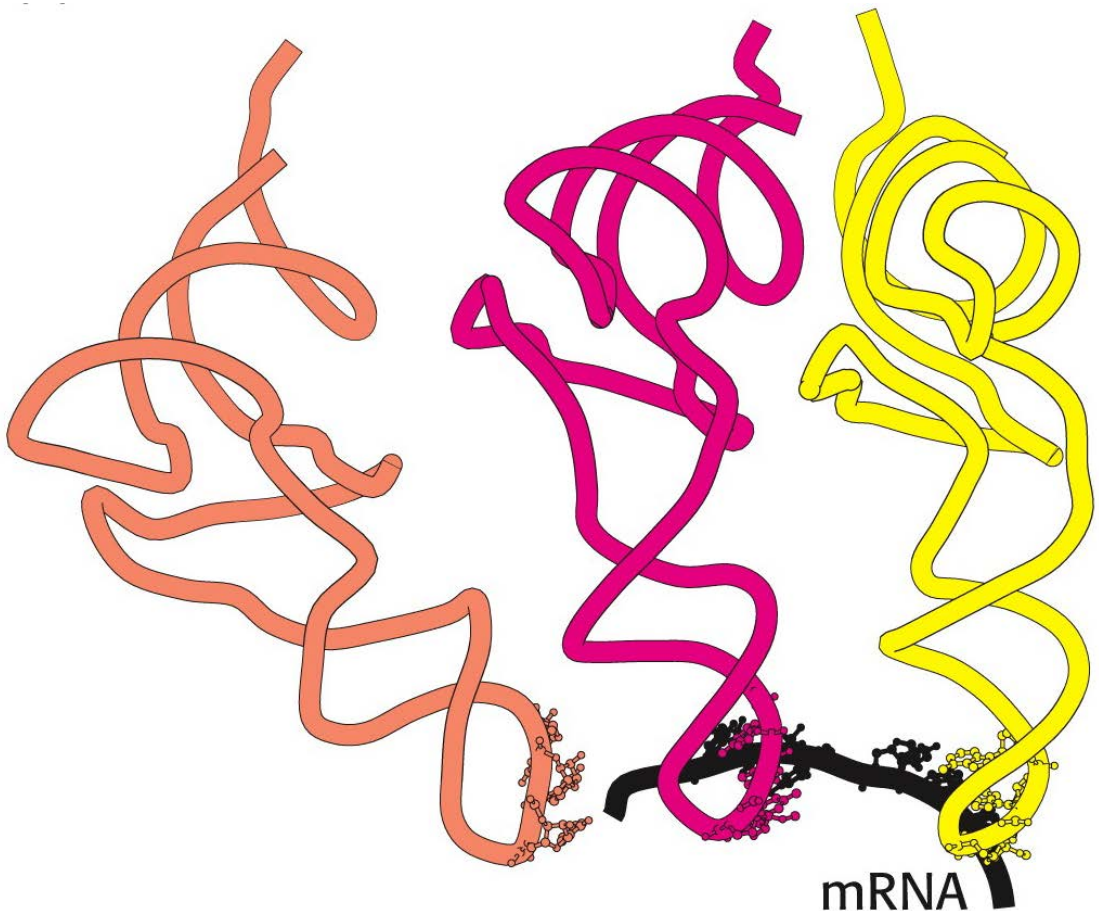
Bakteriální syntéza proteinů je iniciována formylmethionyl- tRNA ($tRNA_f^{Met}$)



Tři vazebná místa pro tRNA na ribosomech

A - aminoacylové, P - peptidylové a E - výstup – místa spojují 30S a 50S podjednotky. Druhý konec tRNA interaguje s podjednotkou 50S.

Vazebná místa pro tRNA:
A aminoacylové, P peptidylové a E exit (výstup)



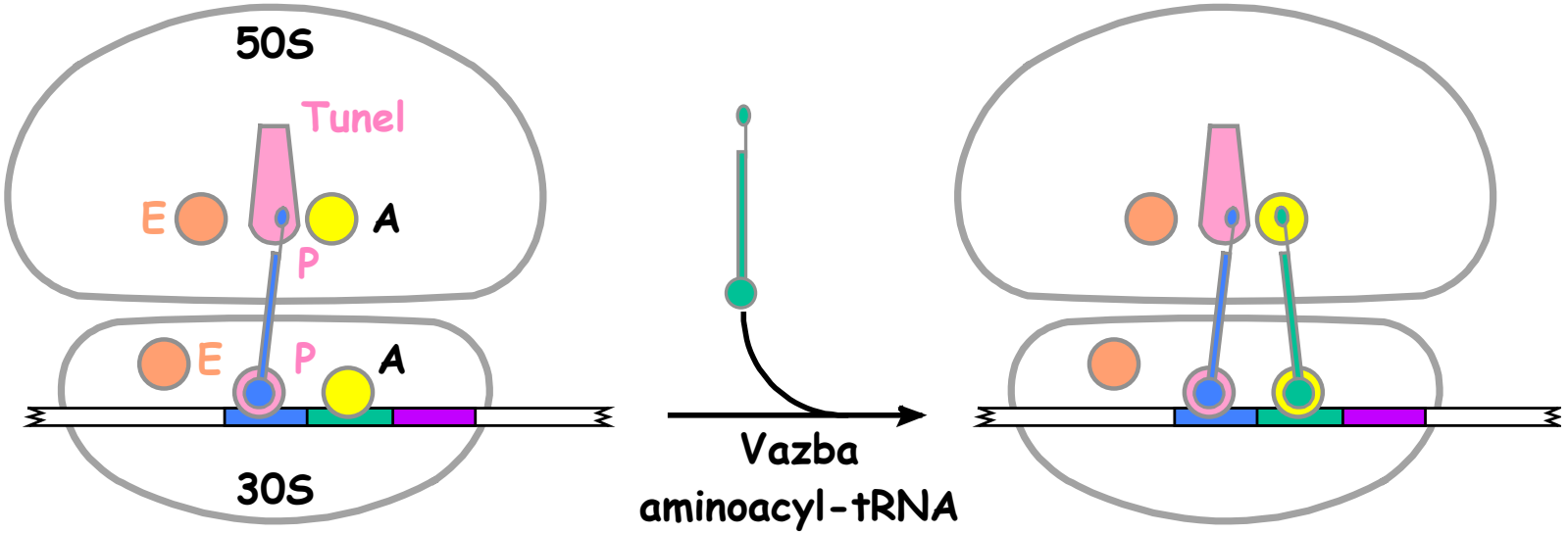
Animace syntézy proteinů.

- http://www.youtube.com/watch?v=OzSIGxKWqoo&feature=related (Meselson a Stahl)
- http://www.youtube.com/watch?v=hC_8y8fNkCw (replikace DNA)
- http://www.biostudio.com/demo_freeman_protein_synthesis.htm
- http://www.youtube.com/watch?v=1PSwhTGFMxs
- http://www.youtube.com/watch?v=5bLEDd-PSTQ&feature=related

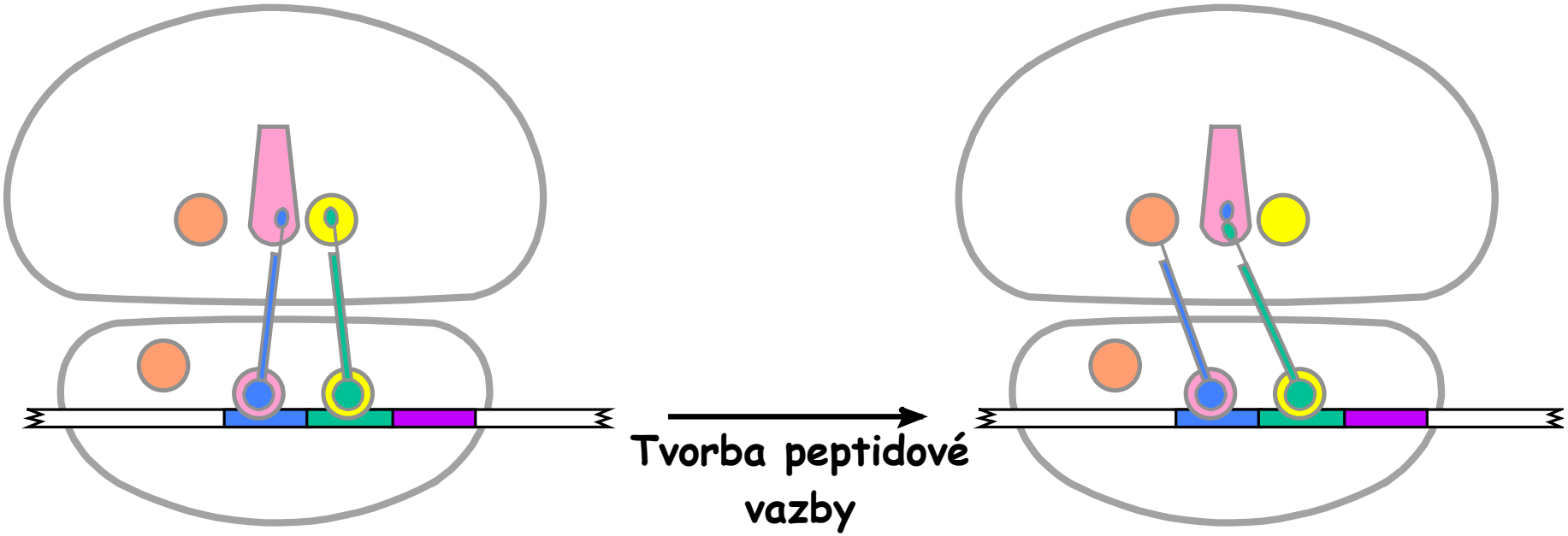
Mechanismus biosyntézy proteinů - vazba aminoacyl-tRNA

- Cyklus začíná s peptidyl-tRNA v P místě.

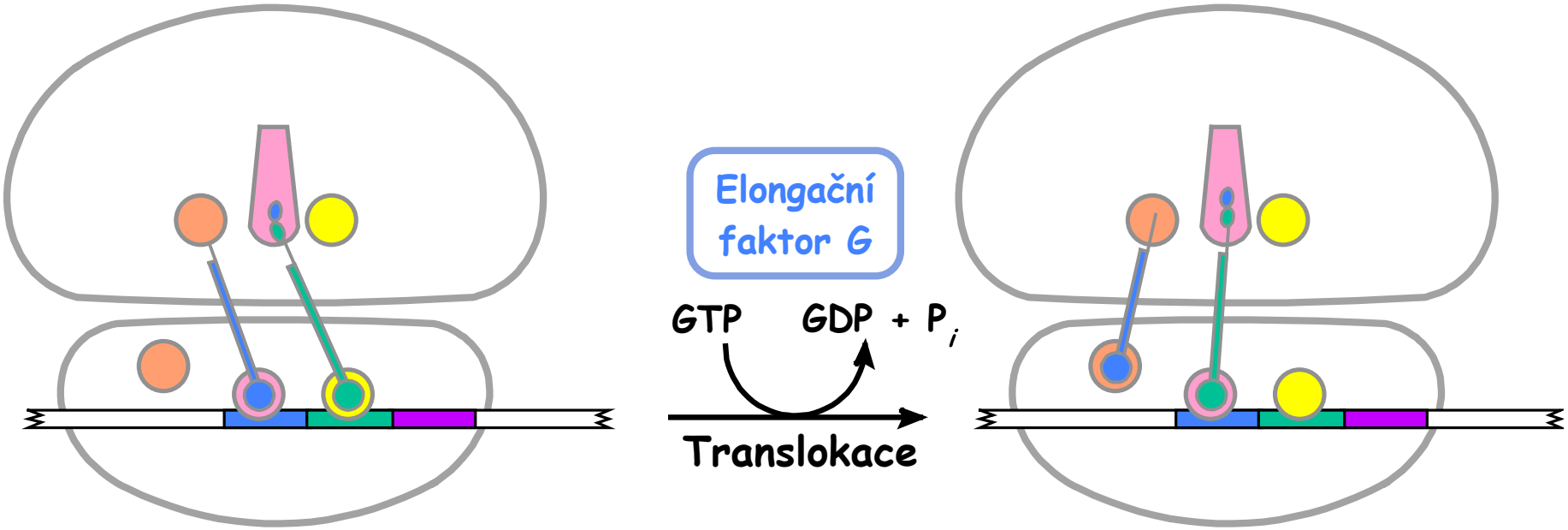
- Aminoacyl-tRNA se váže do místa A. Když jsou obě místa (A a P) obsazena, dochází k tvorbě nové peptidové vazby. Transferové RNA a mRNA jsou translokovány působením elongačního faktoru G (GTP → GDP + P). Současně dochází k posunu deacylované tRNA na místo E, kde volně oddisociuje a cyklus je uzavřen.



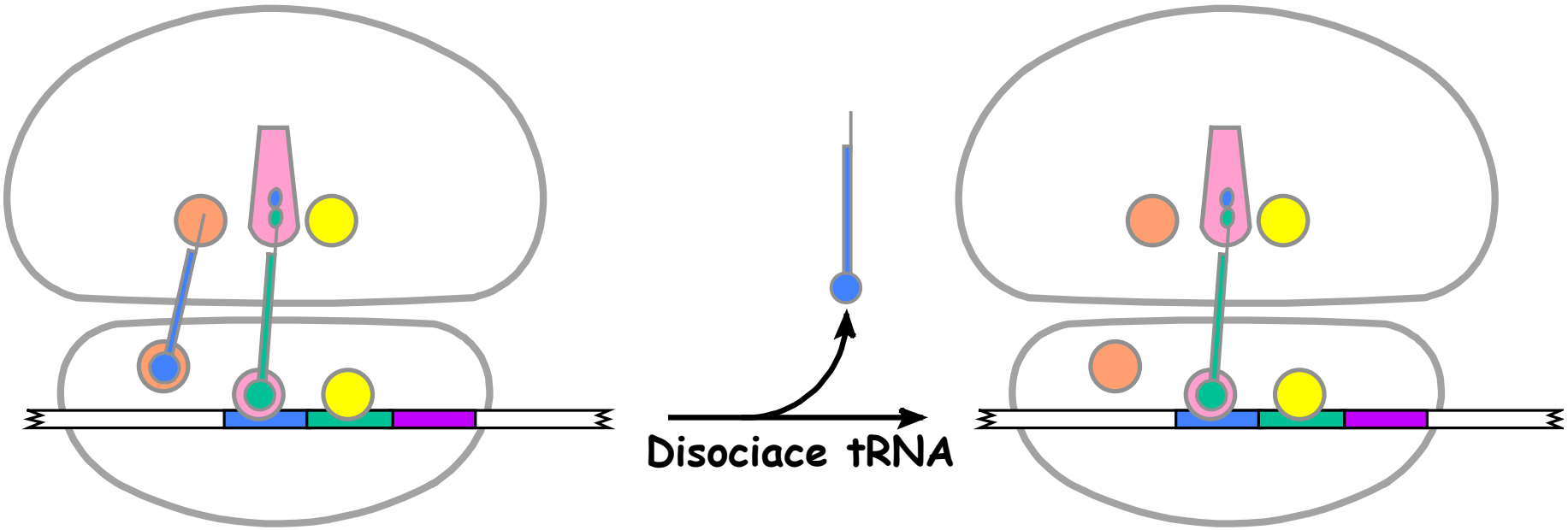
Tvorba peptidové vazby



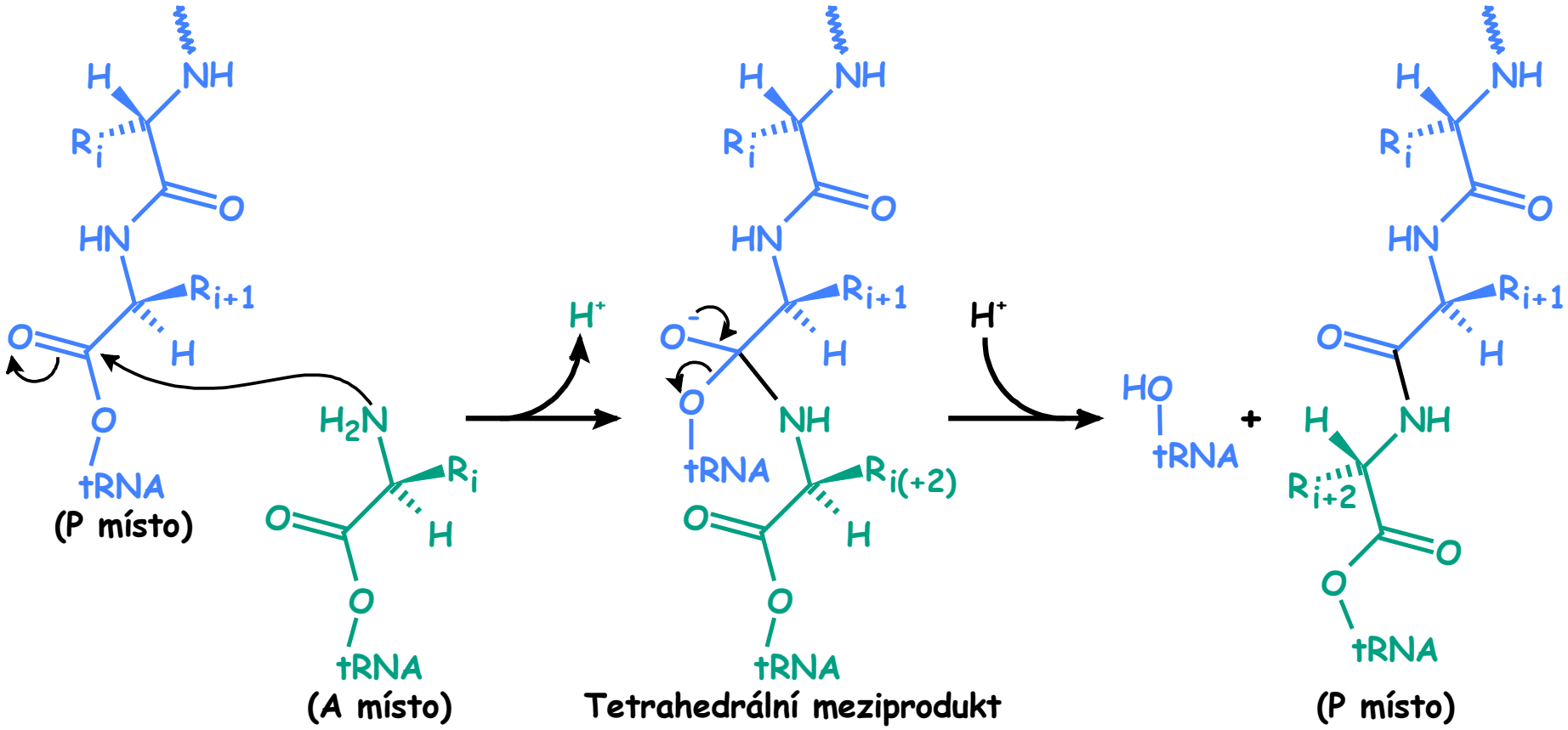
Translokace



Disociace deacylované tRNA

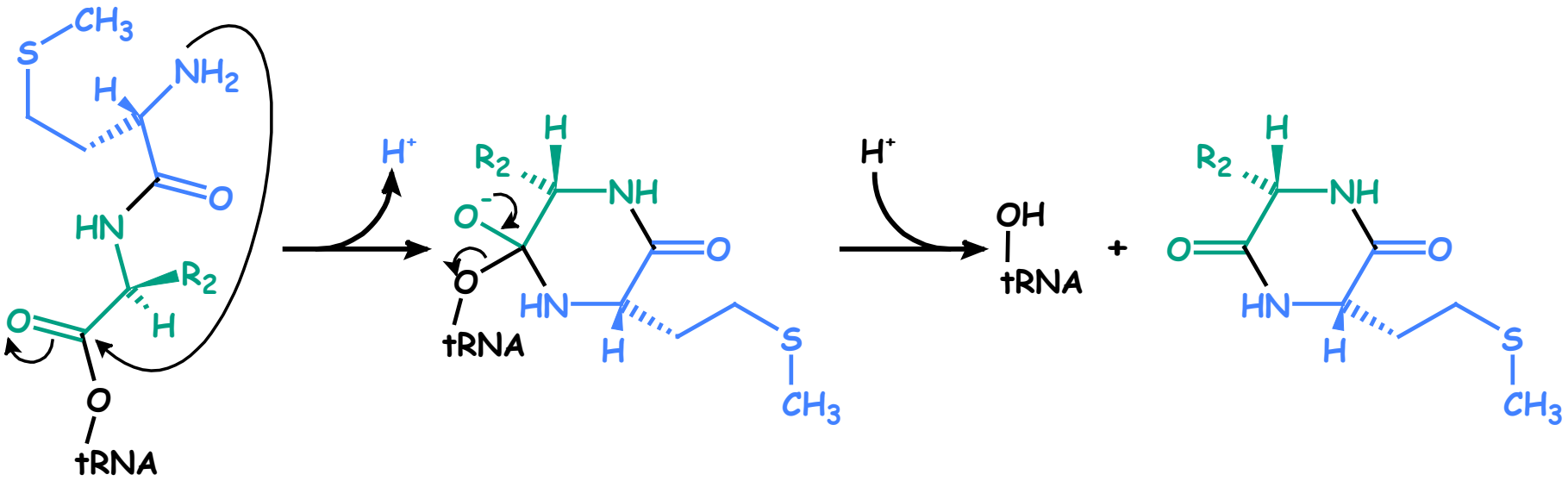


Mechanismus tvorby peptidové vazby – nukleofilní adice aminoskupiny na karbonylovou skupinu peptidylové tRNA, tvorba peptidové vazby a uvolnění deacylované tRNA.



Role formylace methioninu

Dipeptidyl-tRNA s volnou aminoskupinou může cyklizovat a odštěpit se z tRNA.
Formylace tomu brání.



Role proteinových faktorů při proteosyntéze

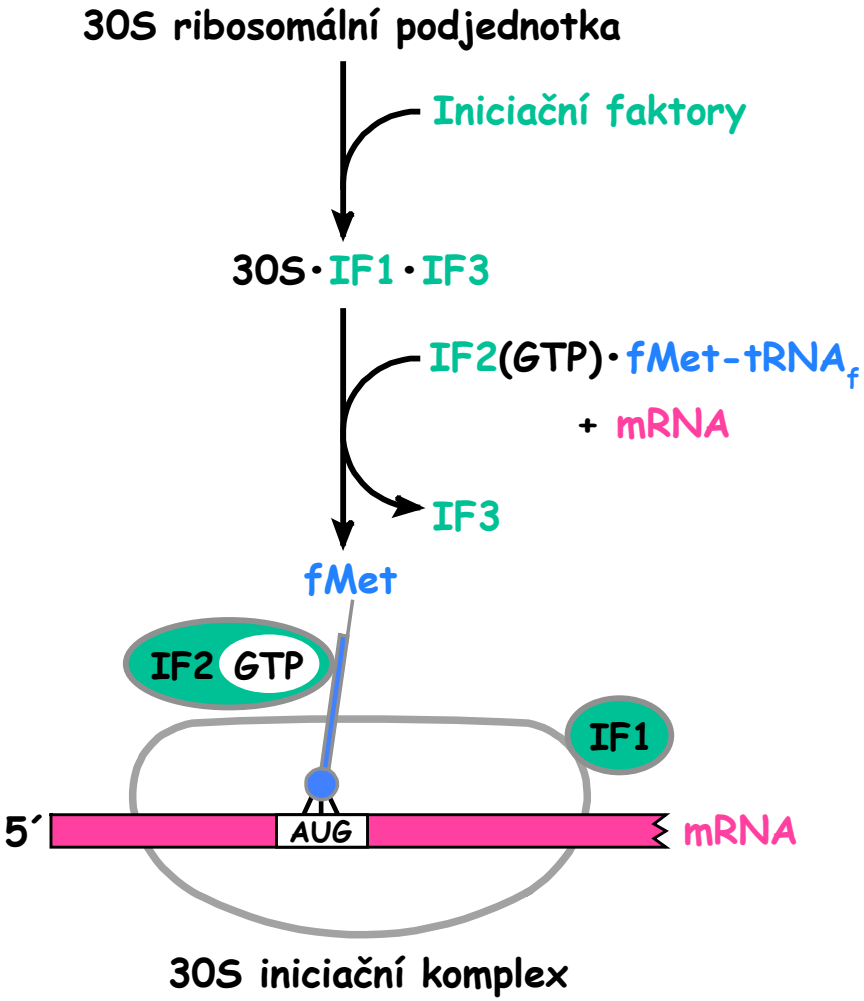
- Proteinové faktory se podílí na iniciaci, elongaci a terminaci syntézy proteinů.
- Aby mohla být zahájena syntéza, musí do ribosomu vstoupit formylmethionyl-tRNA a mRNA.

- Na tomto procesu se podílí tři iniciační faktory (IF1, IF2 a IF3). Podjednotka 30S tvoří nejdříve komplex s IF1 a IF3.
- IF2 - G protein váže GTP, což vede ke konformačním změnám umožňujícím IF2 se asociovat s formylmethionyl-$fRNA_f$. Vzniklý komplex se váže na mRNA v místě iniciačních nukleotidů (Shine-Dalgarnova sekvence) – **vzniká 30S iniciační komplex**.

- Hydrolýza GTP vázaného na IF2 při vstupu 50S podjednotky vede k uvolnění iniciačního faktorů – vzniká **70S iniciační komplex**. Molekula fMet-$tRNA_f$ zaujímá pozici v místě P a komplex je připraven k elongaci. Ostatní místa A a E jsou prázdná. Pozice formylmethionyl-$tRNA_f$ je řízena interakcí kodon – antikodon AUG nebo GUG na mRNA.

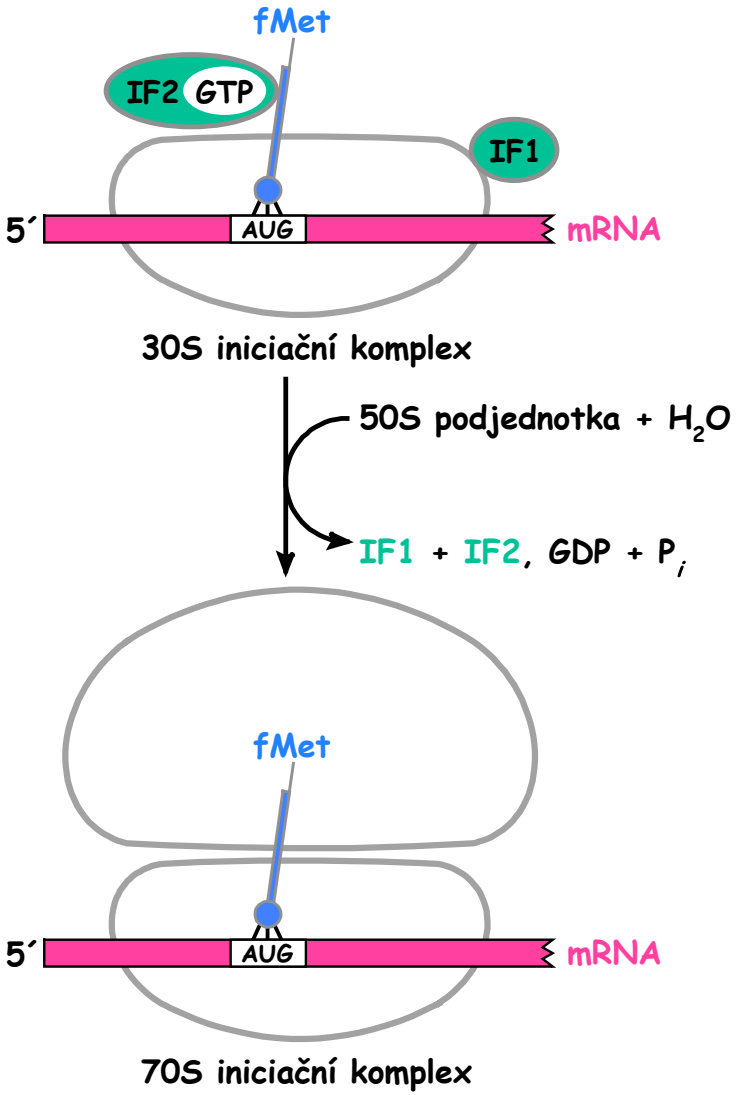
Iniciace translace u prokaryot

Tvorba 30S iniciačního komplexu.



Iniciace translace u prokaryot

Tvorba 70S iniciačního komplexu.

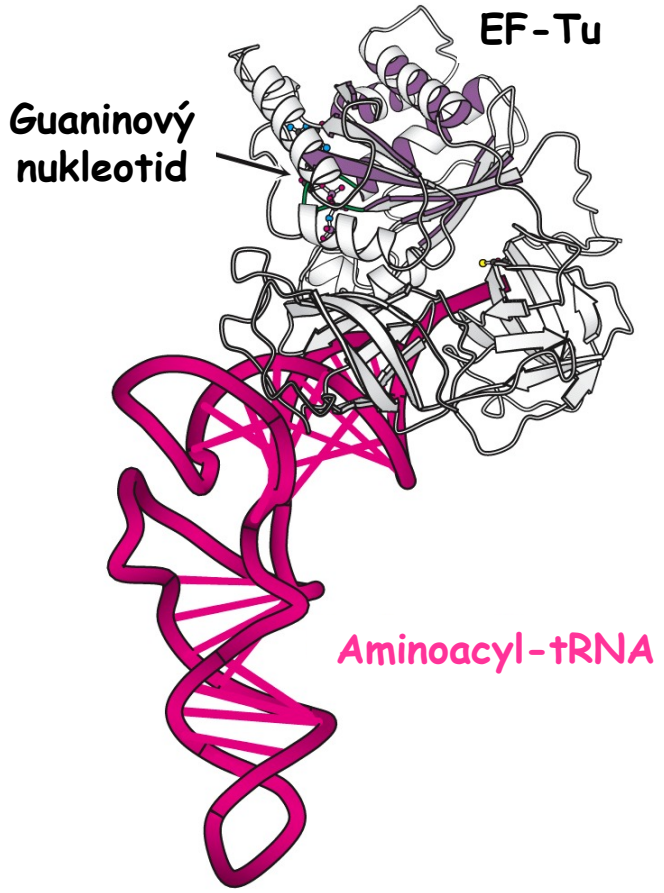


Vstup aminoacyl-tRNA do ribosomu

Elongační cyklus.

- Vstup aminoacyl-tRNA do prázdného místa A je spojen se 43 kDa proteinem zvaným **elongační faktor Tu (EF-Tu)**, což je G protein.
- EF-Tu váže aminoacyl-tRNA ve formě GTP. Když se komplex EF-Tu-aminoacyl-tRNA spojí s ribosomem, GTP hydrolyzuje na GDP. Pokud nevstoupí na správný antikodon, k hydrolýze nedojde.
- Další **elongační faktor Ts** se váže na EF-Tu komplex a indukuje odštěpení GDP.

Komplex EF-Tu a aminoacyl-tRNA



Translokace tRNA a mRNA po tvorbě peptidové vazby

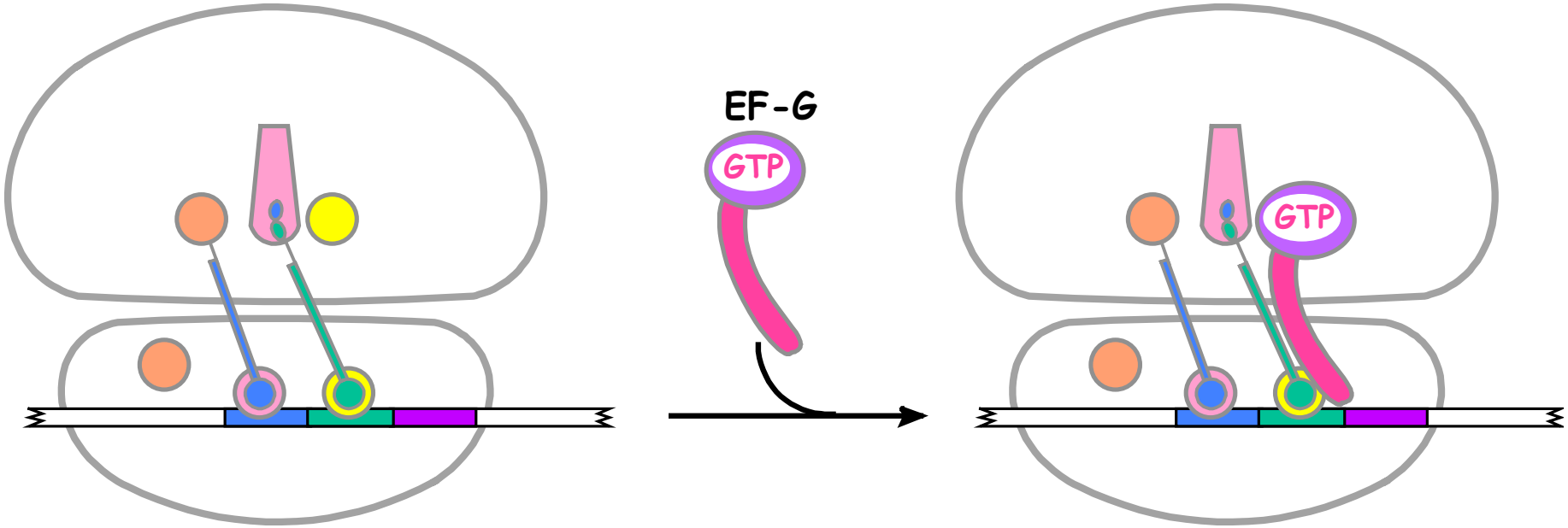
- Po tvorbě peptidové vazby se musí mRNA posunout o tři nukleotidy, aby se deacylovaná tRNA posunula do místa E na 30S podjednotce a peptidyl-tRNA se posunula z místa A do místa P na 30S podjednotce. Výsledkem této translokace je posunutí následujícího kodonu do místa A, kde může vstoupit další aminoacyl-tRNA.

- Translokace je zprostředkována **elongačním faktorem G (EF-G) – nazývaným translokasa**.

- Jedná se o konformační změny způsobené vazbou a posléze hydrolýzou GTP.

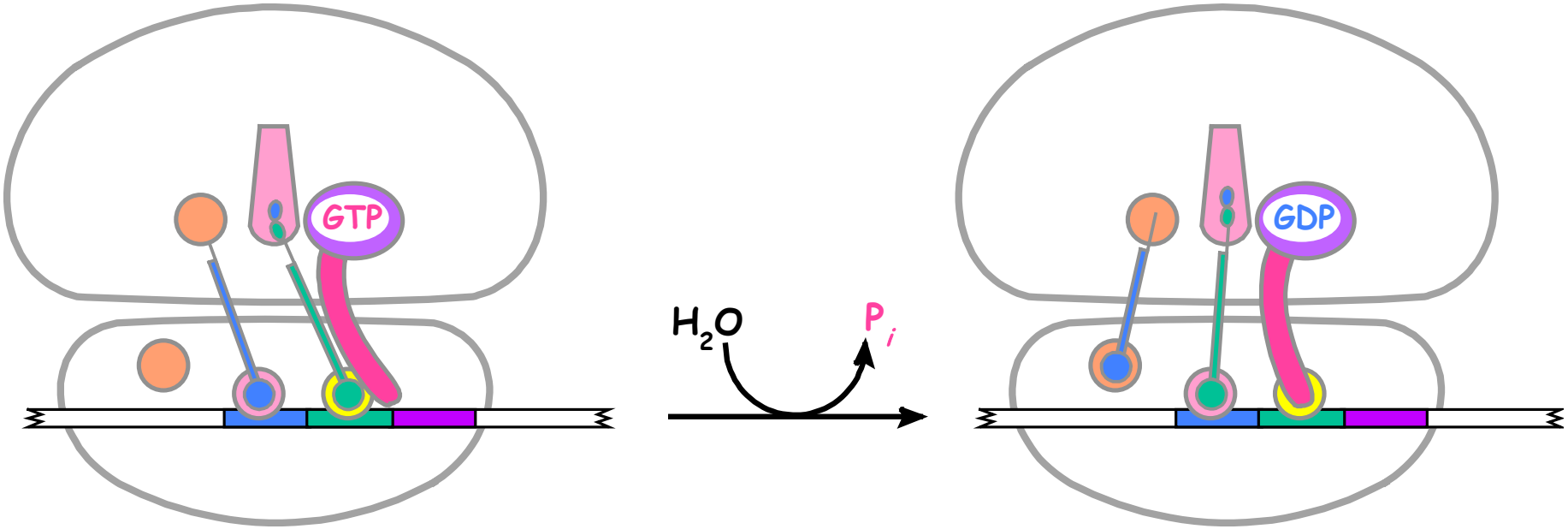
Mechanismus translokace

Pohyb je způsoben vazbou GTP formy EF-G na EF-Tu vazebné místo na 50S.



Mechanismus translokace

Po hydrolýze vedou konformační změny EF-G k pohybu stonku na místo A na 30S.



Terminace proteosyntézy – stop kodony

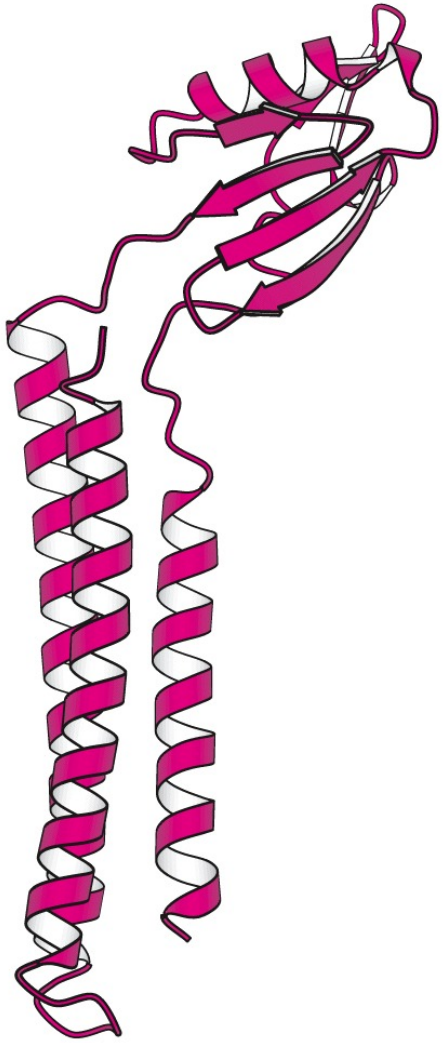
- Uvolňovací faktory rozpoznávají STOP kodony – proteiny (RF).
- Jeden z nich RF1 rozpoznává UAG a UAA. Druhý RF2 rozpoznává UAA a UGA. Třetí faktor RF3, G protein homologní s EF-Tu, zprostředkovává interakce mezi RF1 a RF2 a ribosomem.

- Uvolňovací faktory využívají taktiku Trojského koně. Ribosom nekatalyzuje tvorbu peptidové vazby - to je chemická reakce. Proto také nedochází k hydrolýze peptidové vazby. Z místa tvorby peptidu je nutné odstraňovat vodu.
- Struktura prokaryotního uvolňovacího faktoru není známa. Známa je struktura eukaryotního uvolňovacího faktoru.

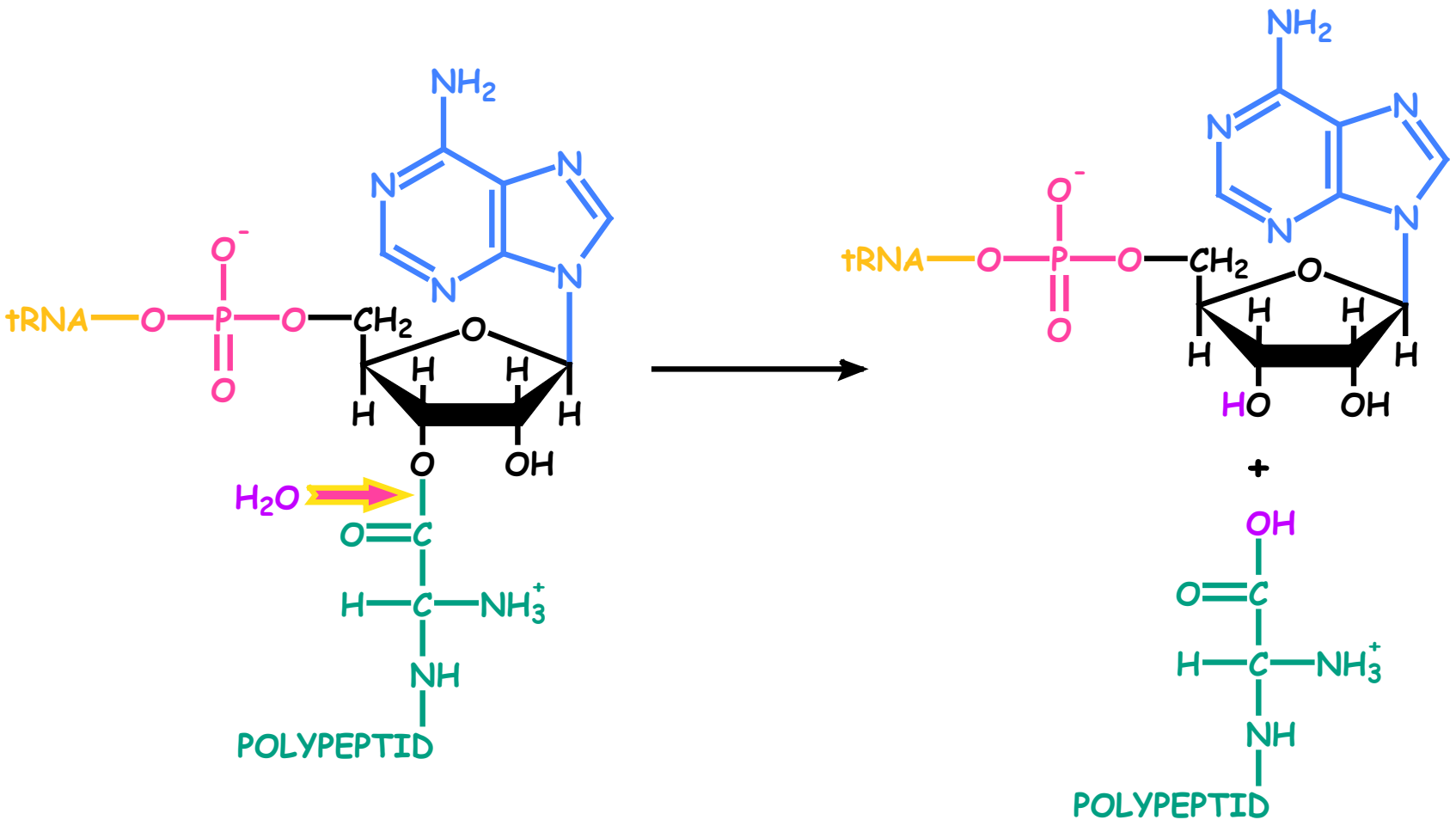
- Funkcí uvolňovacího faktoru je vnést do peptidového místa vodu!!! Struktura je podobná tRNA.
- RF váže ve své struktuře vodu, kterou vnáší do peptidového místa, kde dochází k hydrolýze, k odštěpení polypeptidu.

Struktura ribosomálního uvolňovacího faktoru

Helixy proteinu napodobují tRNA.



Odštěpení peptidového řetězce vodou vnesenou RF po stop kodonu

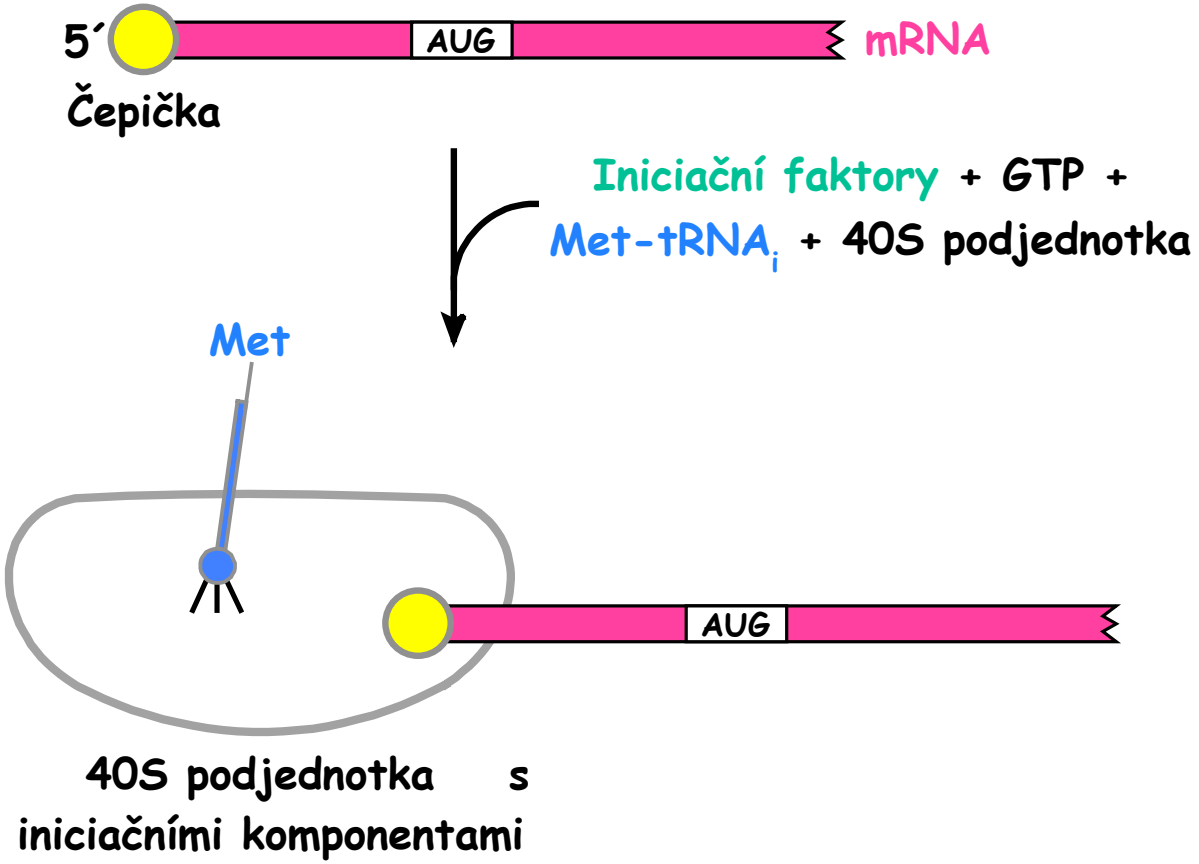


Eukaryotní syntéza proteinů

- Základní schéma syntézy proteinů u eukaryot je shodné s bakteriální.
- **Ribosomy** jsou větší, složeny z velké 60S podjednotky a malé 40S podjednotky. Složený ribosom je 80S a má hmotnost 4 200 kDa.
- Iniciační tRNA. Iniciační aminokyselinou je Met.
- **Iniciace** - iniciační kodon je AUG. Eukaryota nepoužívají iniciační nukleotidovou sekvenci.
- U eukaryot je mnohem více iniciačních faktorů než u prokaryot. Prefix eIF platí pro eukaryota.
- **Elongace** - eukaryotní elongační faktory jsou podobné prokaryotním EF1α EF1$\beta\gamma$. Eukaryotní EF2 zprostředkovává GTP poháněnou translokaci.
- **Terminace** je uskutečňována jednoduchým uvolňovacím faktorem eRF1, na rozdíl od dvou u prokaryot.

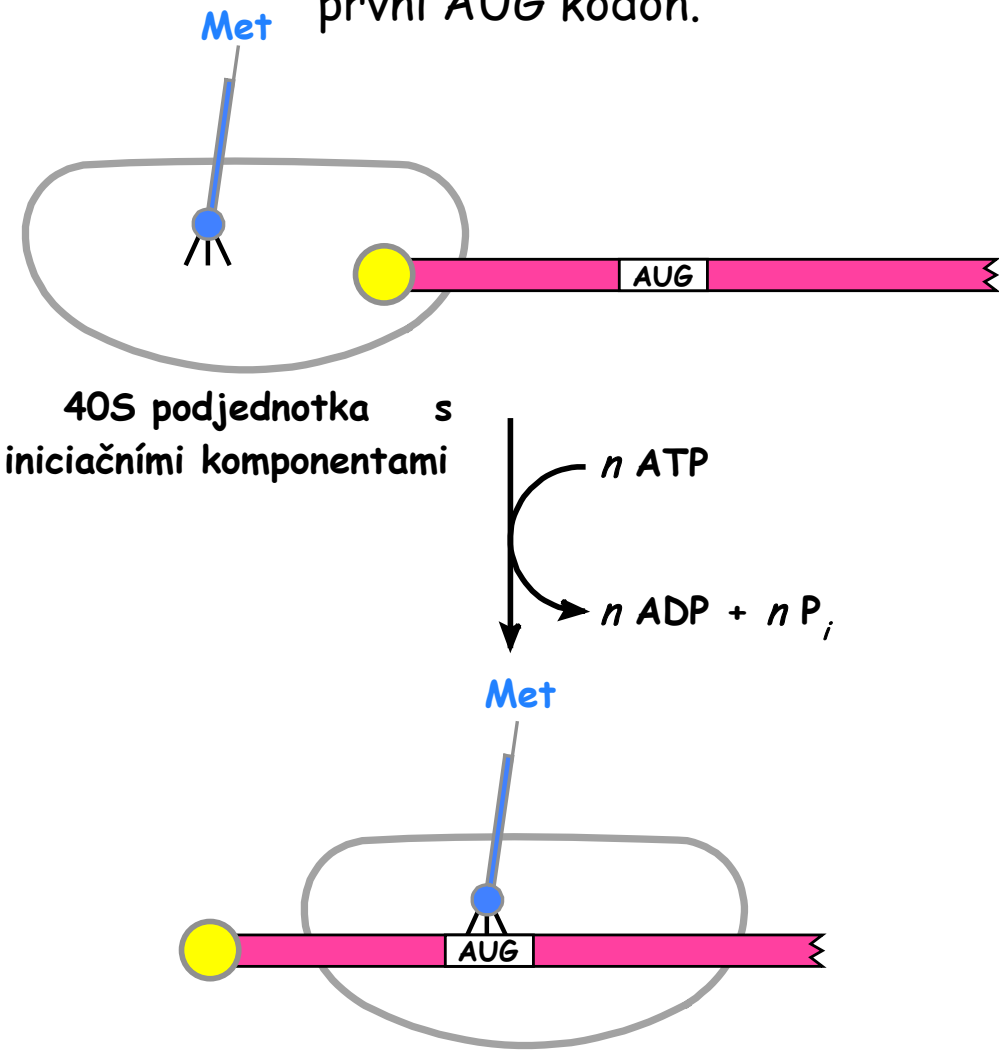
Eukaryotní iniciace translace

Iniciace translace začíná nástupem komplexu obsahujícího 40S a Met-tRNA na 5´ konec (cap) mRNA.



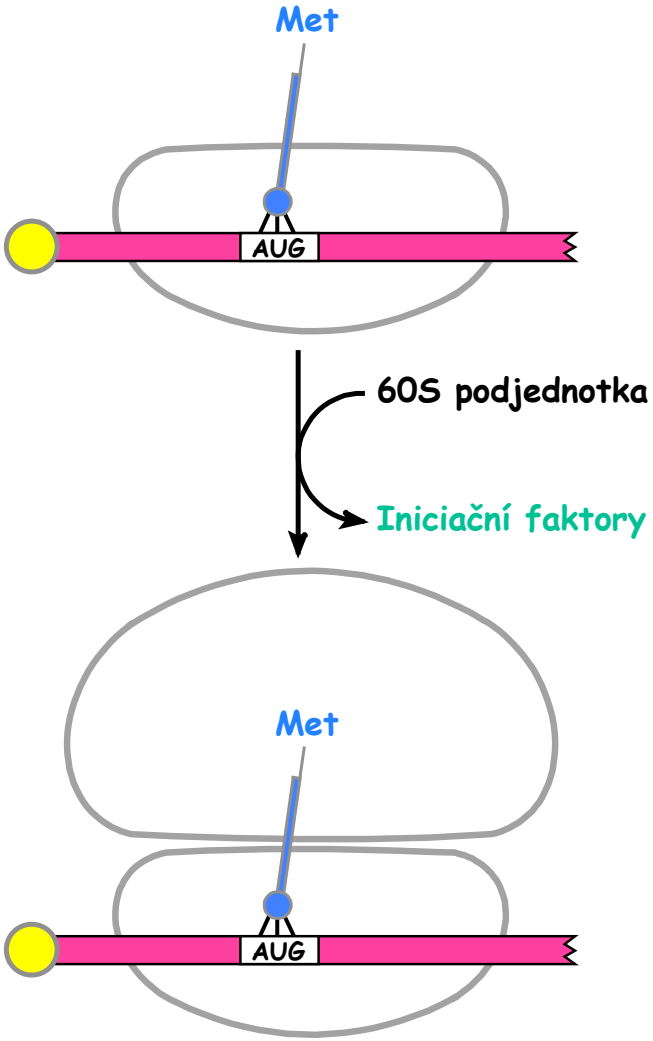
Eukaryotní iniciace translace

Poháněn hydrolýzou ATP projíždí komplex mRNA až do místa, kde narazí na první AUG kodon.



Eukaryotní iniciace translace

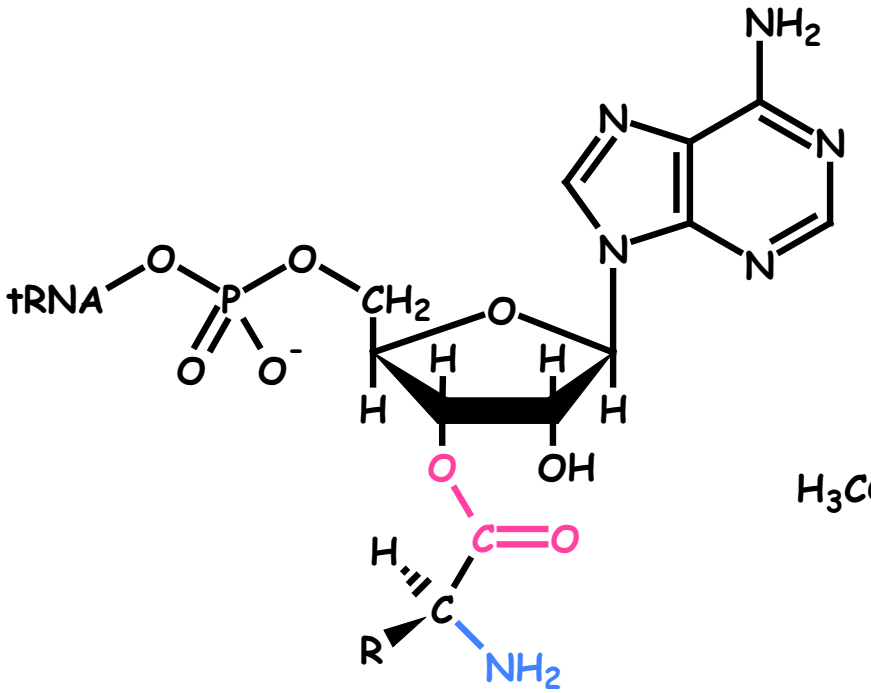
Poté vstupuje 60S podjednotka za tvorby kompletního ribosomu 80S.



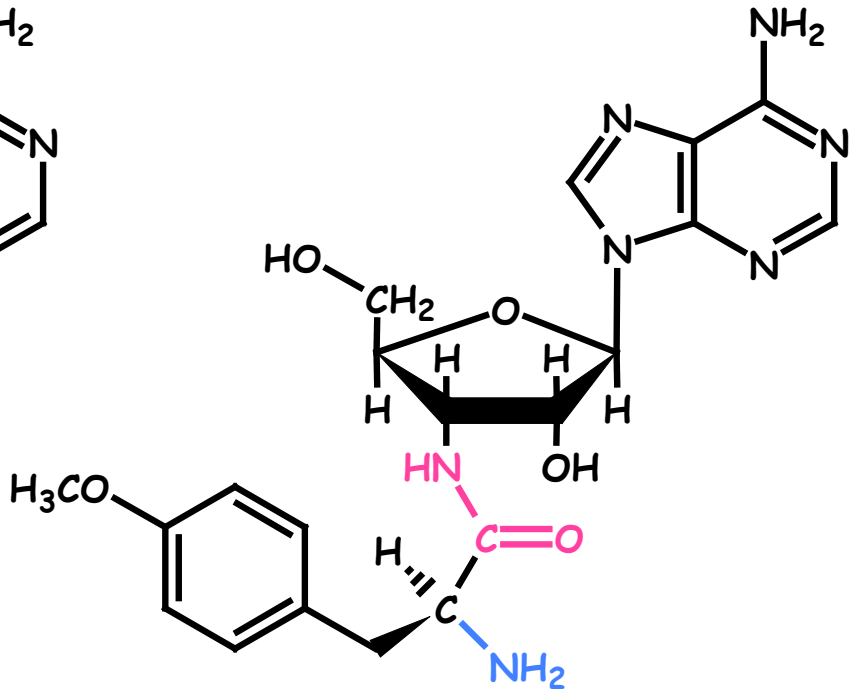
80S iniciační komplex

Antibiotika jako inhibitory proteosyntézy

Puromycin je analog terminální aminoacyladenylátové části aminoacyl-tRNA. Vstupuje do místa *A* a zabraňuje vstupu aminoacyl-tRNA (pro- i eukaryota).



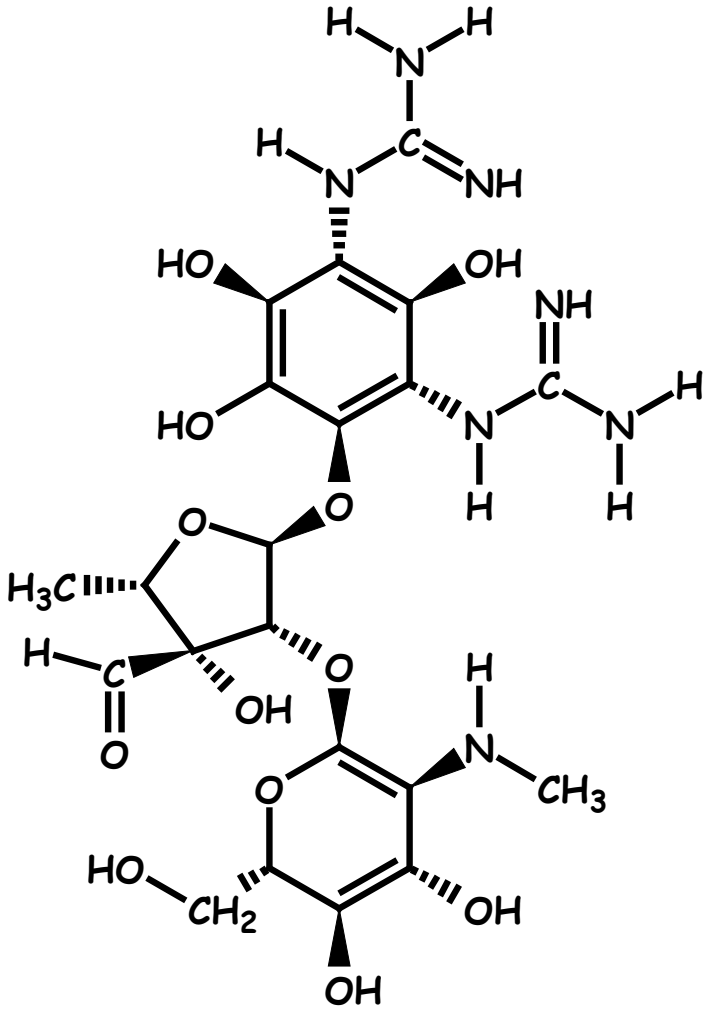
Aminoacyl-tRNA



Puromycin

Streptomycin - silně bázický trisacharid

- interferuje s vazbou formylmethionyl-tRNA na ribosomy a brání správné iniciaci.



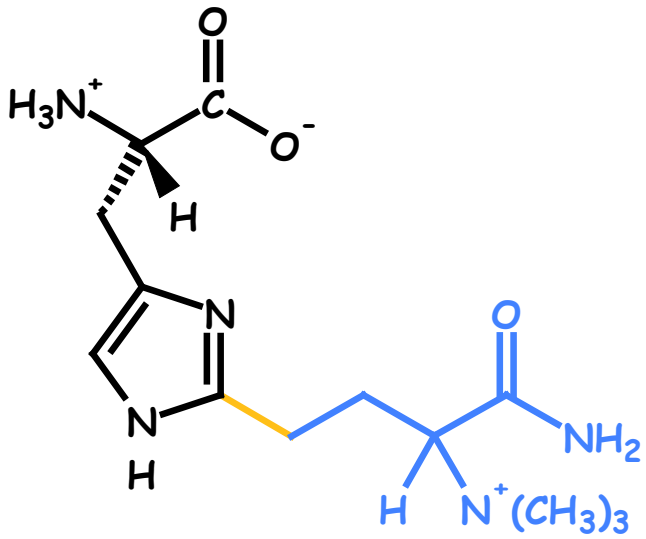
STREPTOMYCIN

Antibiotika – inhibitory syntézy proteinů

Antibiotikum	Působení
Streptomycin a jiné aminoglykosidy	Inhibice iniciace (prokaryota)
Tetracyklin	Vazba na 30S, inhibice vazby aminoacyl-tRNA (prokaryota)
Chloramfenikol	Inhibice peptidyltransferasy 50S (prokaryota)
Cykloheximid	Inhibice peptidyltransferasy 60S (eukaryota)
Erythromycin	Vazba na 50S, inhibice translokace (prokaryota)
Puromycin	Způsobuje předčasnou terminaci, působí jako analog aminoacyl-tRNA (pro- i eukaryota)

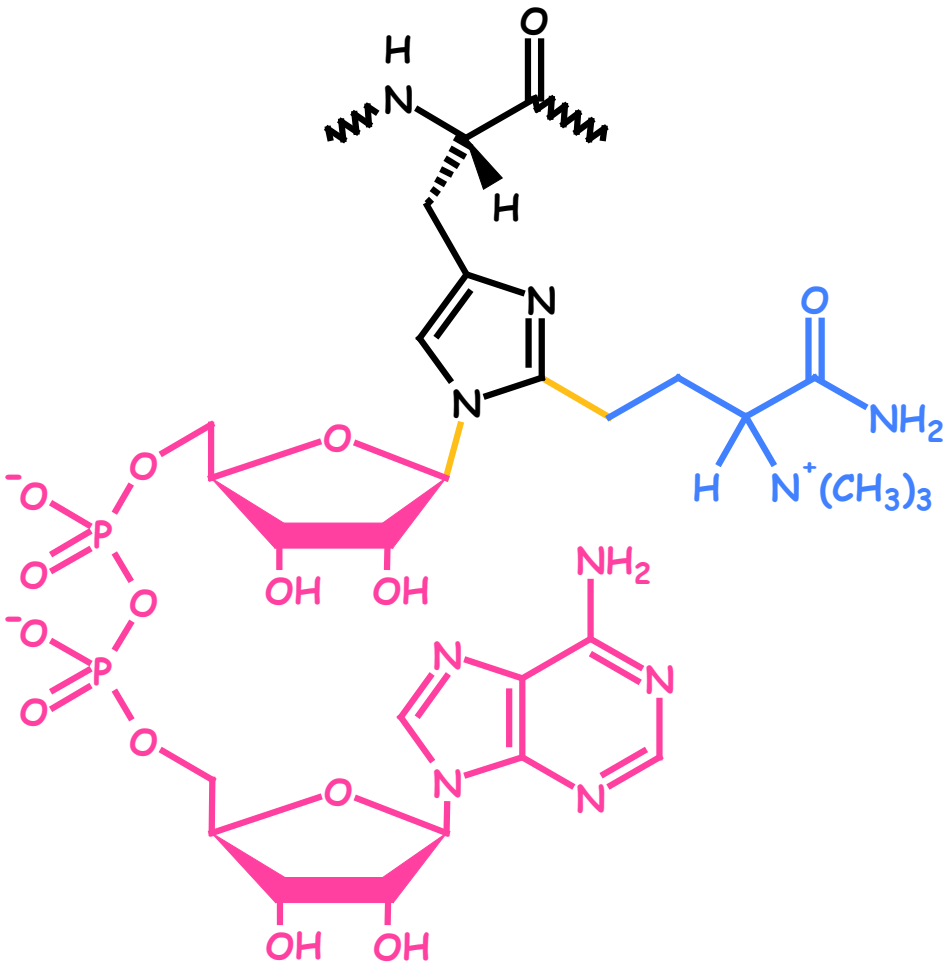
Toxin záškrtu blokuje proteosyntézu u eukaryot

- Proteinový toxin je produkován baktérií *Corynebacterium diphtheriae*, která se množí v horních cestách dýchacích infikované osoby.
- Po vniknutí toxinu do buňky je štěpen na část **A**, 21 kDa fragment, a část **B**, 40 kDa fragment.
- Fragment **A** v cytosolu působí na EF2 formou ribosylace.
- Katalyzuje přenos ADP-ribosy z NAD^+ na modifikovanou aminokyselinu diftamid v elongačním faktoru 2 translokasy.
- Posttranslačně z His vytvořená aminokyselina diftamid.



Blokování translokace záškrtovým toxinem

Fragment A toxinu katalyzuje transfer ADP-ribosy z NAD^+ na diftamid.



ADP-RIBOSA

Animace - proteosyntéza

- http://www.youtube.com/watch?v=ztPkv7wc3yU&feature=related