

15.

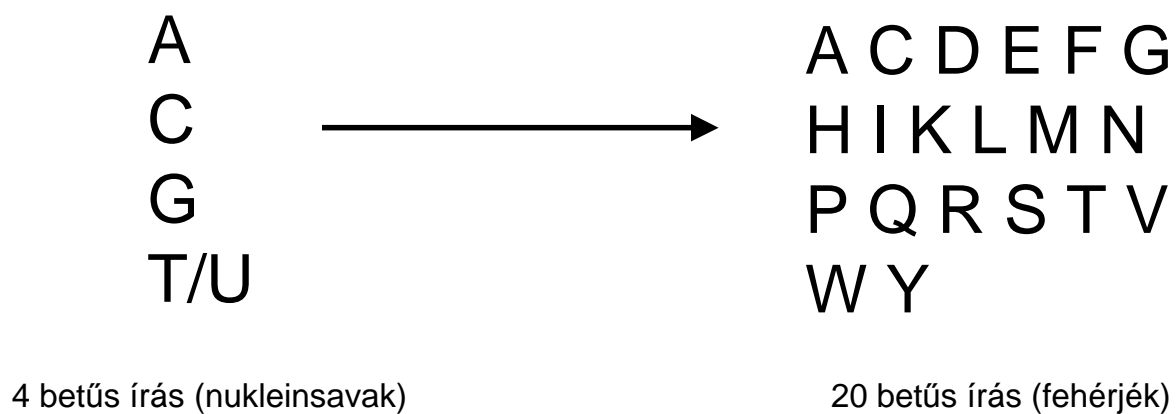
Fehérjeszintézis: transzláció

Fehérje lebontás (proteolízis)

1

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Transzláció – fordítás



2

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Amit már tudunk:

A genetikai kód

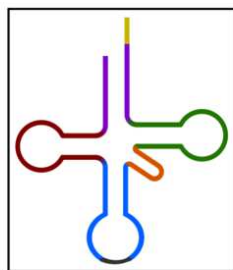
A genetikai kód redundáns (**degenerált**), azaz egy aminosavat többféle bázis triplett (**kodon**) is kódolhat.

		Second Position											
		T		C		A		G					
First Position	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Phe	Ser	Tyr	Cys
		T	T	T	T	T	T	T	T	Phe	Ser	Tyr	Cys
		T	T	T	T	T	T	T	T	Leu	Ser	Stp	Stp
		T	T	T	T	T	T	T	T	Leu	Ser	Stp	Trp
	C	C	C	C	C	C	C	C	C	Leu	Pro	His	Arg
		C	C	C	C	C	C	C	Leu	Pro	His	Arg	
		C	C	C	C	C	C	C	Leu	Pro	Gln	Arg	
		C	C	C	C	C	C	C	Leu	Pro	Gln	Arg	
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Ile	Thr	Asn	Ser
		A	A	A	A	A	A	A	Ile	Thr	Asn	Ser	
		A	A	A	A	A	A	A	Ile	Thr	Lys	Arg	
		A	A	A	A	A	A	A	Met	Thr	Lys	Arg	
	G	G	G	G	G	G	G	G	G	Val	Ala	Asp	Gly
		G	G	G	G	G	G	G	Val	Ala	Asp	Gly	
		G	G	G	G	G	G	G	Val	Ala	Glu	Gly	
		G	G	G	G	G	G	G	Val	Ala	Glu	Gly	

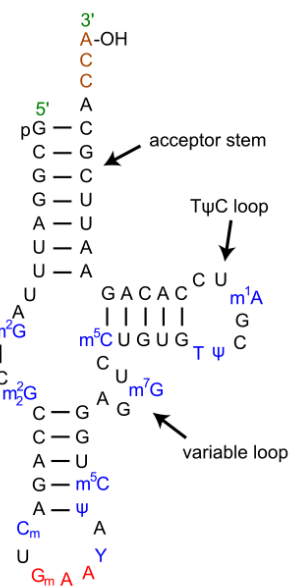
3

A tRNA

Élesztő tRNA^{Phe} szerkezete



DHU loop (dihidro uridint tartalmaz)



4

Amit már tudunk:

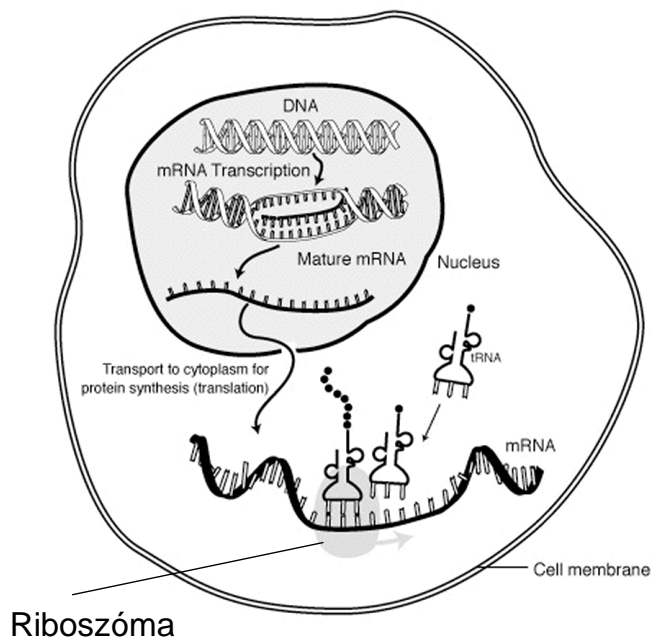
Start kodon és stop kodon



5

Amit már tudunk:

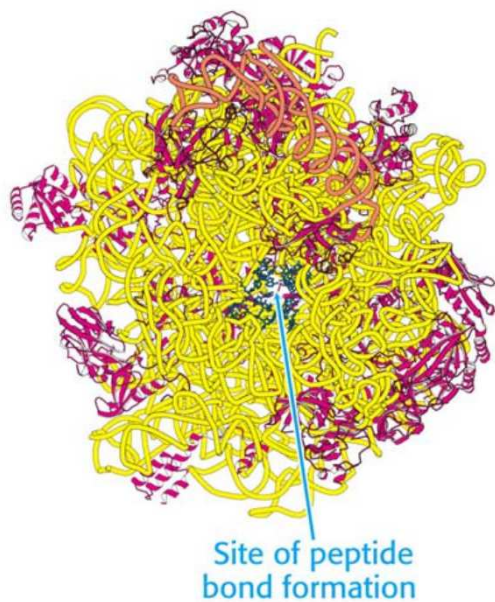
A fehérjék szintézise a riboszómán történik



Eukariótákban a transzkripció, és a splicing a sejtmagban, a transzláció a citoplazmában megy végbe

6

A fehérjeszintézis részleteinek felderítése a szerkezeti biokémia egyik legnagyobb teljesítménye



← A riboszóma szerkezete

RNS – sárga

Fehérje – piros

A riboszóma egy RNS enzim: ribozim

(Persze a fehérje komponensek is fontosak.)

riboszóma : RNS-fehérje komplex

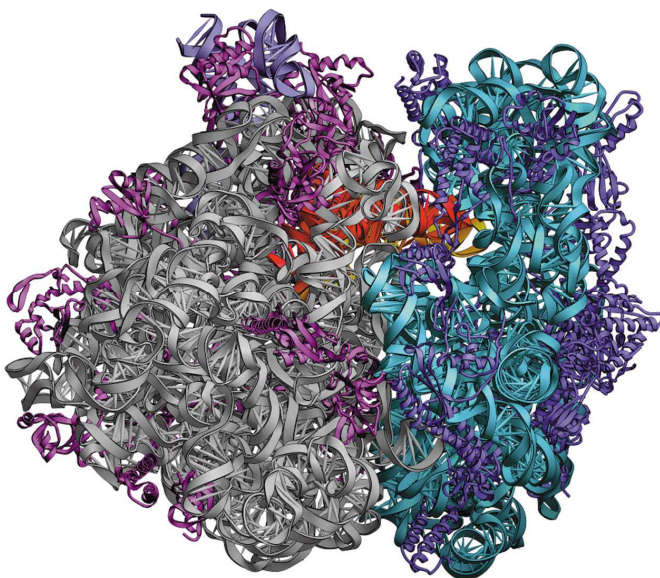
7

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Ada Yonath haja és a riboszóma szerkezete hasonló



Ada Yonath



8

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

A fehérjeszintézis folyamata és enzimei

Lépések:

- Aminoacil-tRNS-ek szintézise
- Iniciáció (kezdés)
- Elongáció (láncnövekedés)
- Termináció (láncvégződés)

Enzimek, faktorok:

- Aminoacil-tRNS szintetázok
- Iniciációs faktorok (IF)
- Riboszóma
- Elongációs faktorok (EF)
- Terminációs faktorok (RF: release factors)

9

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás - Dobó József

A fehérjeszintézis pontossága

TABLE 29.1 Accuracy of protein synthesis

Frequency of inserting an incorrect amino acid	Probability of synthesizing an error-free protein		
	Number of amino acid residues		
	100	300	1000
10^{-2}	0.366	0.049	0.000
10^{-3}	0.905	0.741	0.368
10^{-4}	0.990	0.970	0.905
10^{-5}	0.999	0.997	0.990

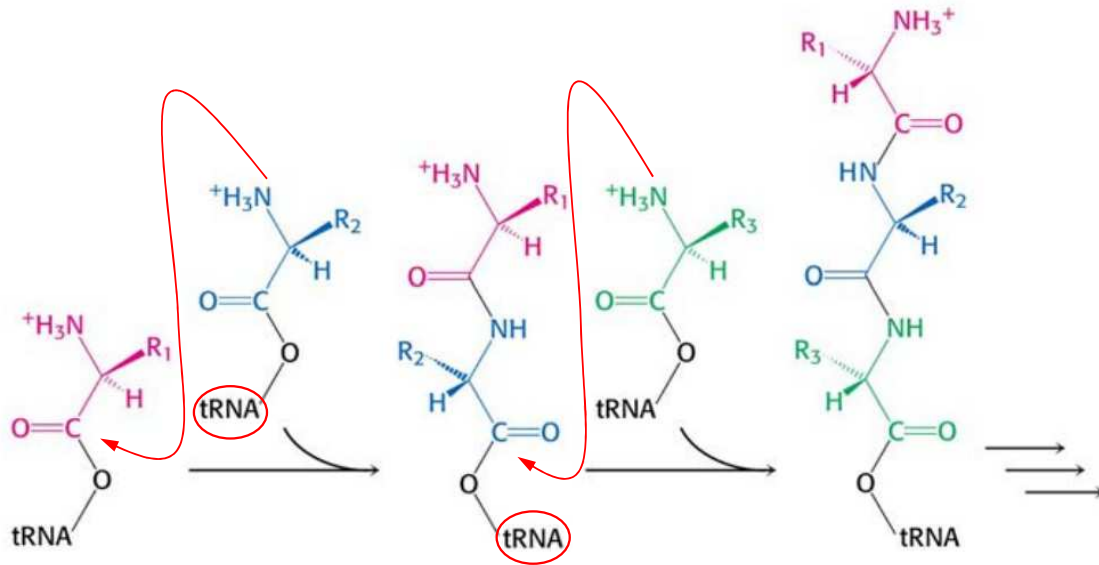
Hiba: $\sim 10^{-4}$ sebesség \rightarrow \leftarrow pontosság

(Replikáció: 10^{-8} , Hibajavítás után: 10^{-10})

10

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás - Dobó József

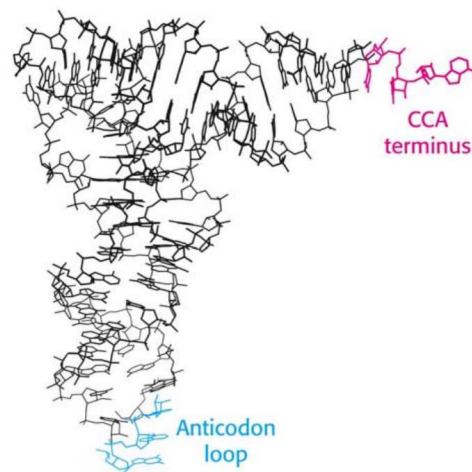
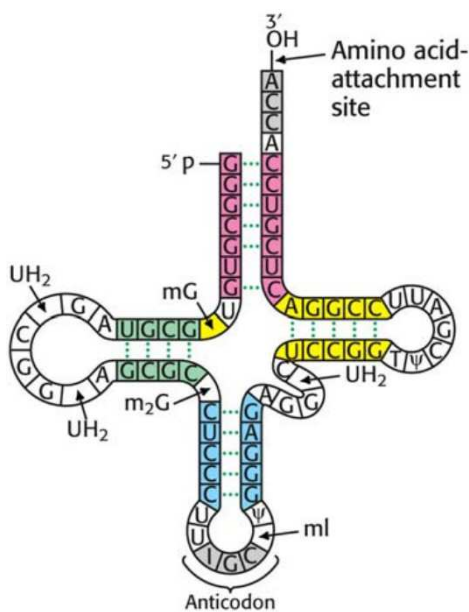
A peptidlánc épülése



Építőkövek: aminoacil-tRNS-ek ← „aktivált aminosavak”

11

Különbé tRNS-ek léteznek



1965: az első tRNS szekvencia élesztő **tRNS^{Ala}**

1974: az első tRNS szerkezet élesztő **tRNS^{Phe}**

L alak

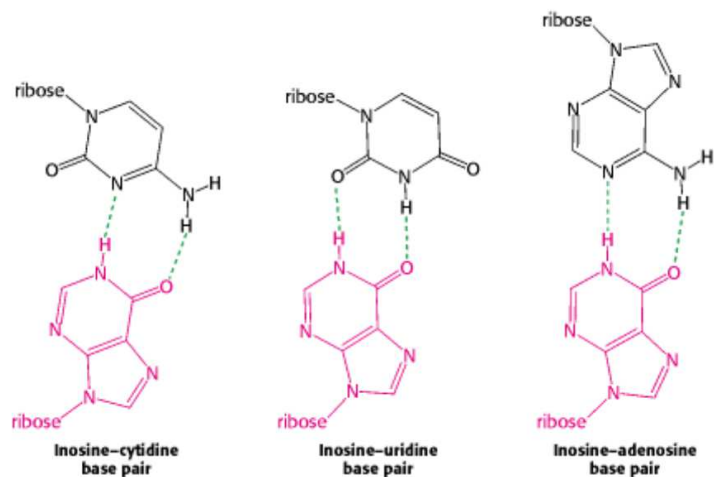
12

Az antikodon 3. bázisa többféle kodonnal képezhet párt

Wobble hypothesis („lötyögési” elmélet)

TABLE 29.3 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



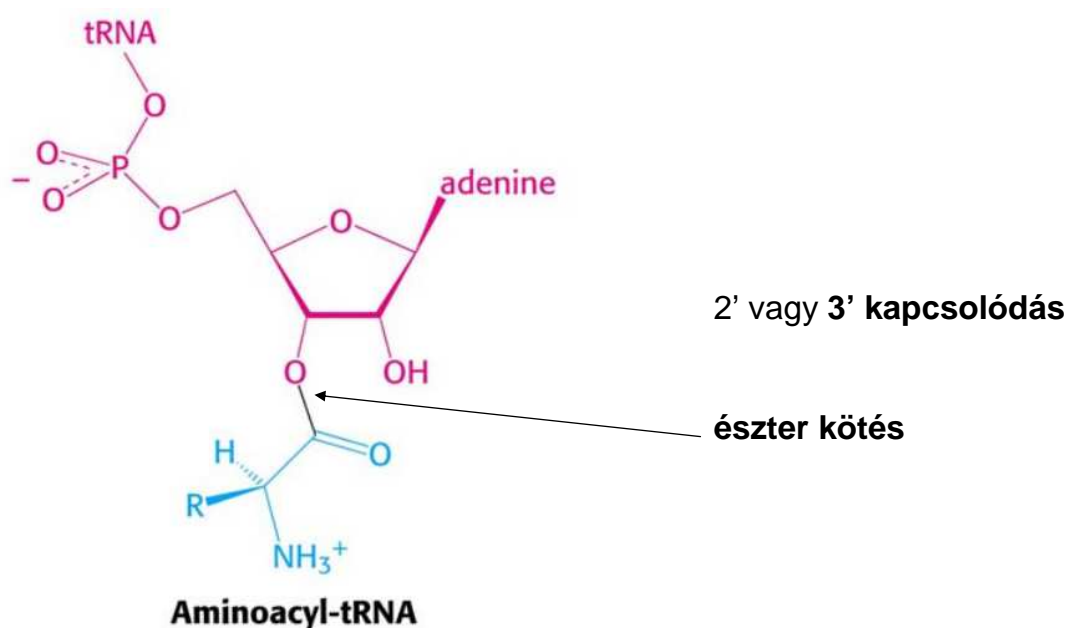
Tehát **nem kell annyiféle tRNS típus ahány kodon van**, de **legalább annyiféle kell ahány aminosav van**. (Kb. 40-45-féle van egy tipikus élőlényben.)

Némely aminosavnak többféle antikodonú tRNS-e is van.

(A tRNS gének száma a típusok számánál nagyobb !! pl. E. coli ~ 84 tRNS gén.)

13

Az aminoacil-tRNS-ek



14

Az aminoacil-tRNS szintetázok a genetikai kód valódi felismerői

TABLE 29.2 Classification and subunit structure of aminoacyl-tRNA synthetases in *E. coli*

Class I	Class II
Arg (α)	Ala (α_4)
Cys (α)	Asn (α_2)
Gln (α)	Asp (α_2)
Glu (α)	Gly ($\alpha_2\beta_2$)
Ile (α)	His (α_2)
Leu (α)	Lys (α_2)
Met (α)	Phe ($\alpha_2\beta_2$)
Trp (α_2)	Ser (α_2)
Tyr (α_2)	Pro (α_2)
Val (α)	Thr(α_2)

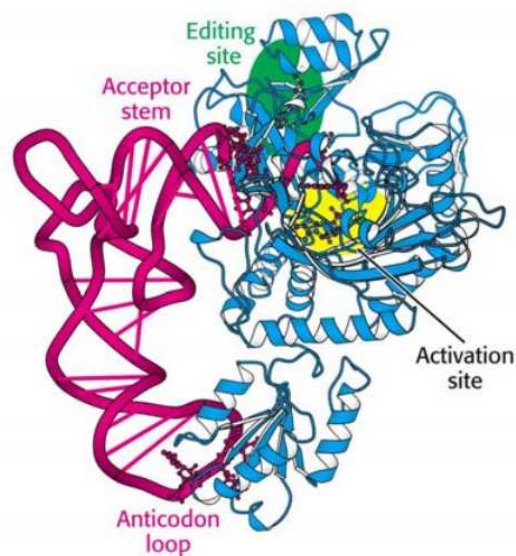
Egy adott fajban legalább annyiféle aminoacil-tRNS szintetázra van szükség ahányféle aminosav van.

ATP kell a szintézishez.

15

Bizonyos aminoacil-tRNS szintetázok az antikodont ismerik fel

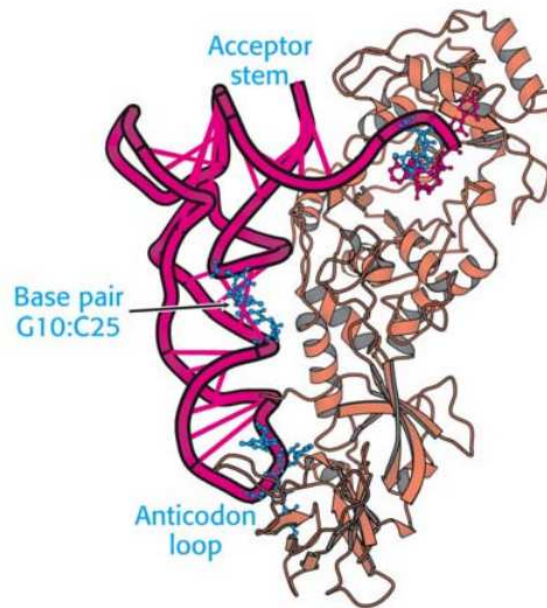
A Thr-tRNS szintetáz és a tRNS(Thr) közti komplex



16

Más aminoacil-tRNS szintetázok az antikodont és a tRNS egyéb részeit is felismerik

A Gln-tRNS szintetáz és a tRNS(Gln) közti komplex



17

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

A legtöbb aminoacil-tRNS szintetáz rendelkezik hibajavító mechanizmussal

Az aminoacil-tRNS szintetázok a genetikai kód valódi felismerői → fontos a pontosság

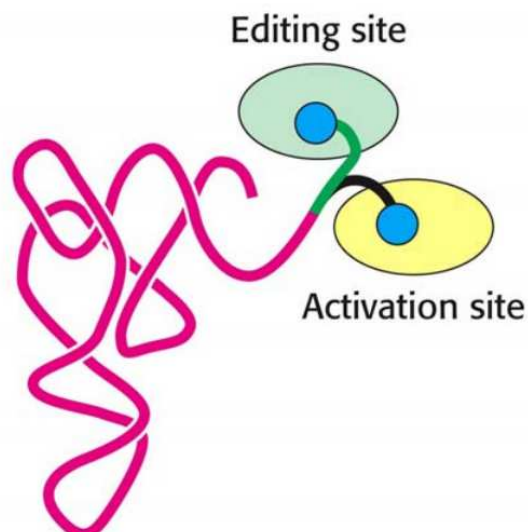
A tRNS „farokcsóválása” az enzim két kötőhelye közt

Analógia:

DNS polimerázok

„proofreading”

(Példa: Thr, Val, Ser megkülönböztetése)



18

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

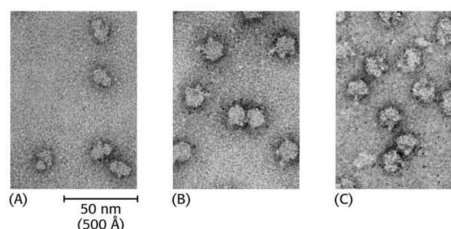
A fehérje szintézis helye : a riboszóma

	Kis alegység	Nagy alegység	Riboszóma
Prokarióta	30S RNS: 16S Fehérje: 21 féle	50S RNS: 5S, 23S Fehérje: 34 féle	70S
Eukarióta	40S RNS: 18S Fehérje: ~30 féle	60S RNS: 5S, 28S, 5.8S Fehérje: ~50 féle	80S

E. coliban a sejt szárazanyagtartalmának **25%-át** a **riboszómák** teszik ki.

A továbbiakban a **prokarióta fehérjeszintézissel** foglalkozunk részletesen.

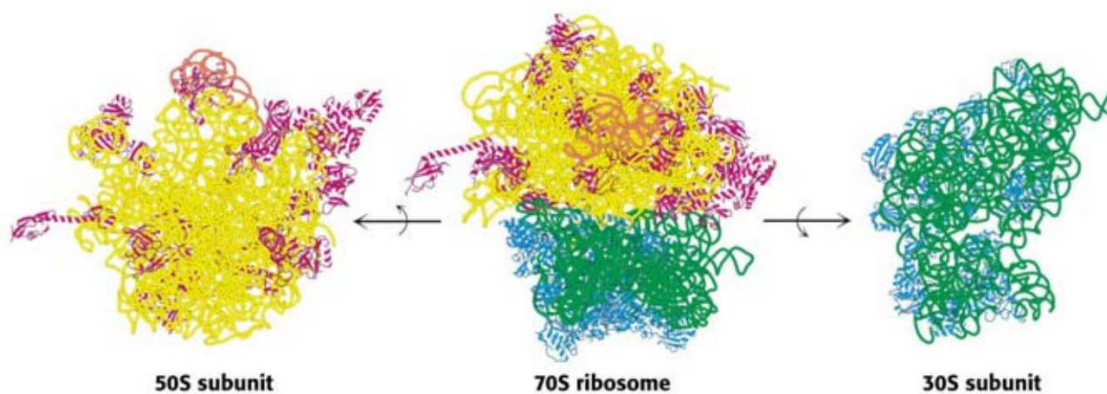
30 S, 50 S és 70 S riboszómák elektronmikroszkópos felvételei



19

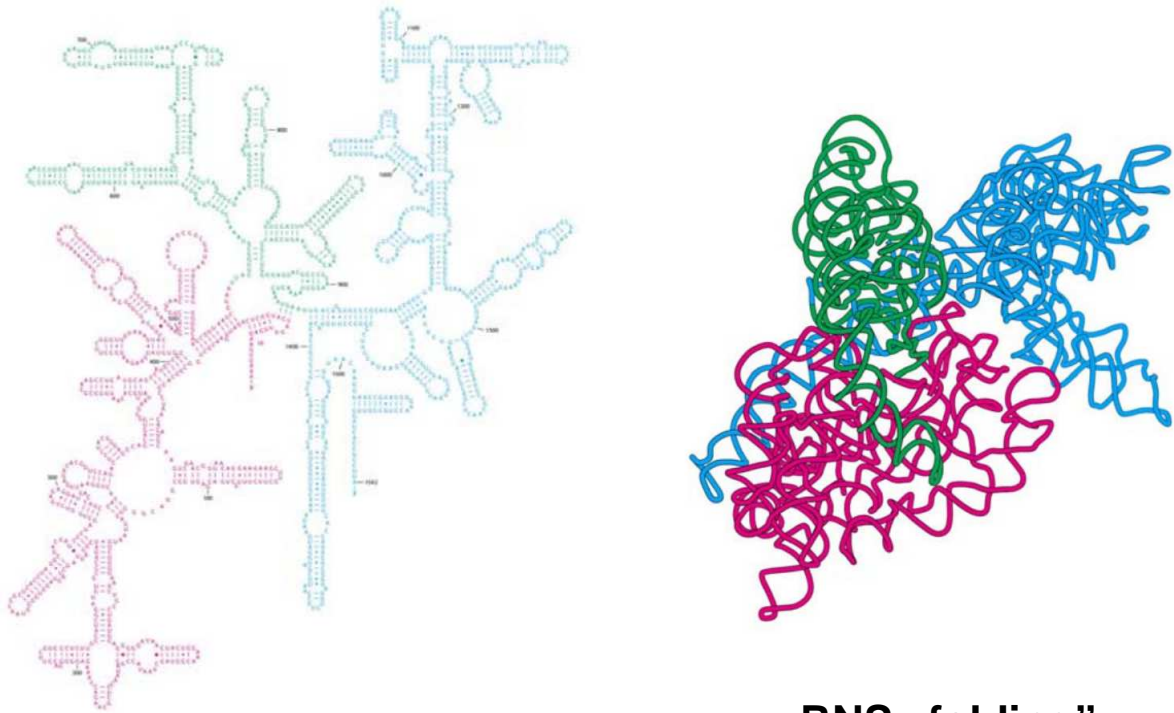
Ma már a riboszómák térszerkezete is ismert

(Nobel díj 2009)



20

A 16S rRNS szerkezete: másodlagos – harmadlagos



RNS „folding”

21

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Iniciáció prokariótákban

5'	3'		
AGCAC	GAGGGG	AAAUCUGAUGGAACGCUAC	<i>E. coli trpA</i>
UUUGGAU	GGAGUG	AAACGAUGGCGAUUGCA	<i>E. coli araB</i>
GGUAAC	CAGGUAAC	AAACCAUGCGAGUGUUG	<i>E. coli thrA</i>
CAAUUC	CAGGGUGGU	GAAUGUGAAACCAAGUA	<i>E. coli lacI</i>
AAUCU	UGGAGGCUU	UUUUAUGGUUCGUUCU	ϕ X174 phage A protein
UAACU	AAGGAUGAA	AUGCAUGUCUAAGACA	Q β phage replicase
UCCU	AGGAGGUU	UGACCUAUGCGAGCUUUU	R17 phage A protein
AUGUAC	UAAGGAGGU	UGUAUGGAACAACGC	λ phage <i>cro</i>
	Pairs with 16S rRNA	Pairs with initiator tRNA	

A **Shine-Dalgarno** szekvencia a 16S RNS-el képez komplementer párt.

Az ehhez legközelebb levő AUG (ritkán GUG) lesz a transzláció kezdete.

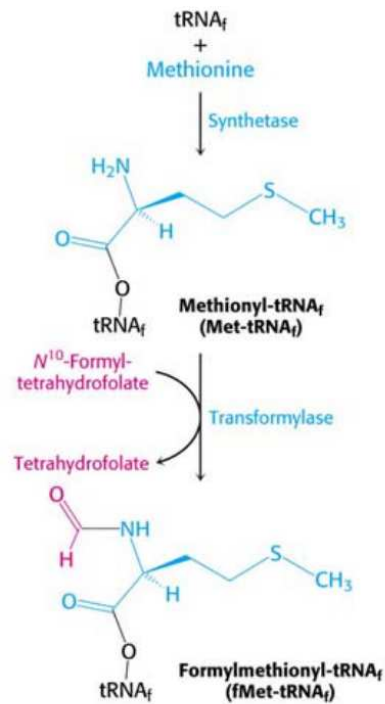
22

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Az indító tRNS: formil-metionil-tRNS_f



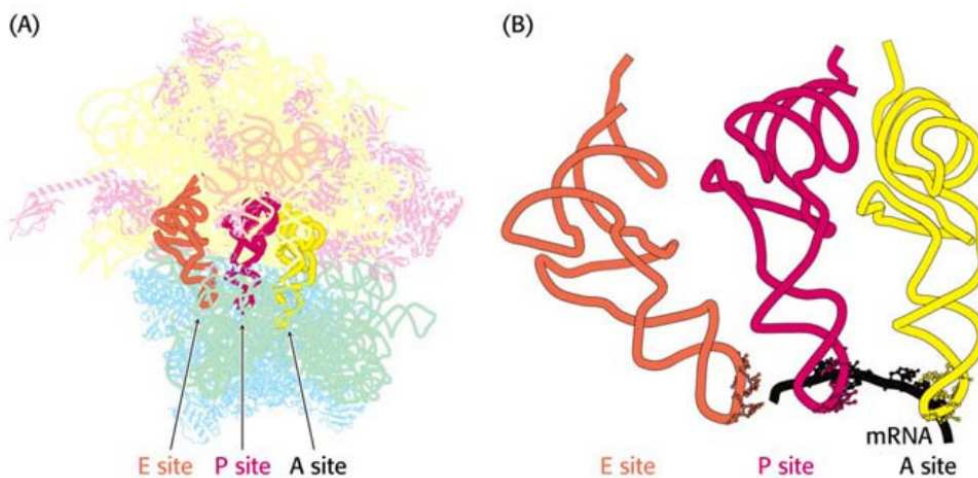
(a szintetáz közös, ami a metionin kapcsolását végzi a fenti tRNS-ekhez)



23

A riboszómán 3 kötőhely van

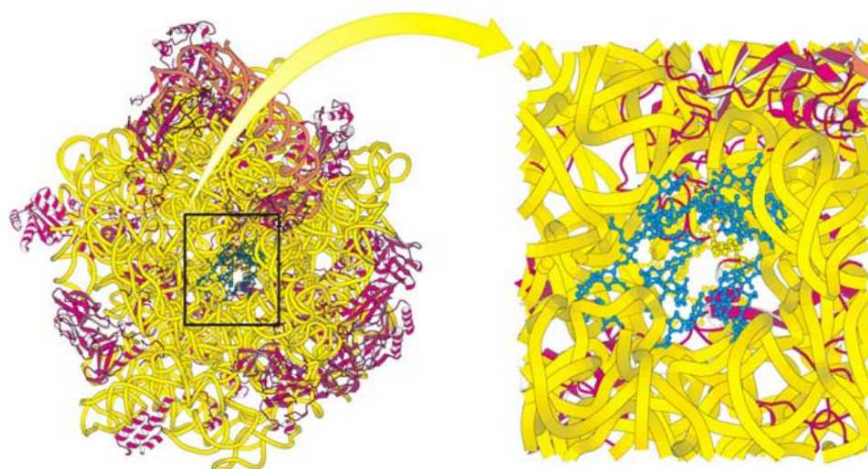
Röntgen szerkezet!



E: exit (kilépés) **P:** peptidil-tRNS **A:** amino-acil tRNS

24

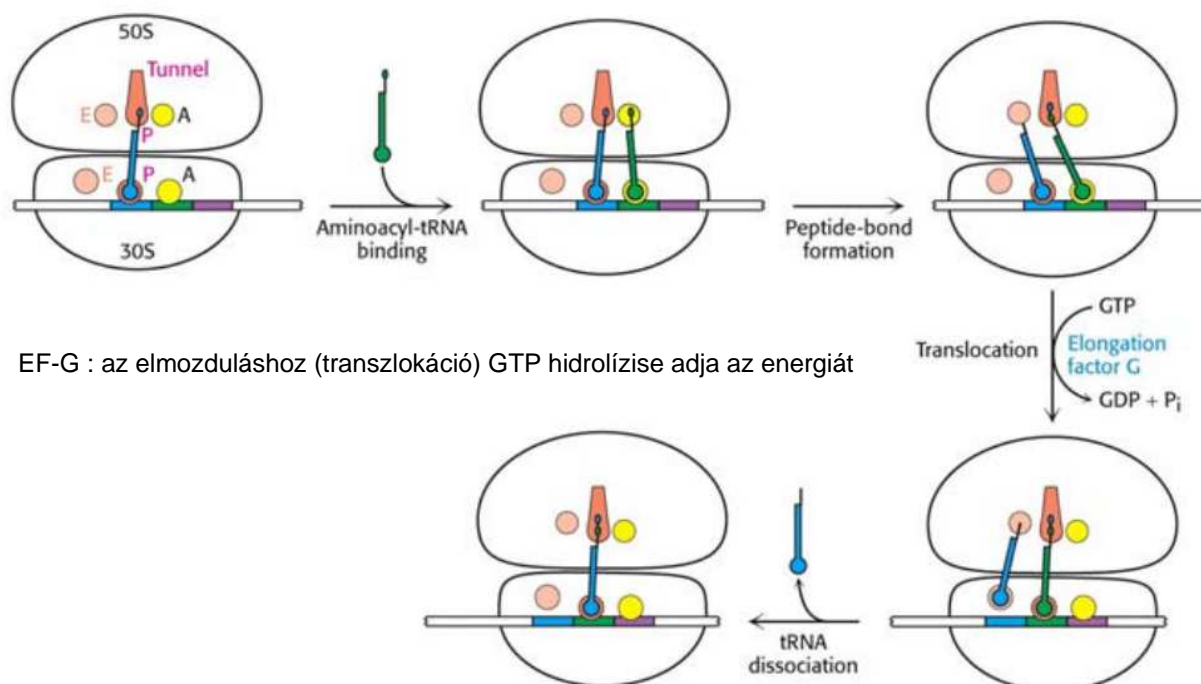
A polipeptid egy csatornán (alagúton) lép ki!



25

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

A fehérjeszintézis (elongáció) lényege

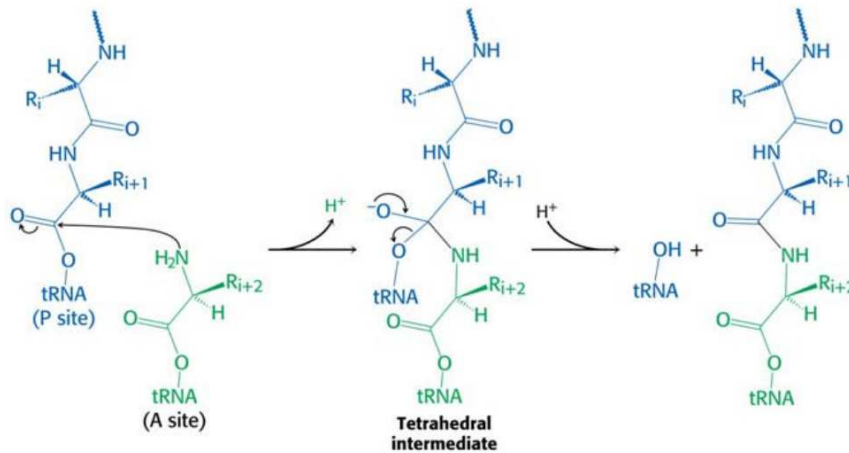


26

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

A peptidkötés képződése „aktivált” aminosavakból energetikailag kedvező spontán folyamat.

A katalízis lényege az építőkövek térbeli orientálása, az átmeneti állapot stabilizálása, és a **víz kizárása!**



A proteolízis ennek a reakciónak a fordítottja. Ott 1 enzim is elég.

A szintézishez viszont rengeteg komponens kell!

27

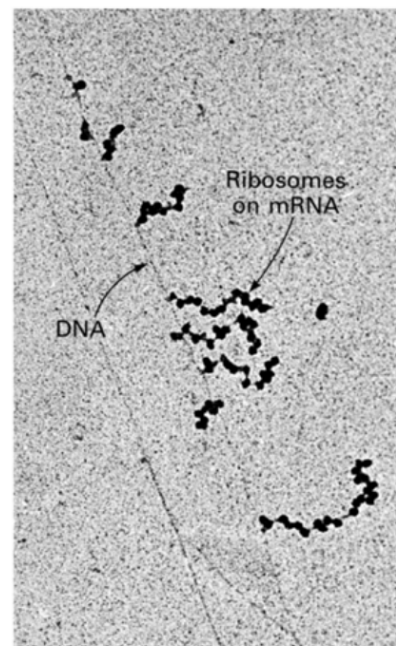
2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

A szintézis iránya

A szintézis az mRNS-en
 $5' \rightarrow 3'$ irányba halad

A peptidlánc az **amino (N-) terminális felől** a karboxi (C-) terminális irányba szintetizálódik.

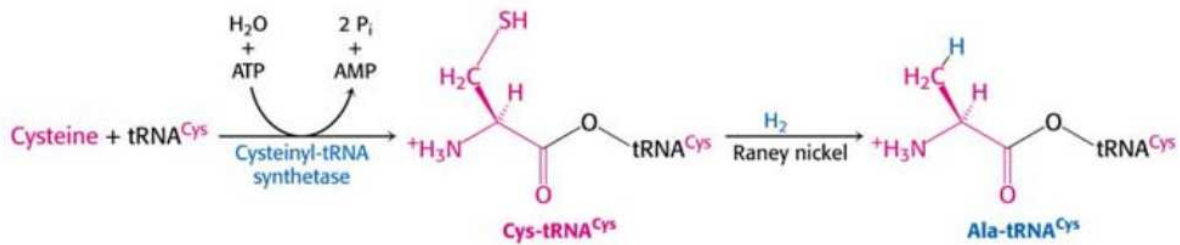
Prokariótákban a transzláció a transzkripcióval egy időben is végbemehet, sőt **egy mRNS-ről több riboszómán** is történhet egyszerre a fehérjeszintézis →



28

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

A riboszómán már csak a kodon-antikodon kölcsönhatás számít !



Mesterséges aminoacil-tRNS-ekkel akár **nem természetes aminosavak** is beépíthetők **in vitro** transzlációval

29

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

A fehérjeszintézisben részvevő további faktorok prokariótákban

Iniciációs faktorok:

IF1 , IF2 , IF3

Elongációs faktorok:

EF-Tu, EF-Ts, EF-G

Terminációs (release) faktorok:

RF1, RF2, RF3

GTP-ázok:

IF2,

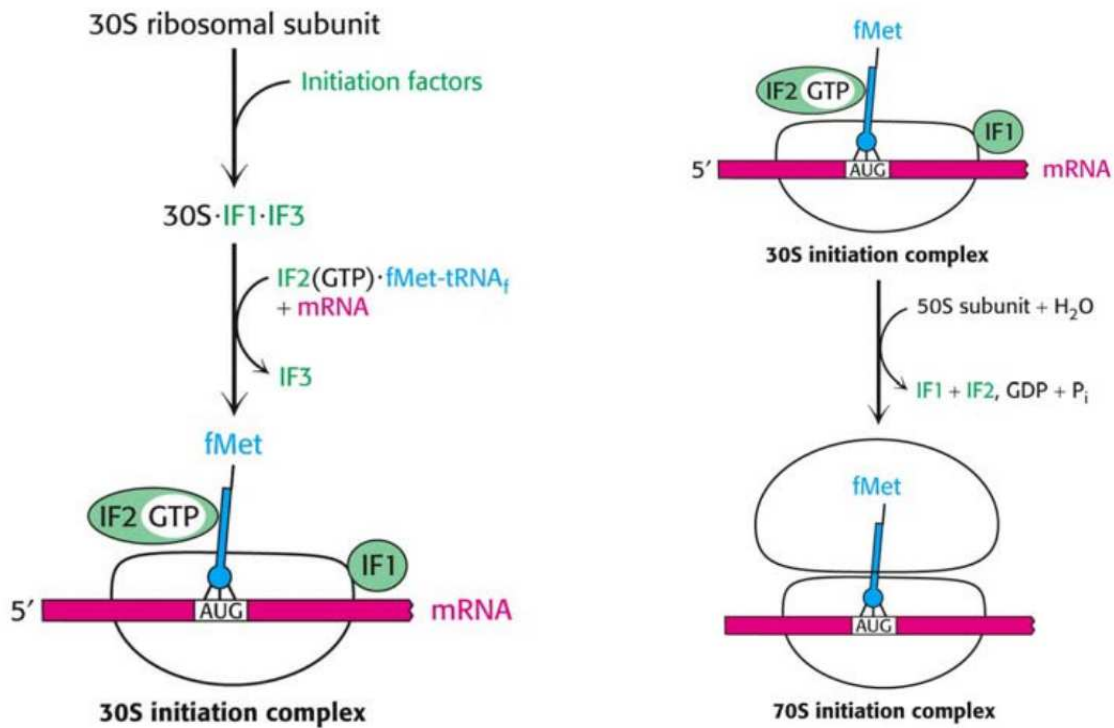
EF-Tu, EF-G

RF3

30

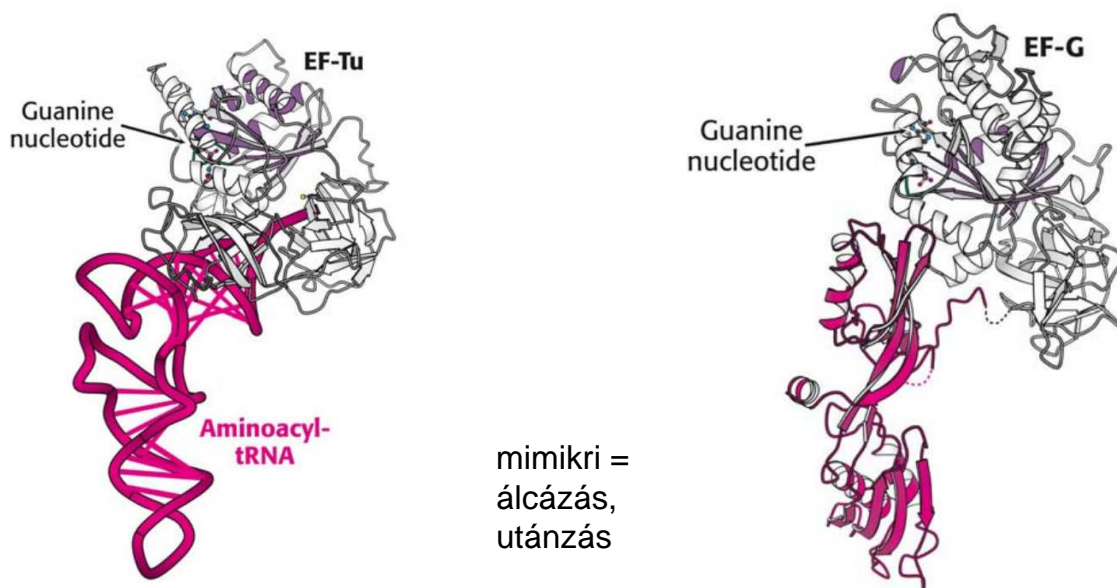
2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Iniciáció prokariótákban



31

Molekuláris mimikri: az EF-G szerkezete az EF-Tu aminoacil-tRNS komplexére hasonlít



Az **EF-Tu szállítja** az aminoacil-tRNS-eket a riboszómához.
Az **EF-G a transzlokációért** felelős.

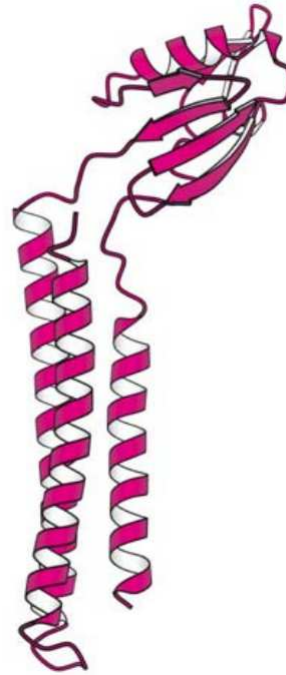
32

Termináció

Az RF1 és RF2
a stop kodonokat ismeri fel.

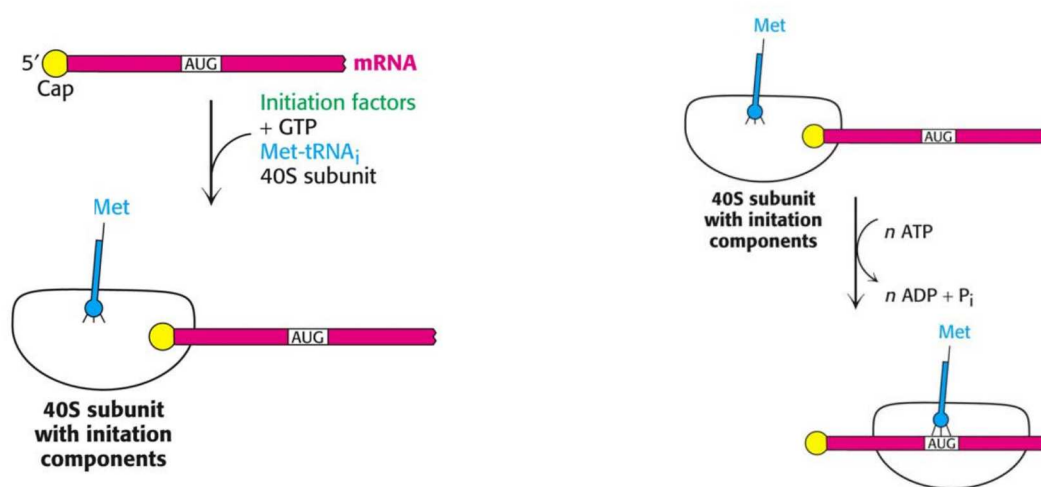
Hasonlítanak a tRNS
szerkezetéhez !

Új aminosav helyett
víz molekulát visznek a
szintézis helyére, ezzel
szabaddá válik a polipeptid
lánc.



33

A fehérjeszintézis eukariótákban főleg az iniciációban
különbözik a prokariótáktól

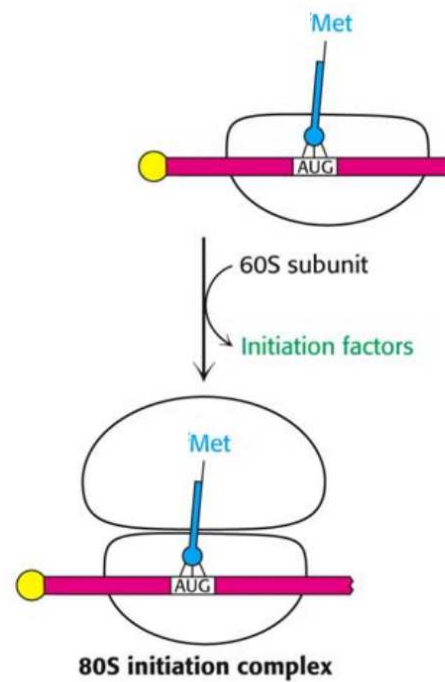


Az **5' Cap** hasonló szerepet tölt be, mint a **Shine-Dalgarno** szekvencia
prokariótákban. A szintézis az első AUG kodonnál kezdődik.

34

Az eukarióta riboszóma összeállt

**YouTube
videók !**



35

YouTube videók

Transzláció: **Translation**

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

A DNS-től a fehérjéig: **From DNA to Protein**

<http://www.youtube.com/watch?v=D3fOXt4MrOM>

36

Fehérje lebontás (proteolízis)

37

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

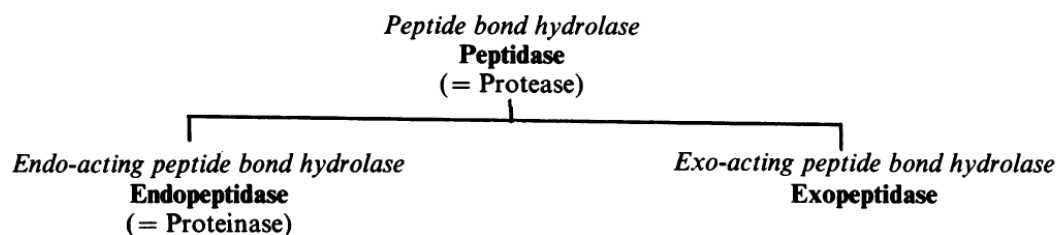
Proteolitikus folyamatok szerepe a szervezetben

- A táplálék (fehérjék) emésztése
- A már szükségtelen fehérjék lebontása
- **Biológiai folyamatok szabályozása !**

38

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Nómenklatúra



Scheme 1. The acceptable terms for the major types of proteolytic enzymes

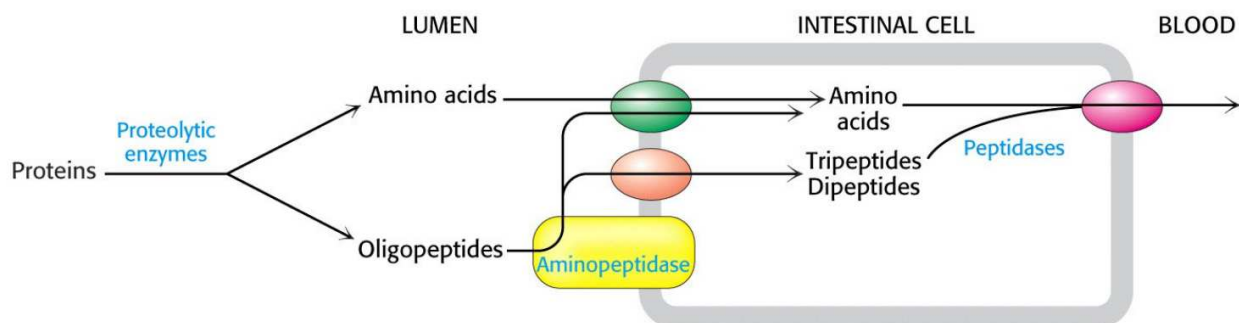
Biochem J. 1986 August 1; 237(3): 935

Nomenclature: protease, proteinase and peptidase.

A J Barrett and J K McDonald

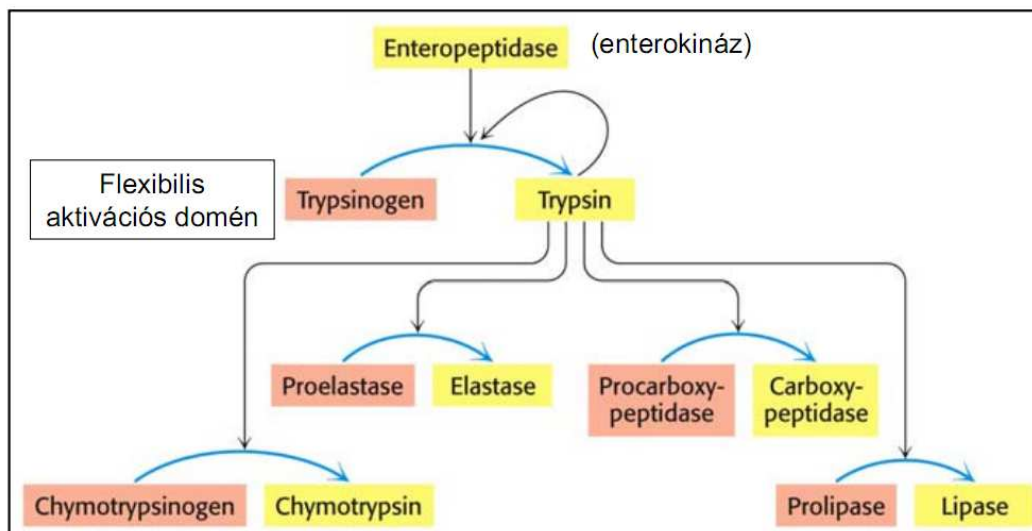
39

Emésztés



40

Az emésztő enzimek aktivációja



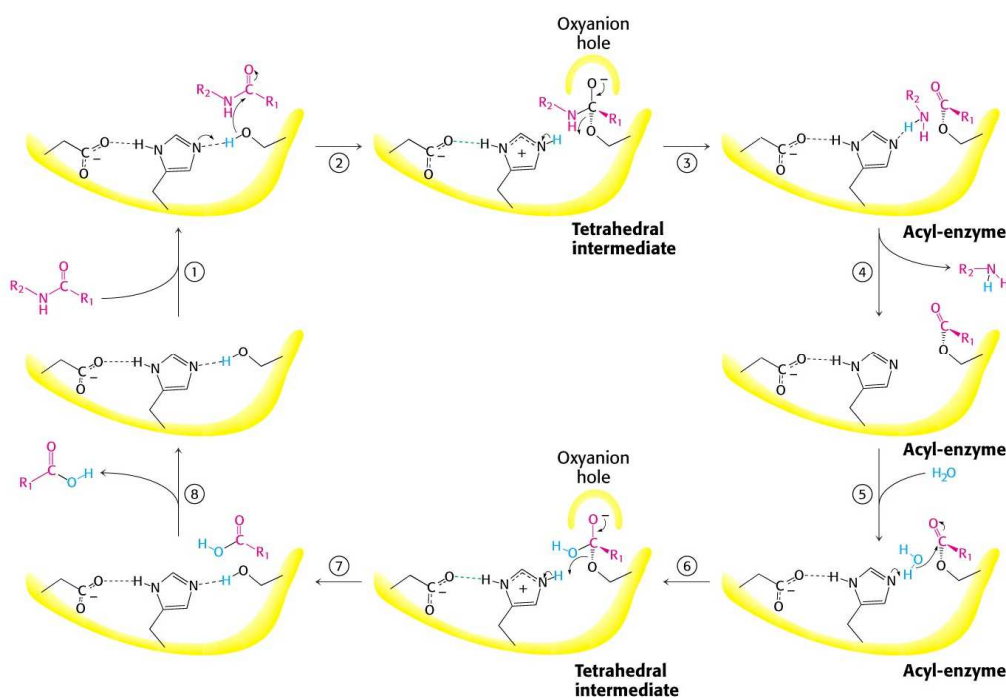
Tripszin, kimotripszin, elasztáz ← szerinproteázok

Inaktív előalak: proenzim, vagy zimogén

PI. proelasztáz, tripszinogén

41

A szerinproteázok működése

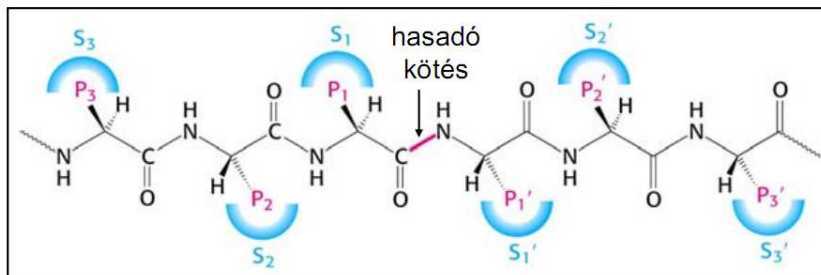


A katalízisben részvevő csoportok pontos térbeli elrendeződése biztosítja az enzim hatékony működését

42

A proteázok szubsztrátspecifitása

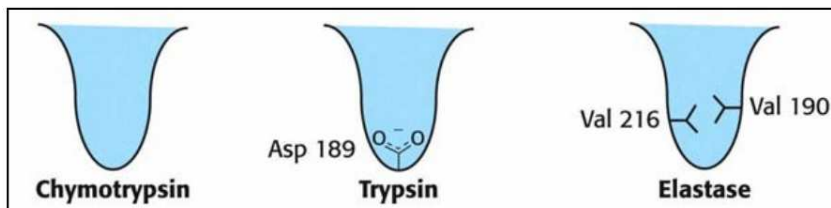
– P, P'-oldalláncok és S, S'-kötőzsebek döntik el



Schechter & Berger
nómenklatúra

P1 -- S1 stb.

– kimotripszin, tripszin és elasztáz: P_1 és S_1

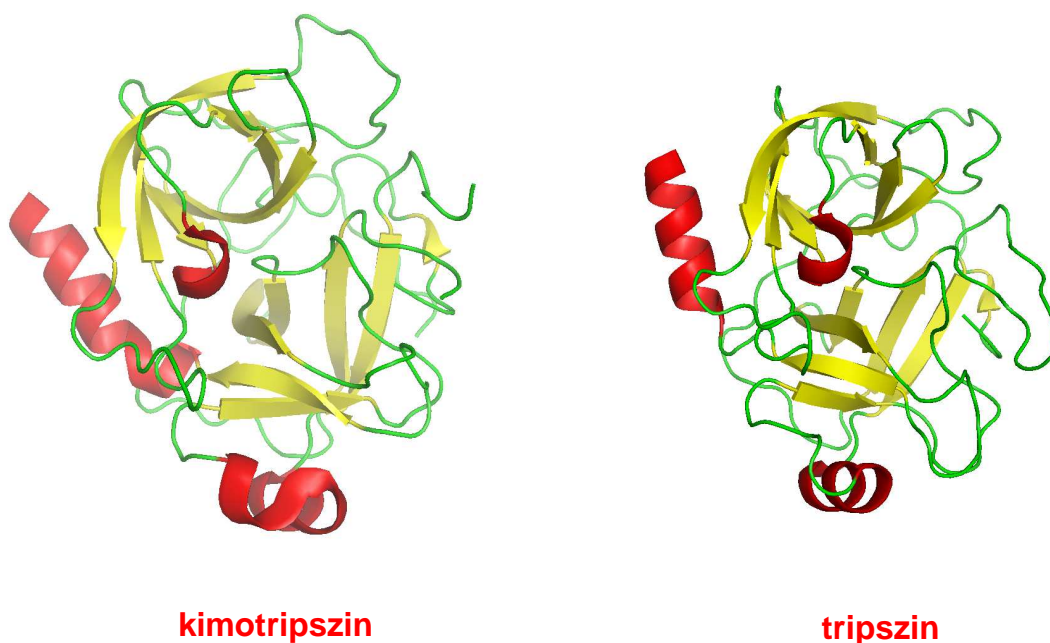


← S1 zseb

A kimotripszin nagy hidrofób, a tripszin pozitív, az elasztáz kicsi hidrofób aminosavak után hasít.

43

Divergens evolúció

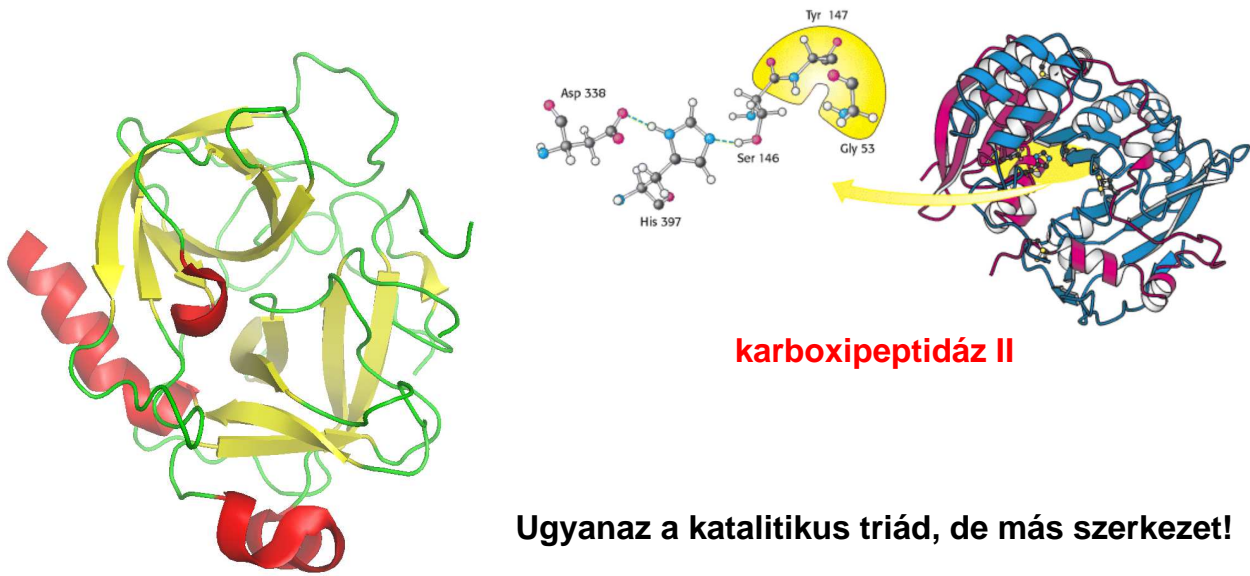


kimotripszin

tripszin

44

Konvergens evolúció



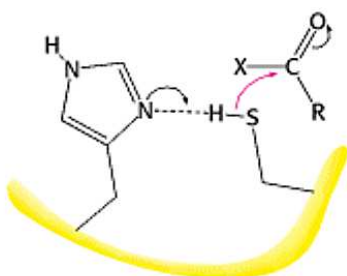
Másik példa: **szubtilizin**
(enzimes mosópor, bakteriális proteáz)

45

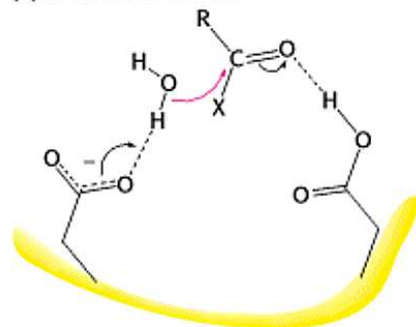
Proteázok más típusai

- Cys-proteázok (papain, katepszinek, kaszpázok)
- aszpartil-proeázok (renin,HIV-proteáz)
- metalloproteázok (termolizin, angiotenzin-konvertáló enzim)

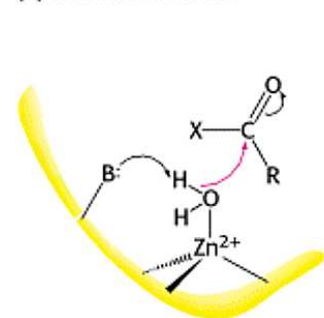
(A) CYSTEINE PROTEASES



(B) ASPARTYL PROTEASES



(C) METALLOPROTEASES

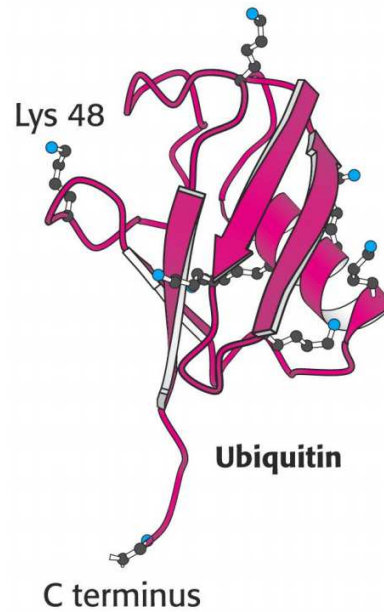


46

Fehérjelebontás a sejtekben

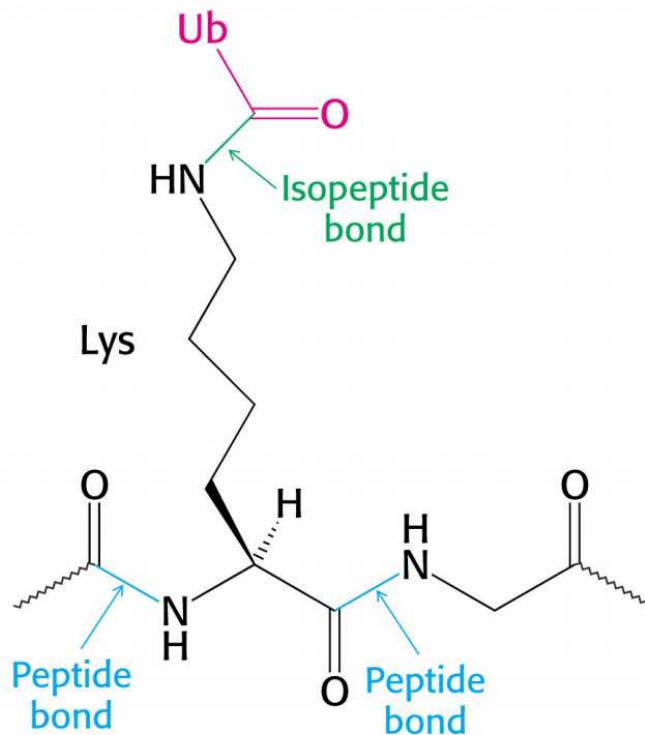
A lebontásra „ítélt”
fehérjék először
ubiquitinnel
jelölődnek meg.

**Csak eukariótákban
van!**



47

Az ubiquitin és a célfehérje között izopeptid kötés alakul ki.



48

A fehérjék felezési idejét nagymértékben meghatározza az N-terminális aminosav

TABLE 23.1 Dependence of the half-lives of cytosolic yeast proteins on the nature of their amino-terminal residues

Highly stabilizing residues ($t_{1/2} > 20$ hours)			
Ala	Cys	Gly	Met
Pro	Ser	Thr	Val
Intrinsically destabilizing residues ($t_{1/2} = 2$ to 30 minutes)			
Arg	His	Ile	Leu
Lys	Phe	Trp	Tyr
Destabilizing residues after chemical modification ($t_{1/2} = 3$ to 30 minutes)			
Asn	Asp	Gln	Glu

Krisztallinok:
szemlencsefehérjék

Egész életre szólnak!

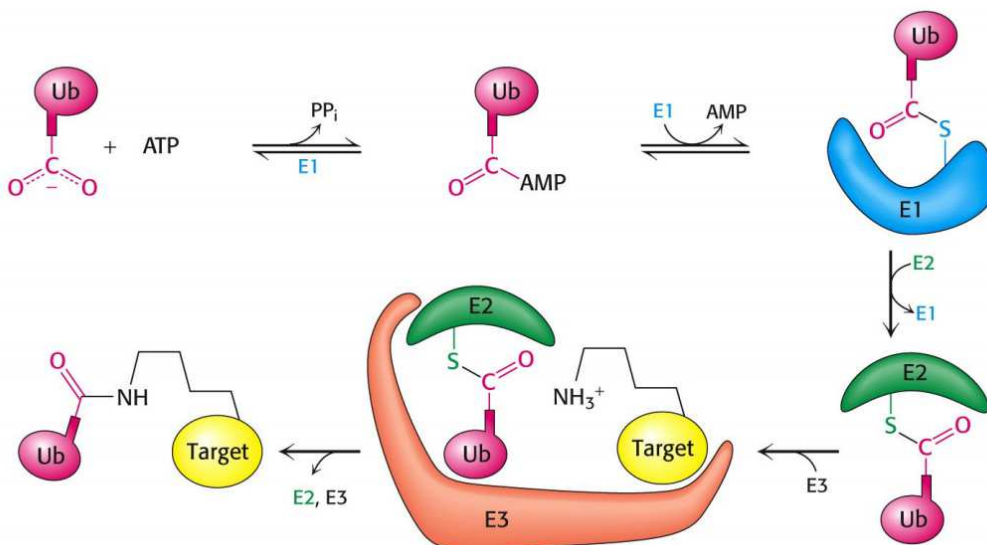
Vannak gyorsan lebomló
fehérjék:

pl. ornitin dekarboxiláz

49

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Az ubiquitin jelölésben három enzim vesz részt, Az E_1 enzim hatására az ubiquitin adenilálódik, majd az E_2 egy SH csoportjára tevődik át, végül az E_3 ubiquitin-protein ligáz kapcsolja izopeptid kötéssel az ubiquitint a célfehérje egy lizin oldalláncára.

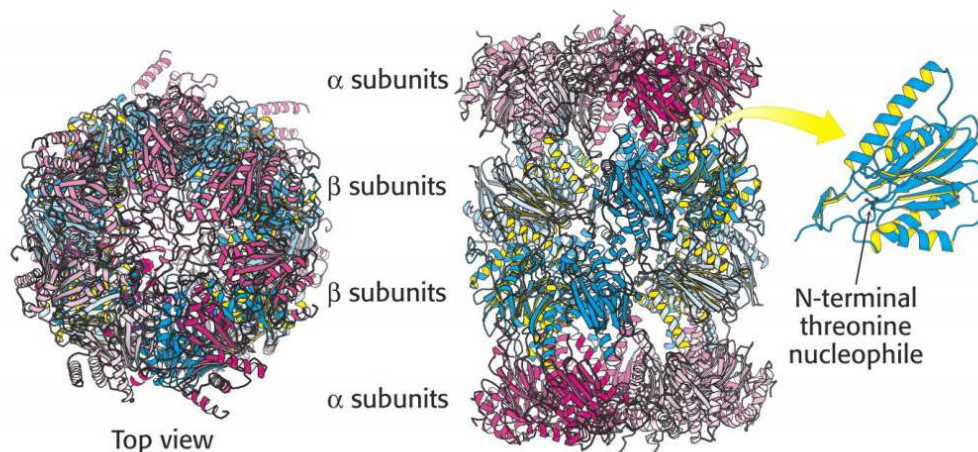


50

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Az ubiquitinnel jelölt fehérjék lebontása a proteaszómában történik

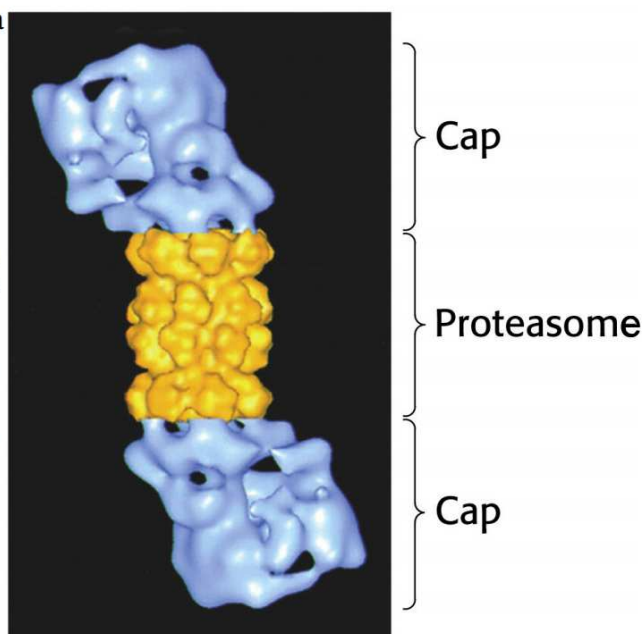
A 20 S proteaszóma 28 homológ α és β alegységekből épül fel négy egymás felett elhelyezkedő gyűrűben 7-7 alegység helyezkedik el. A proteáz aktivitás a hordó belsejében a β alegységeken mutatható ki



51

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás - Dobó József

A proteaszóma mindkét végén egy-egy 19 S szedimentációs állandójú regulátor sapka fehérjével van lezárva. A sapkafehérje is több alegységből épül fel van közöttük ubiquitin kötő fehérje és hat ATP-áz alegységet is kimutattak, melyek a P-loop NTP-áz családba tartoznak, A sapkának szerepe van a target unfoldingjában és a proteaszómába való bejuttatásában.



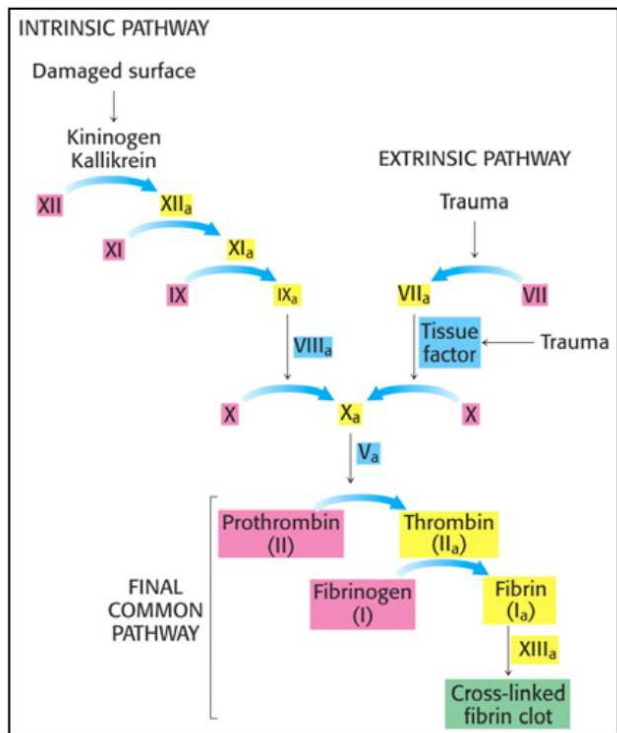
52

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás - Dobó József

A proteolízis szerepe biológiai folyamatokban

1. példa: a véralvadás

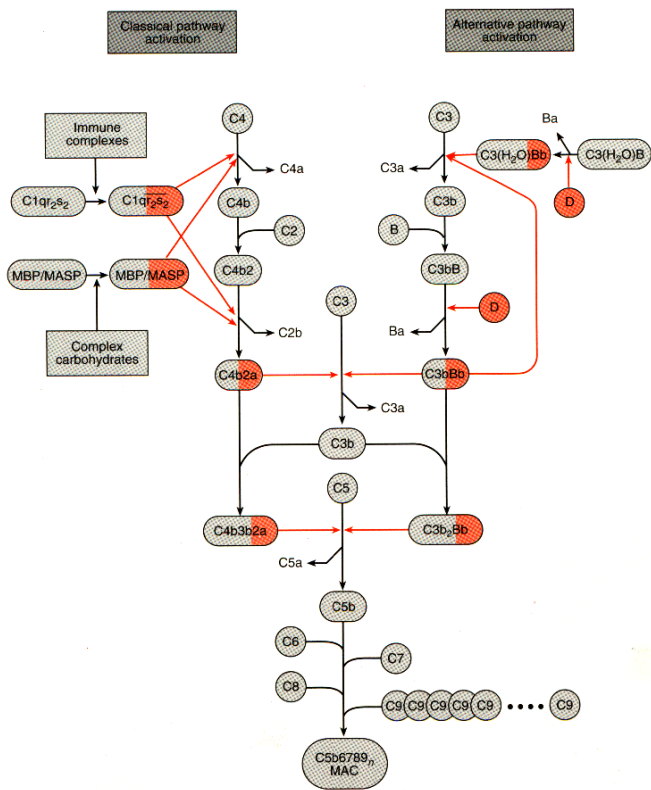
Proteolitikus kaszkád



A proteolízis szerepe biológiai folyamatokban

2. példa: komplement

Proteolitikus kaszkád



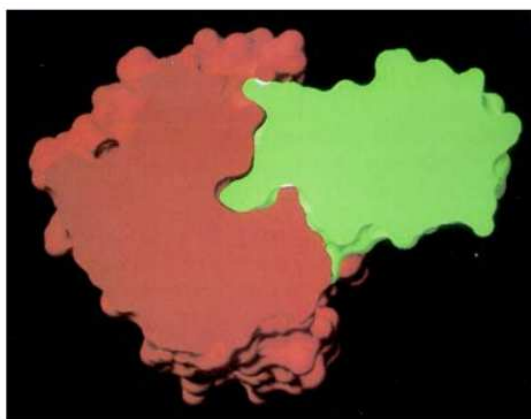
Proteázok gátlása I: kulcs-zár illeszkedés

Példa:

BPTI = bovine pancreatic trypsin inhibitor (marha pankreatikus tripszin inh.)

Tökéletes illeszkedés az aktív helyhez (a termék disszociációja gátolt)

$K_d \sim 10^{-13}$ M (nagyon erős kötődés)

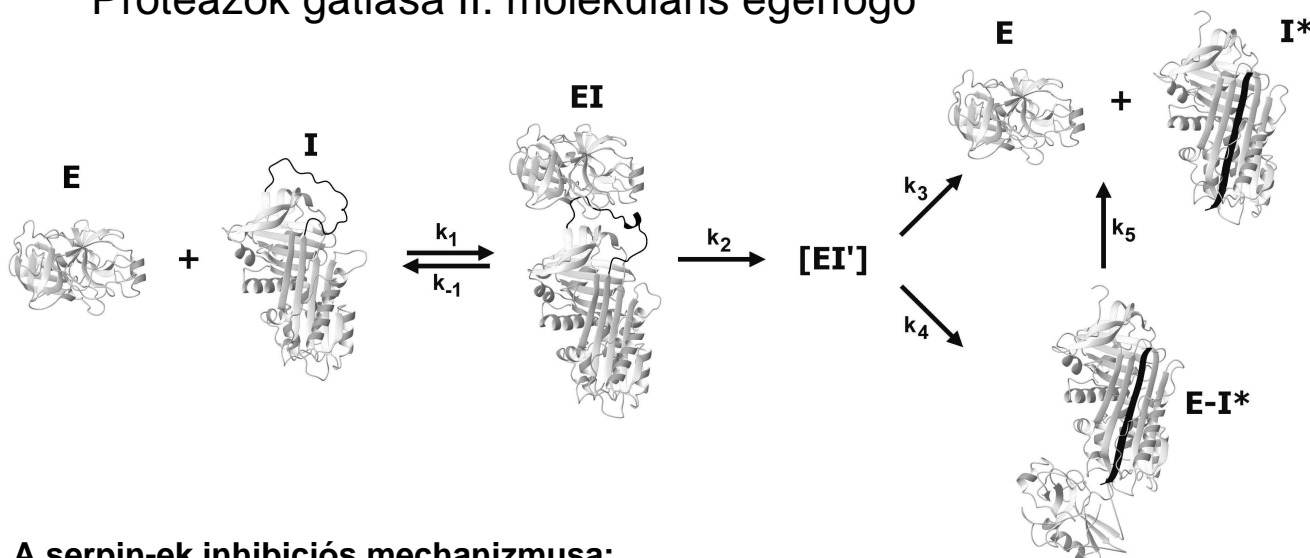


← tripszin (piros) – BPTI (zöld)
komplex

55

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Proteázok gátlása II: molekuláris egérfogó



A serpin-ek inhibíciós mechanizmusa:

- A reaktív hurkot (fekete) elhasítja a proteáz és létrejön az acil-enzim **[EI']** komplex.
- A hurok beékelődik egy béta lemezbe magával rántva a hasító proteázt.
- A katalitikus szerin pozíciója torzul, így egy **stabil, kovalens acil-enzim komplex (E-I*)** jön létre.

A serpin név eredete: serine protease inhibitor. (Vannak nem inhibitor serpin-ek is !)

A serpin-ek archetípusa: α_1 -proteináz inhibitor (1.5-3 g/l vérben).

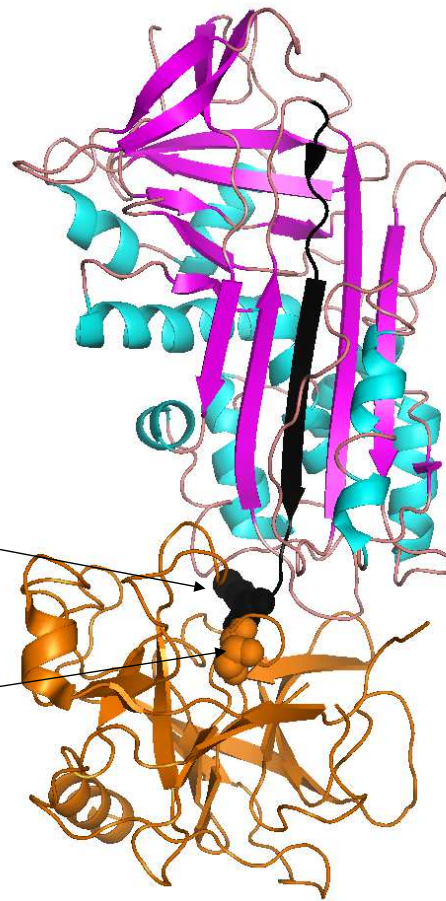
56

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

PDB kód: **2D26**
(serpin - proteáz kovalens komplex)

P1 hely (Met)

Aktív Ser



57

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Amit tudni illik

A Fehérjeszintézis: transláció és a Fehérje lebontás (proteolízis)
témakörből

Kémiai képletek:

szerin, hisztidin aszparaginsav, cisztein

Fogalmak:

transzláció, tRNS, kodon, antikodon, start kodon, stop kodon,
Shine-Dalgarno szekvencia, ribozim, riboszóma, A, P, E hely,
iniciáció, elongáció, termináció, elongációs iniciációs release faktorok

szerinproteáz, divergens evolúció, konvergens evolúció,
proenzim, zimogén, szubsztrát, szubsztrátkötő-zseb,
ubiquitin, proteaszóma,
inhibitorok: kulcs-zár inhibitorok, serpin

Módszerek:

In vitro transláció

58

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Kapcsolódó könyvfejezetek:

J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biochemistry 5th edition
W.H. Freeman and Co.

29. Protein synthesis

Az alábbi fejezetekből néhány válogatott rész:

9. Catalytic strategies (csak a proteolitikus enzimek rész)

10. Regulatory Strategies: Enzymes and Hemoglobin (csak a proteolitikus enzimek rész)

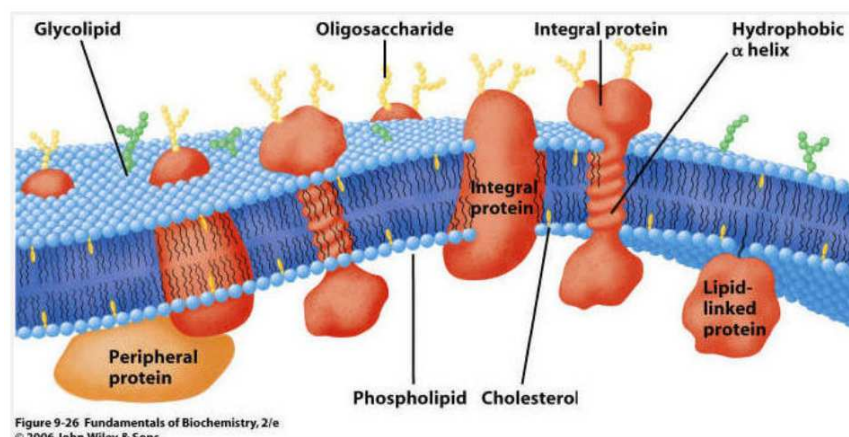
23. Protein Turnover and Amino Acid Catabolism (csak a proteolízis rész)

59

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Folyt. köv. ...

Lipidek és membránok



60

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

YouTube videók

Replikáció: **How DNA Copies Itself**

<http://www.youtube.com/watch?v=5Vefal0LrgE>

Transzkripció: **Transcription**

<http://www.youtube.com/watch?v=WsofH466lqk>

Transzláció: **Translation**

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

A DNS-től a fehérjéig: **From DNA to Protein**

<http://www.youtube.com/watch?v=D3fOXt4MrOM>