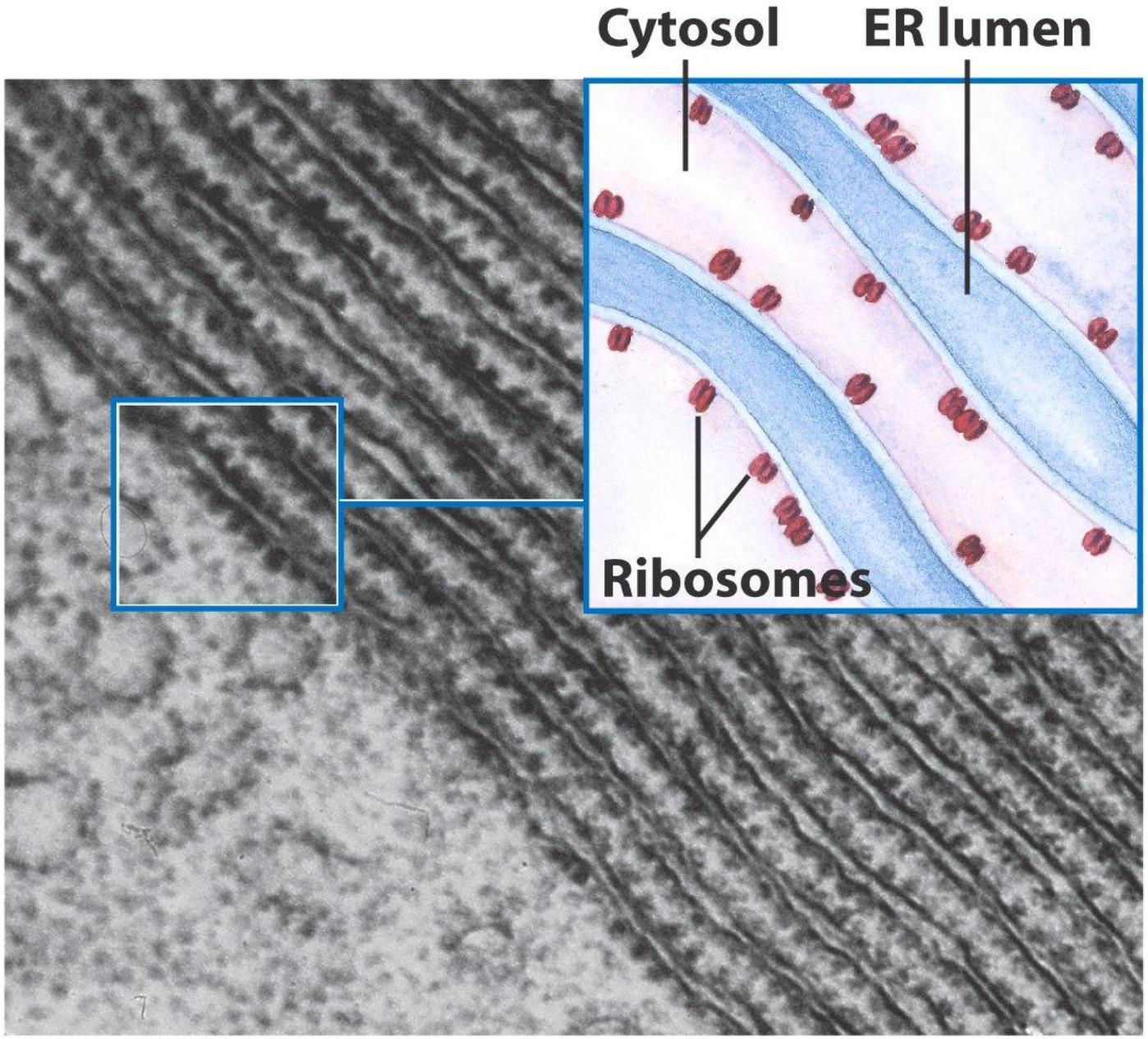
Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti

Translace, techniky práce s DNA

Translace

- “překlad” z jazyka nukleotidů do jazyka aminokyselin
- dá se rozdělit na 5 kroků
  - aktivace aminokyslin
  - iniciace
  - elongace
  - terminace
  - sbalování a posttranslační modifikace
- první kodon vždy Met, iniciátorová tRNA – pro Met
  - navázaná aminokyselina je následně formylovaná
  - váže se pouze do P místa ribosomu (ostatní do A místa)


Cytosol
ER lumen
Ribosomes

First letter of codon (5′ end)

Second letter of codon

	U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

TABLE 27–3 Degeneracy of the Genetic Code

Amino acid	*Number of codons*	*Amino acid*	*Number of codons*
Met	1	Tyr	2
Trp	1	Ile	3
Asn	2	Ala	4
Asp	2	Gly	4
Cys	2	Pro	4
Gln	2	Thr	4
Glu	2	Val	4
His	2	Arg	6
Lys	2	Leu	6
Phe	2	Ser	6

čtecí rámce ORF

CCGTTAGCCTATTAGCCG
ProLeuAlaTyr*Pro**
CCGTTAGCCTATTAGCCG
Arg*ProIleSer**
CCGTTAGCCTATTAGCCG
ValSerLeuLeuAla

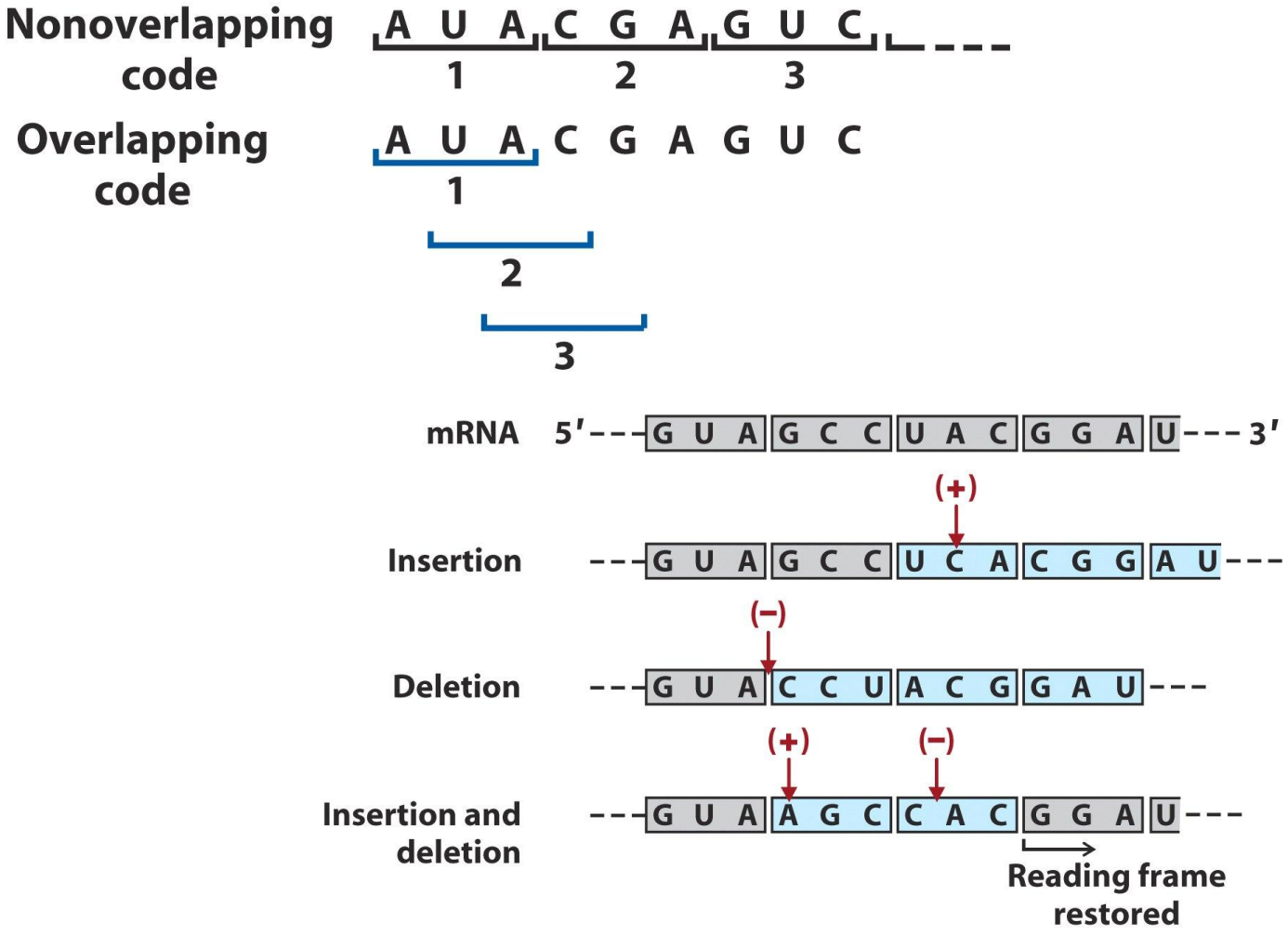
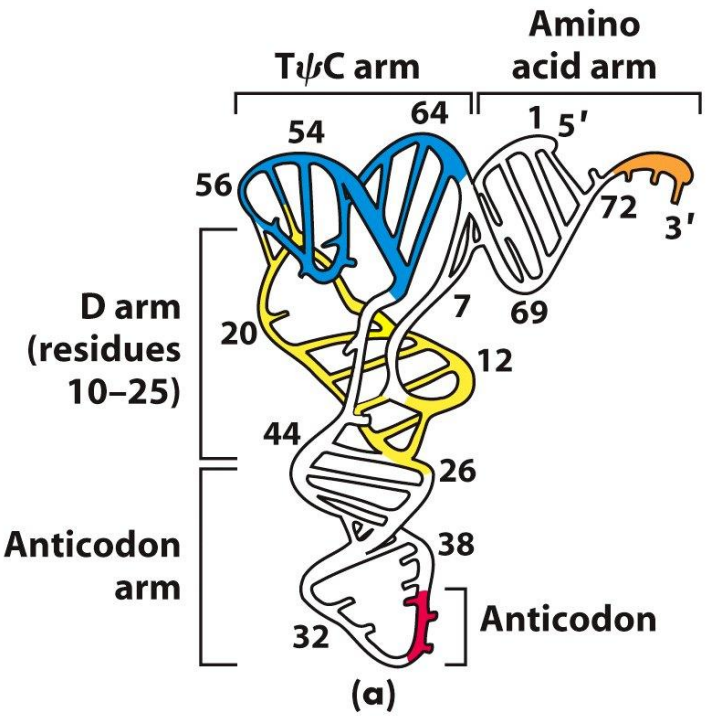


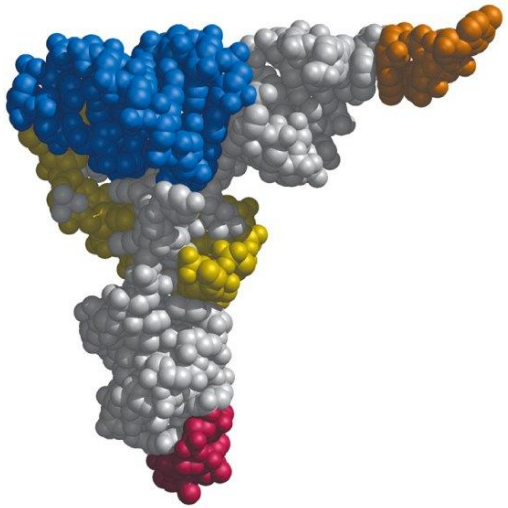
TABLE 27–5 Components Required for the Five Major Stages of Protein Synthesis in *E. coli*

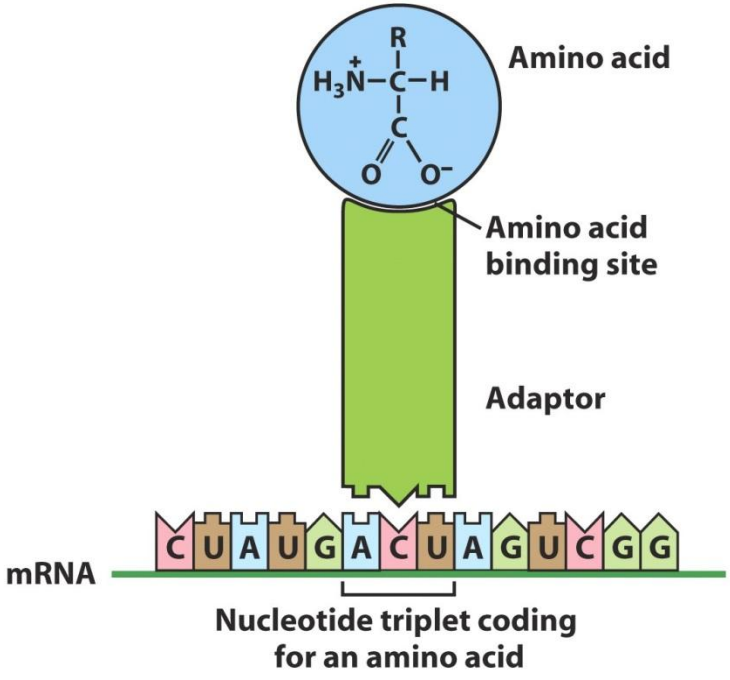
Stage	*Essential components*
1. Activation of amino acids	20 amino acids 20 aminoacyl-tRNA synthetases 32 or more tRNAs ATP Mg^{2+}
2. Initiation	mRNA *N*-Formylmethionyl-$tRNA^{fmet}$ Initiation codon in mRNA (AUG) 30S ribosomal subunit 50S ribosomal subunit Initiation factors (IF-1, IF-2, IF-3) GTP 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 release	Termination codon in mRNA Release factors (RF-1, RF-2, RF-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 phosphate, methyl, carboxyl, carbohydrate, or prosthetic groups

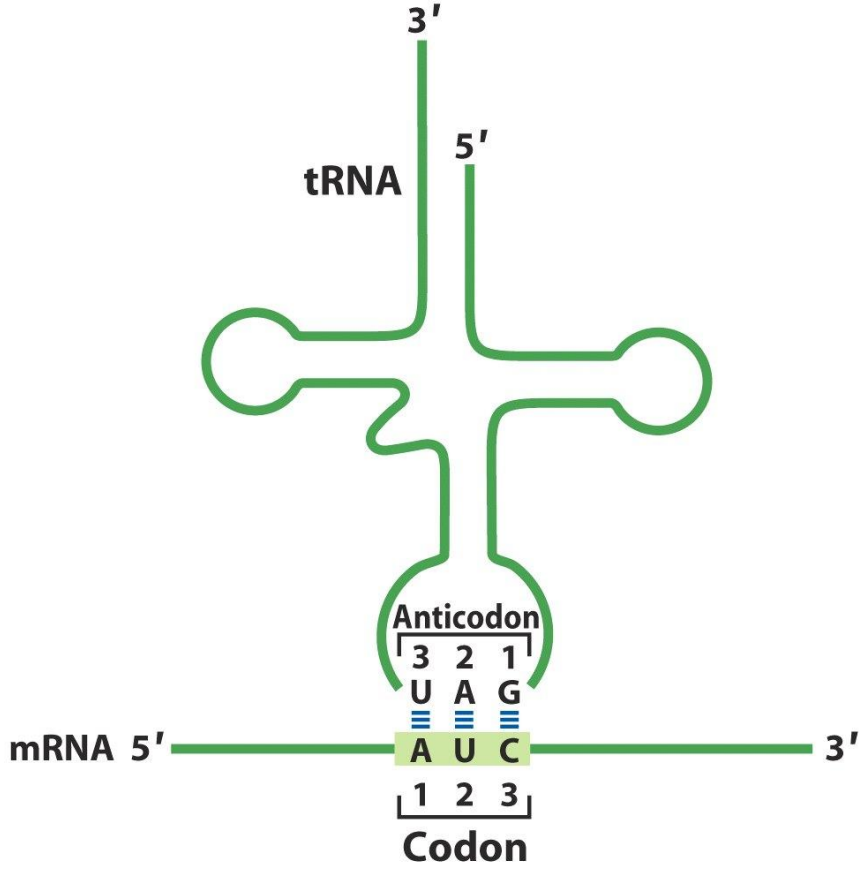
Aktivace aminokyselin

- nutná **aktivace aminokyselin – vazba na tRNA**
- vysoce specifické, zajišťuje správnost přepisu
- AA + ATP $\rightarrow$ AA-AMP + PPi
- AA-AMP + tRNA $\rightarrow$ AA-tRNA + AMP


TψC arm
Amino acid arm
54
64
1
5′
56
72
3′
D arm (residues 10–25)
20
7
69
12
44
26
Anticodon arm
38
Anticodon
32
(a)


(b)


R
H3N+–C–H
C
O
O−
Amino acid
Amino acid binding site
Adaptor
C U A U G A C U A G U C G G
mRNA
Nucleotide triplet coding for an amino acid


3′
5′
tRNA
Anticodon
3 2 1
U A G
mRNA 5′
A U C
3′
1 2 3
Codon

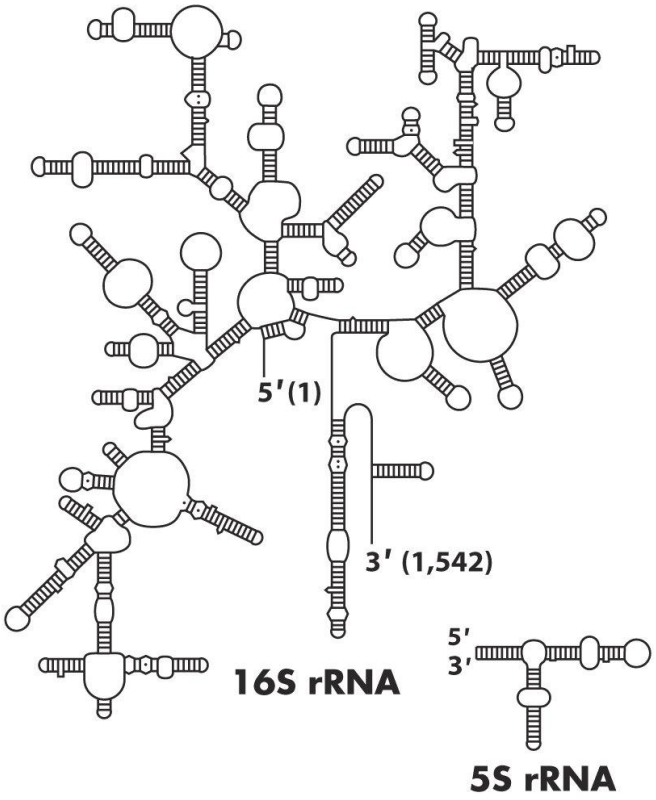
Iniciace

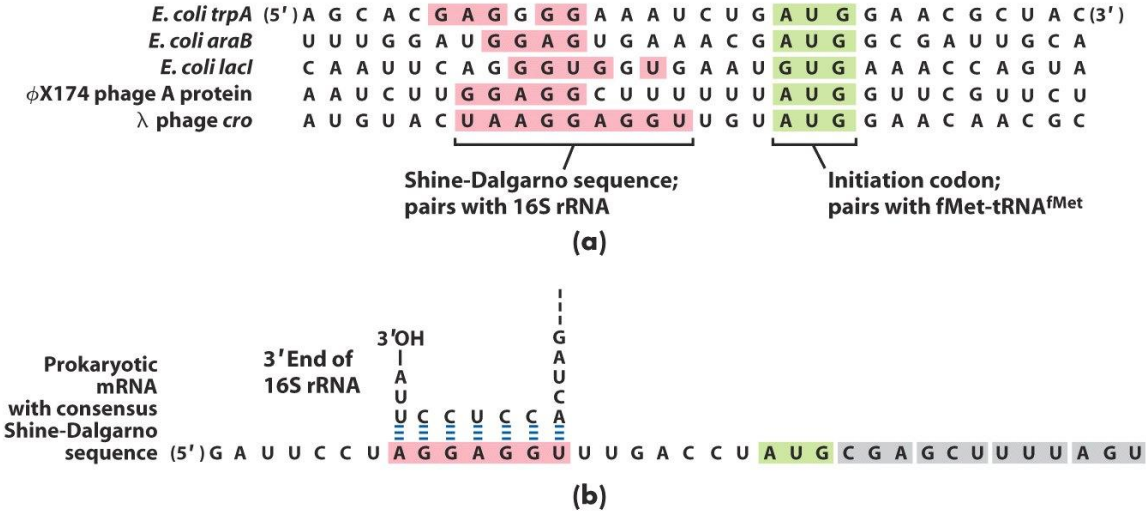
- vazba iniciačních faktorů na 30S podjednotku
- tvorba iniciačního komplexu – iniciační faktory, 30S podjednotka, fMet-tRNA, mRNA
- vznik 70S iniciačního komplexu – 50S podjednotka asociuje s iniciačním komplexem

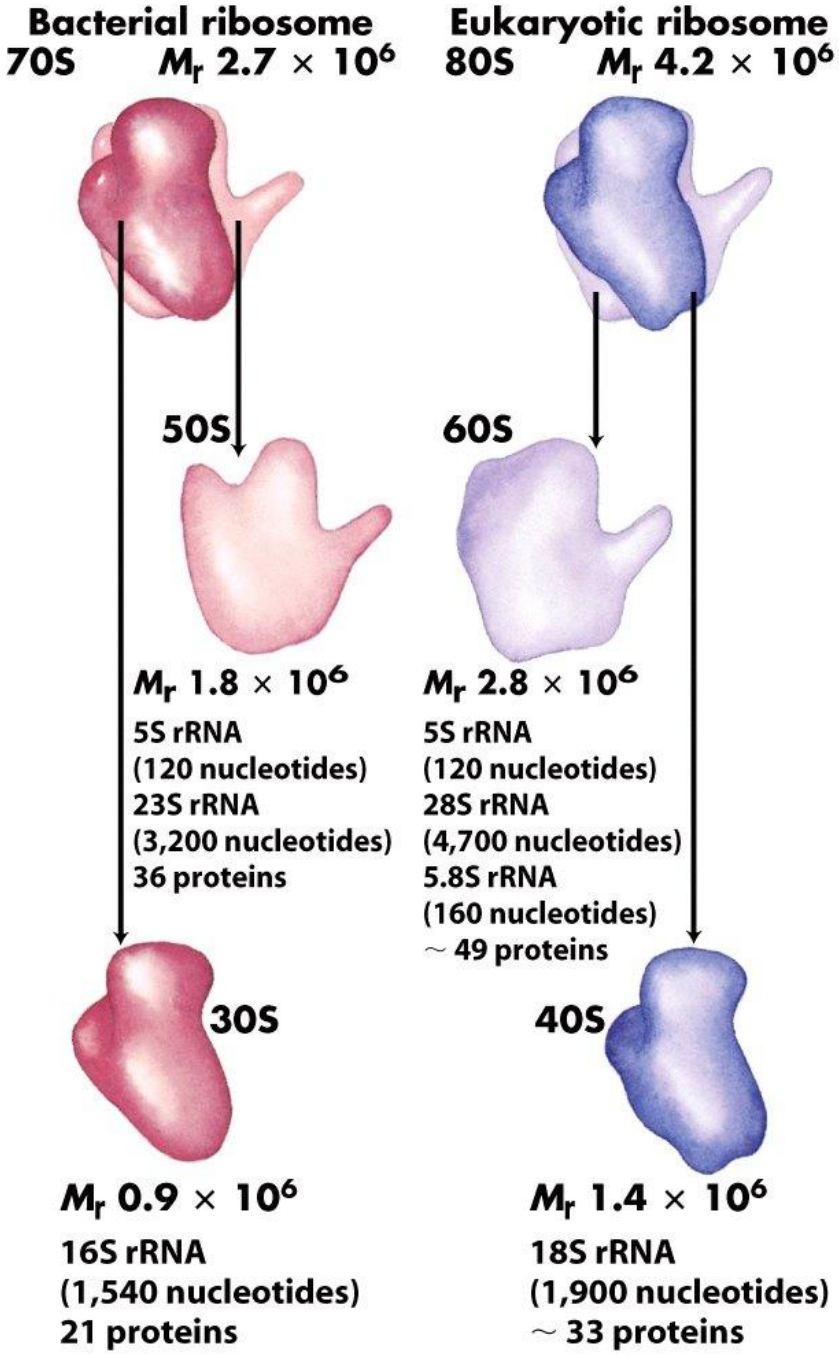
TABLE 27–6 RNA and Protein Components of the *E. coli* Ribosome

Subunit	*Number of different proteins*	*Total number of proteins*	*Protein designations*	*Number and type of rRNAs*
30S	21	21	S1–S21	1 (16S rRNA)
50S	33	36	L1–L36*	2 (5S and 23S rRNAs)

*The L1 to L36 protein designations do not correspond to 36 different proteins. The protein originally designated L7 is in fact a modified form of L12, and L8 is a complex of three other proteins. Also, L26 proved to be the same protein as S20 (and not part of the 50S subunit). This gives 33 different proteins in the large subunit. There are four copies of the L7/L12 protein, with the three extra copies bringing the total protein count to 36.






Bacterial ribosome
70S M_r 2.7 × 10⁶
50S
M_r 1.8 × 10⁶
5S rRNA
(120 nucleotides)
23S rRNA
(3,200 nucleotides)
36 proteins
30S
M_r 0.9 × 10⁶
16S rRNA
(1,540 nucleotides)
21 proteins
Eukaryotic ribosome
80S M_r 4.2 × 10⁶
60S
M_r 2.8 × 10⁶
5S rRNA
(120 nucleotides)
28S rRNA
(4,700 nucleotides)
5.8S rRNA
(160 nucleotides)
~ 49 proteins
40S
M_r 1.4 × 10⁶
18S rRNA
(1,900 nucleotides)
~ 33 proteins

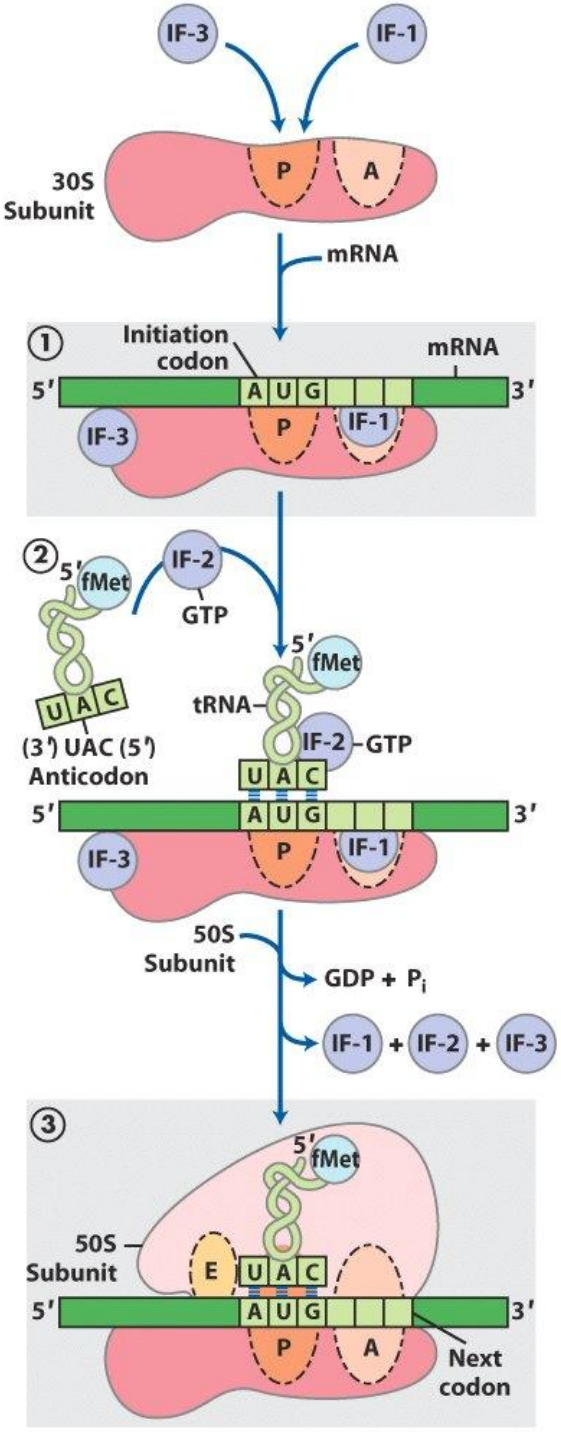

IF-3
IF-1
30S Subunit
P
A
mRNA
1
Initiation codon
mRNA
5′
A U G
3′
IF-3
P
IF-1
2
5′ fMet
IF-2
GTP
tRNA
(3′) UAC (5′)
Anticodon
U A C
IF-2 – GTP
50S Subunit
GDP + P_i
IF-1 + IF-2 + IF-3
3
E
Next codon

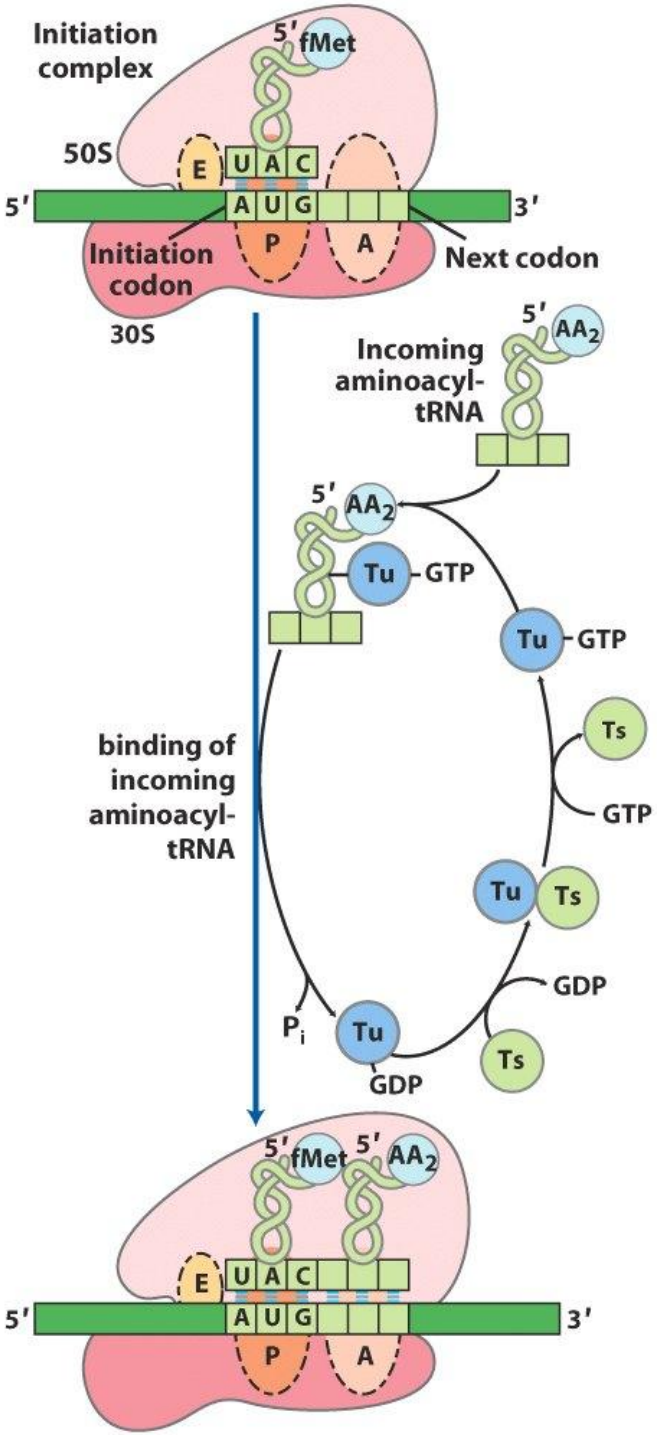
TABLE 27–8 Protein Factors Required for Initiation of Translation in Bacterial and Eukaryotic Cells

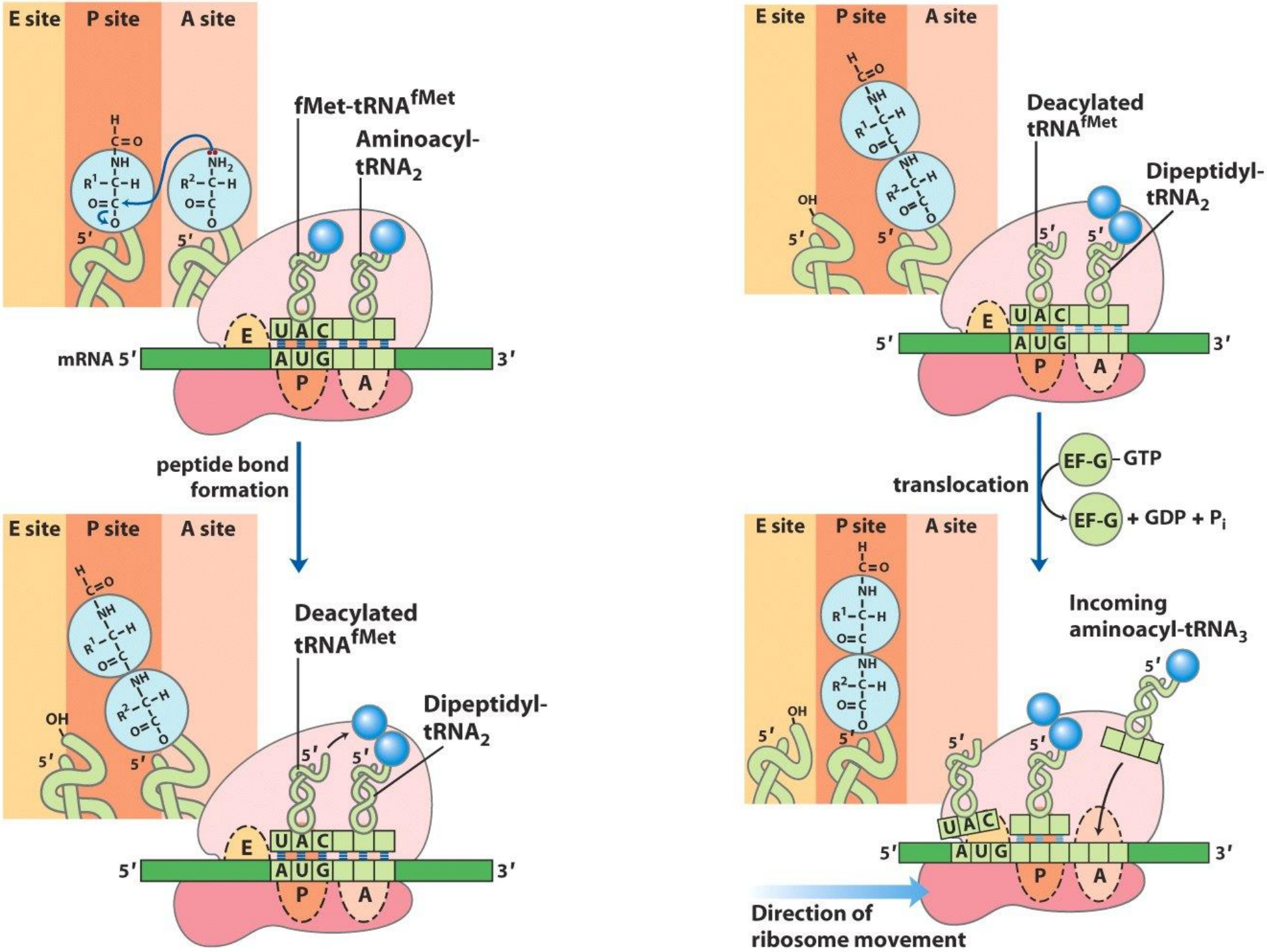
Factor	*Function*
Bacterial	
IF-1	Prevents premature binding of tRNAs to A site
IF-2	Facilitates binding of fMet-tRNA^{fMet} to 30S ribosomal subunit
IF-3	Binds to 30S subunit; prevents premature association of 50S subunit; enhances specificity of P site for fMet-tRNA^{fMet}
Eukaryotic*	
eIF2	Facilitates 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

*The prefix "e" identifies these as eukaryotic factors.

Elongace

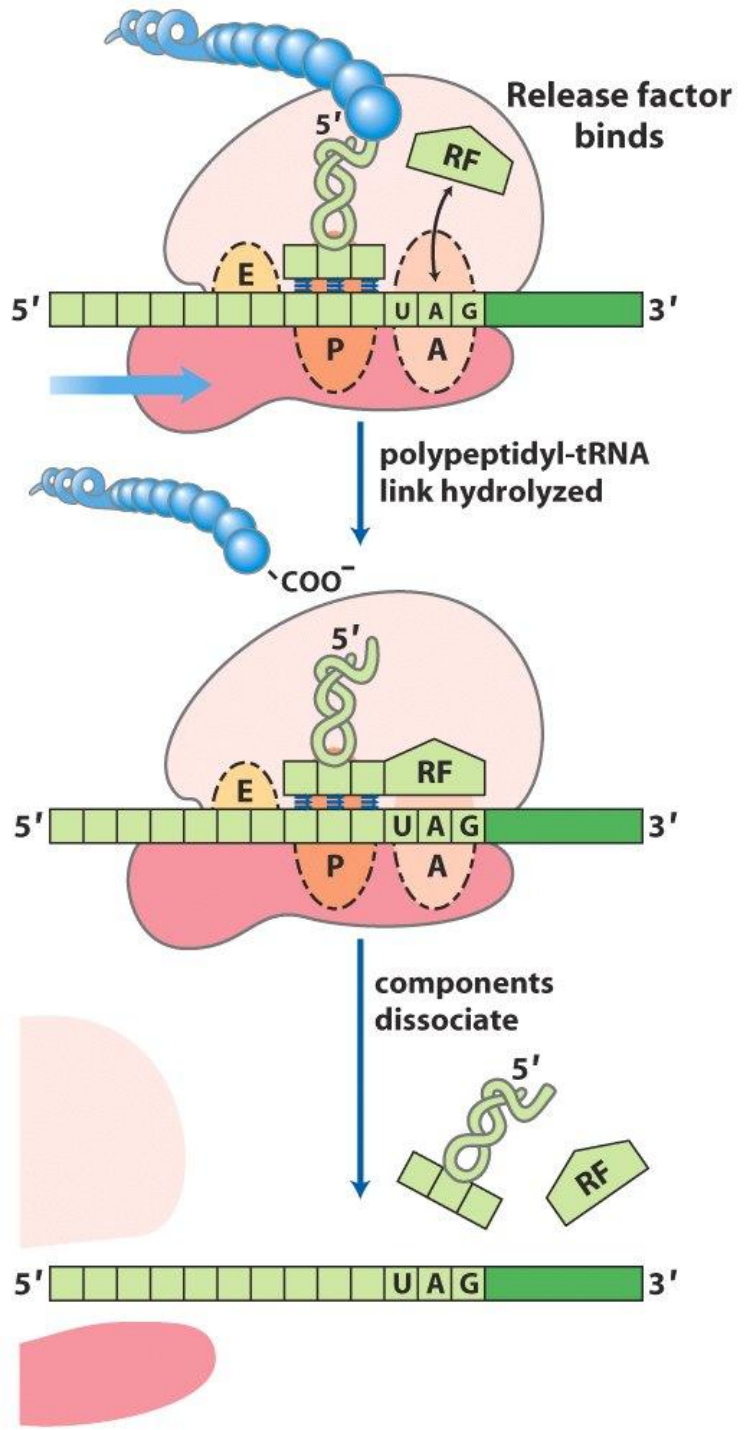
- vazba AA-tRNA do A místa ribosomu, hydrolysa GTP na pomocném faktoru EF-Tu
- tvorba peptidové vazby, přenos již vytvořeného peptidového řetězce na tRNA v A místě
- uvolnění tRNA z P místa z ribozomu
- přenos tRNA s navázaným peptidem do P místa, uvolnění A místa
- regenerace faktoru EF-Tu

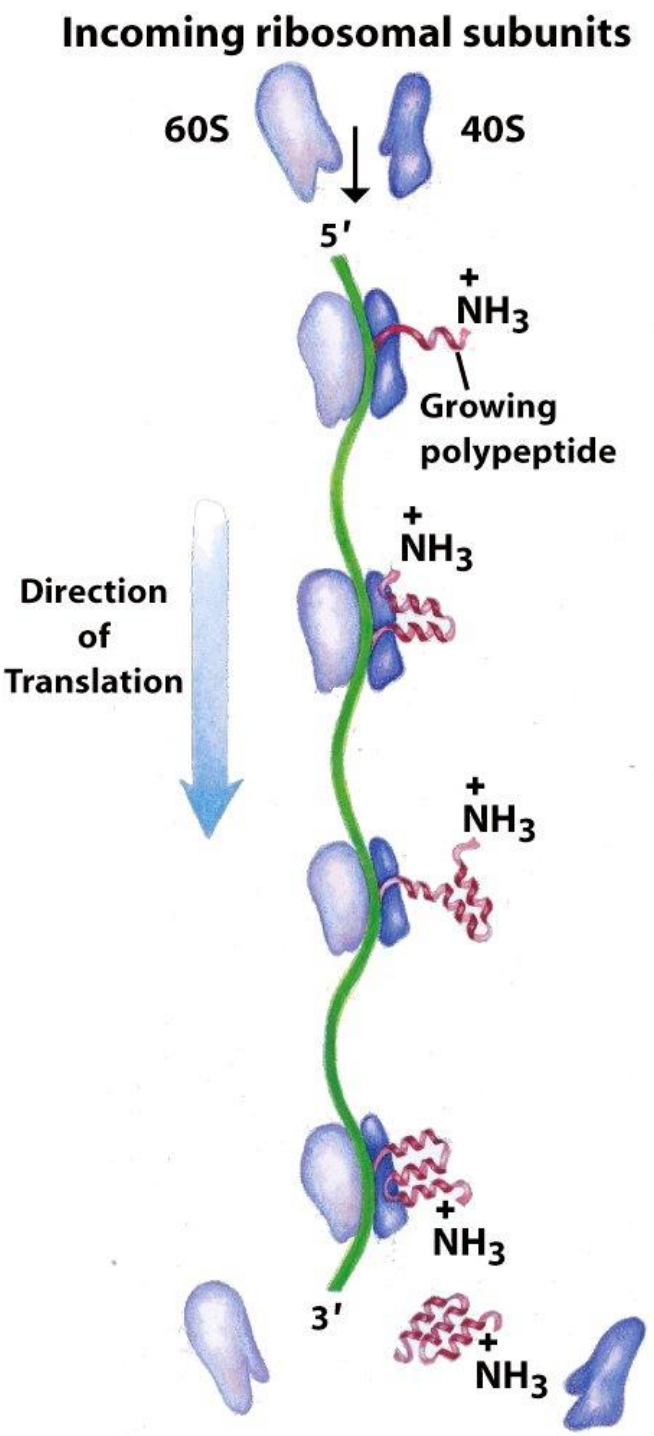

Initiation complex
5′
fMet
50S
E
U A C
5′
A U G
3′
P
A
Initiation codon
Next codon
30S
5′
AA2
Incoming aminoacyl-tRNA
5′
AA2
Tu
GTP
Tu
GTP
Ts
GTP
binding of incoming aminoacyl-tRNA
Tu
Ts
GDP
Pi
Tu
Ts
GDP
5′
fMet
5′
AA2
E
U A C
5′
A U G
3′
P
A

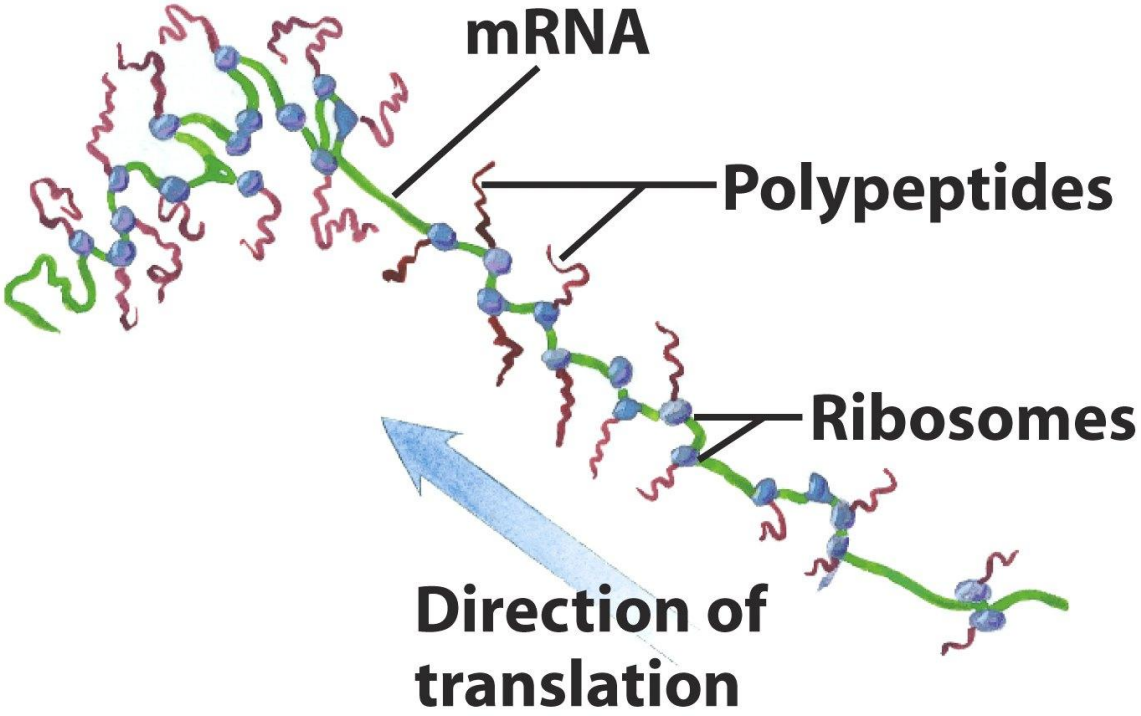

E site
P site
A site
fMet-tRNA^fMet
Aminoacyl-tRNA2
mRNA 5′
3′
E
P
A
U A C
A U G
peptide bond formation
Deacylated tRNA^fMet
Dipeptidyl-tRNA2
translocation
EF-G – GTP
EF-G + GDP + Pi
Incoming aminoacyl-tRNA3
Direction of ribosome movement

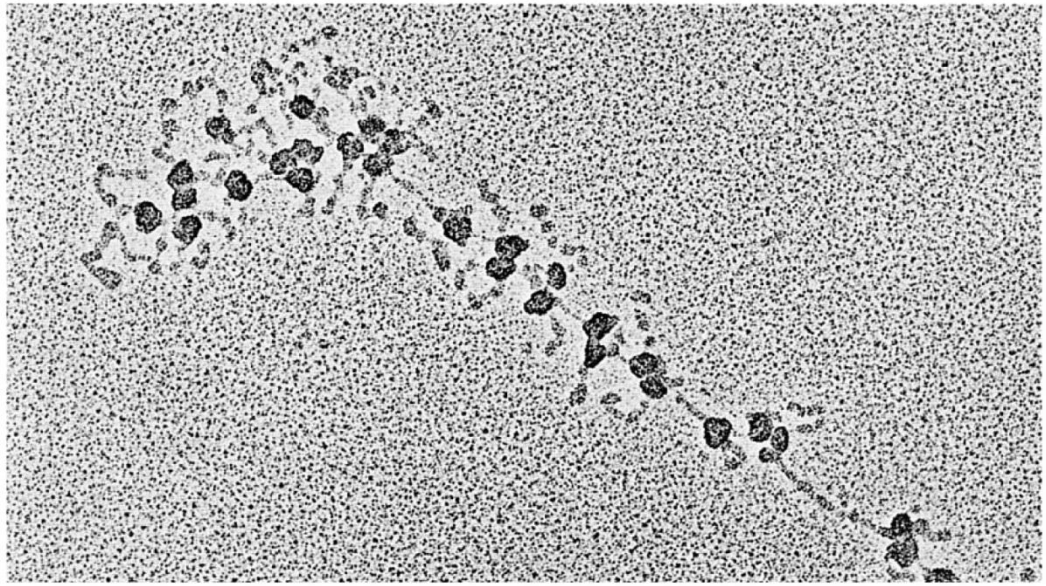
Terminace

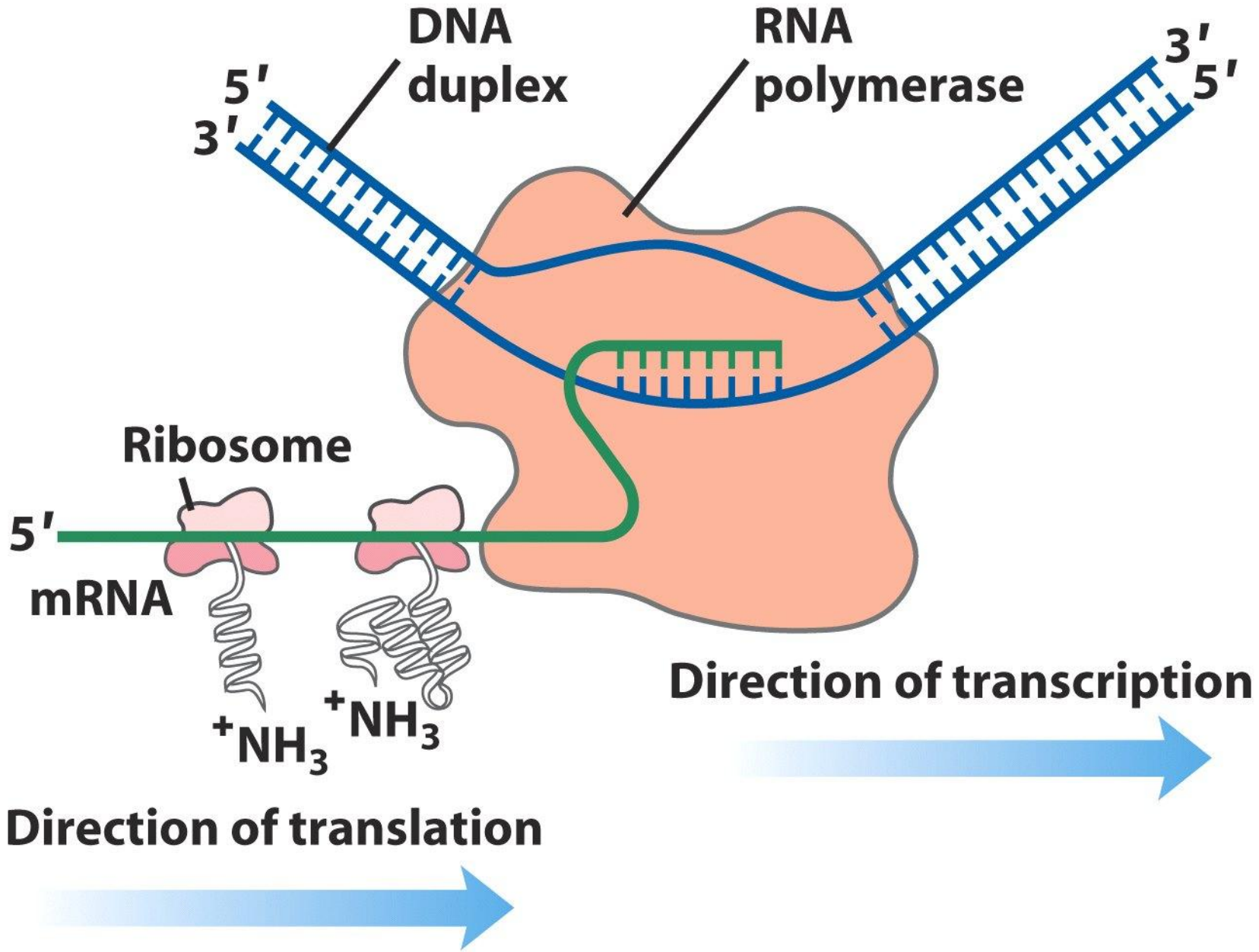
- do A místa se dostane terminační kodon
- terminační kodon je rozpoznán terminačním faktorem RF1
- na tRNA v P místě se váže RF3
- peptid je uvolněn od tRNA, hydrolysa GTP
- oddělí se všechny terminační faktory, velká podjednotka a mRNA


Release factor binds
5′
RF
E
P
A
U A G
5′
3′
polypeptidyl-tRNA link hydrolyzed
COO⁻
components dissociate
RF


Incoming ribosomal subunits
60S
40S
5′
+ NH3
Growing polypeptide
Direction of Translation
3′

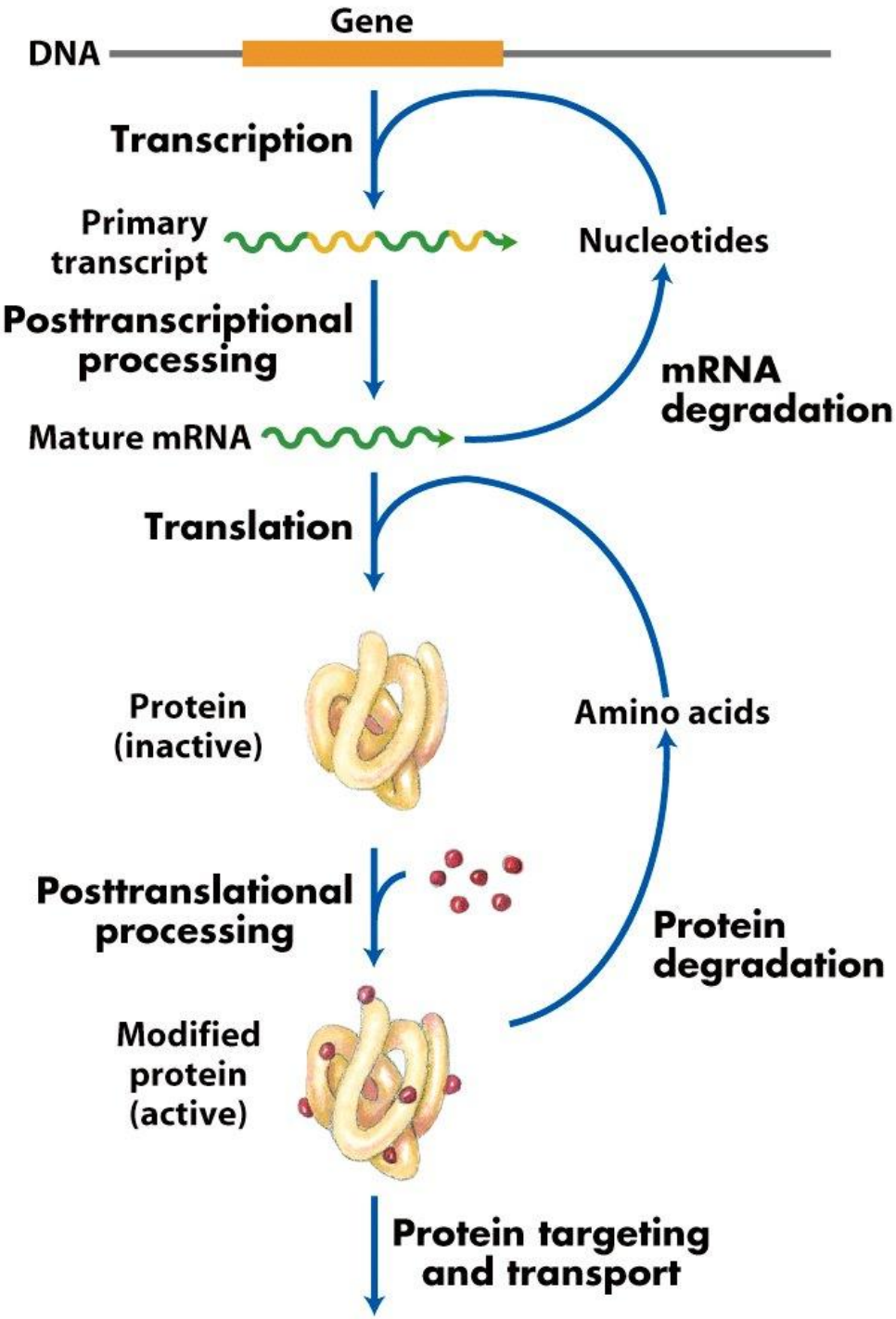

mRNA
Polypeptides
Ribosomes
Direction of translation


0.25 μm

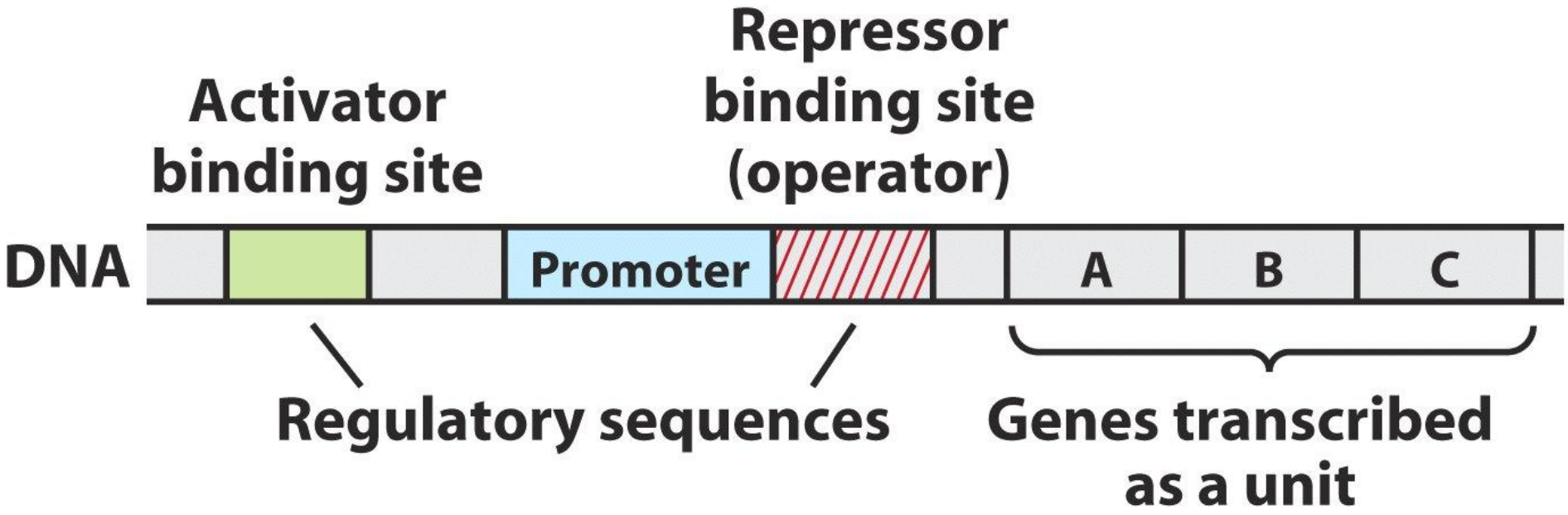

DNA
duplex
RNA
polymerase
5′
3′
3′
5′
Ribosome
5′
mRNA
+NH3
+NH3
Direction of transcription
Direction of translation

Sbalování a posttranslační modifikace

- tvorba disulfidových můstků – fixace struktury
- fosforylace AK – Ser, Thr, dočasné i trvalé
- hydroxylace AK – Pro, Lys, v kolagenu
- methylace AK – Lys
- karboxylace, amidace, acetylace, adenylace
- glykosylace – N-glykosid – na Asn
- O-glykosid – na Ser, Thr, Tyr
- odolnost proti proteolyse, zvýšení rozpustnosti, konformační stability, signální funkce
- vznik příčných vazeb – amidové vazby Glu-Lys
- limitovaná proteolysa – odštěpení N-konce, rozdělení na víc řetězců
- připojení kofaktorů
- spojování v nadmolekulové celky

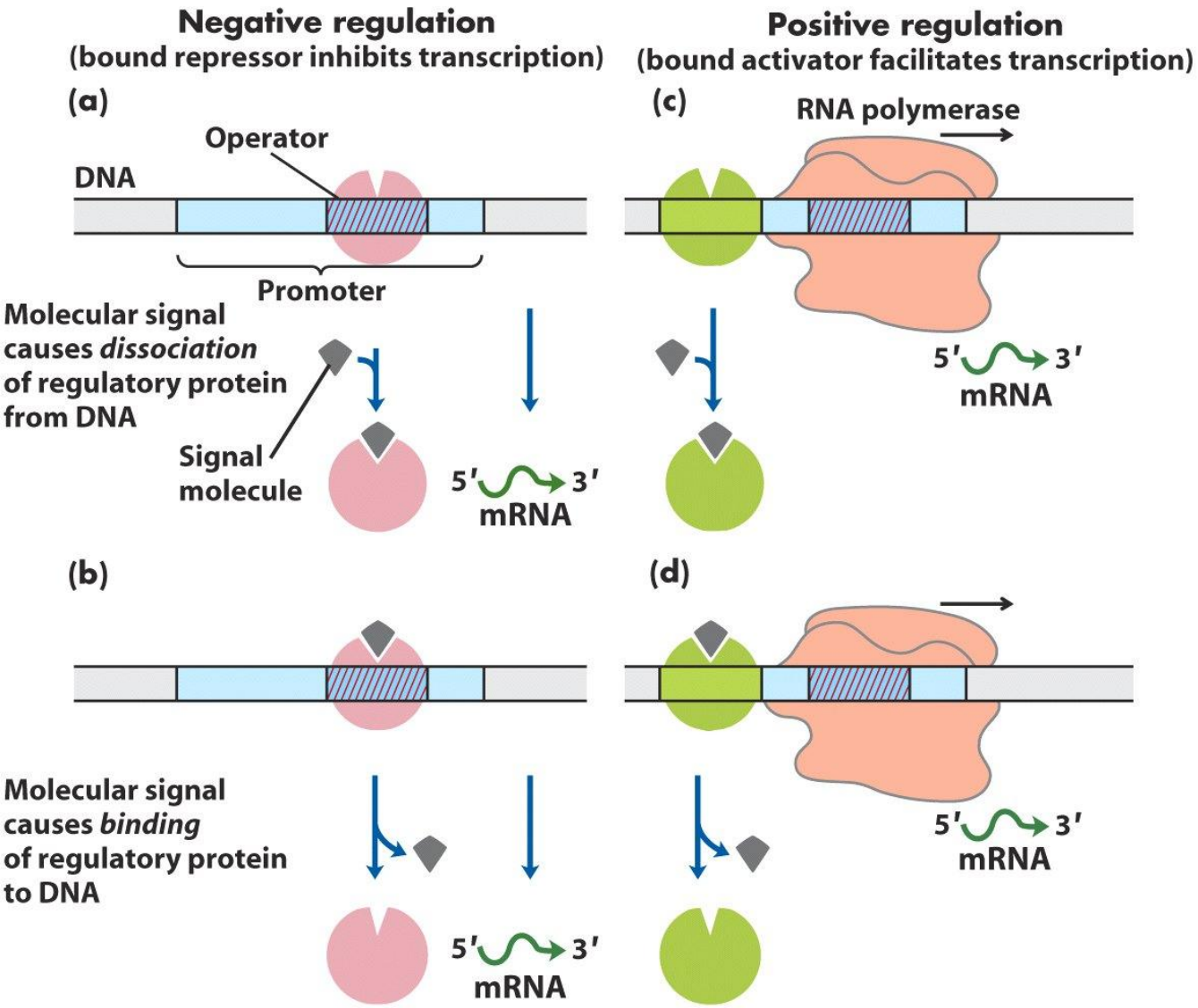

Gene
DNA
Transcription
Primary transcript
Nucleotides
Posttranscriptional processing
mRNA degradation
Mature mRNA
Translation
Protein (inactive)
Amino acids
Posttranslational processing
Protein degradation
Modified protein (active)
Protein targeting and transport

Regulace transkripce



Ukázky regulace syntézy proteinů na různé úrovni

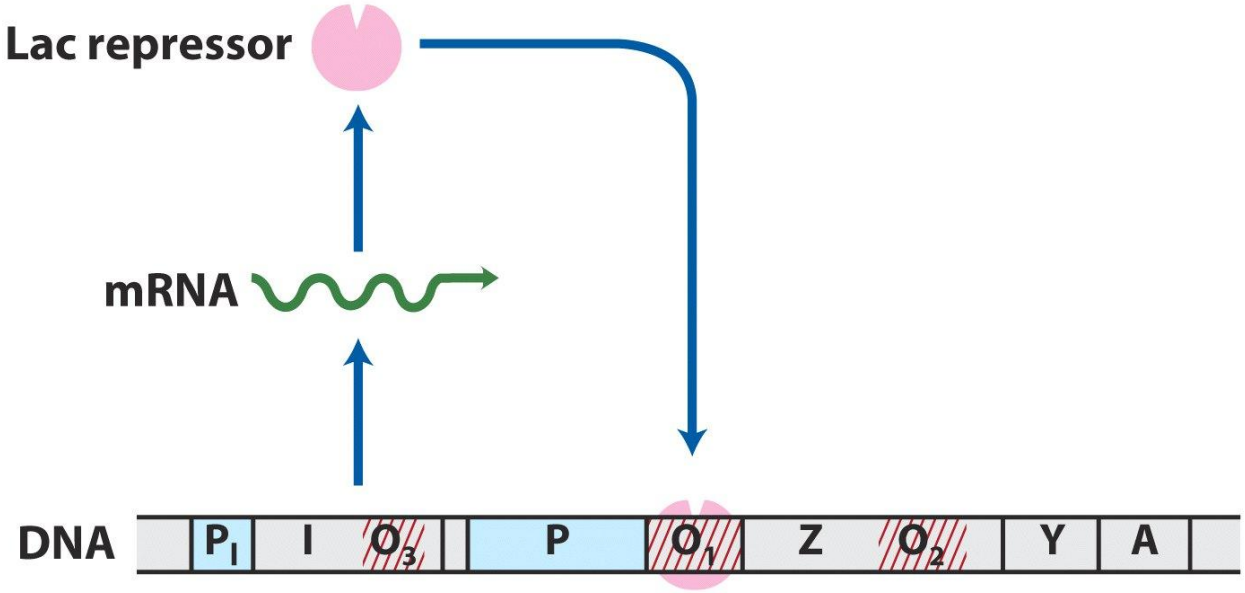
regulace syntézy proteinů na úrovni regulace transkripce

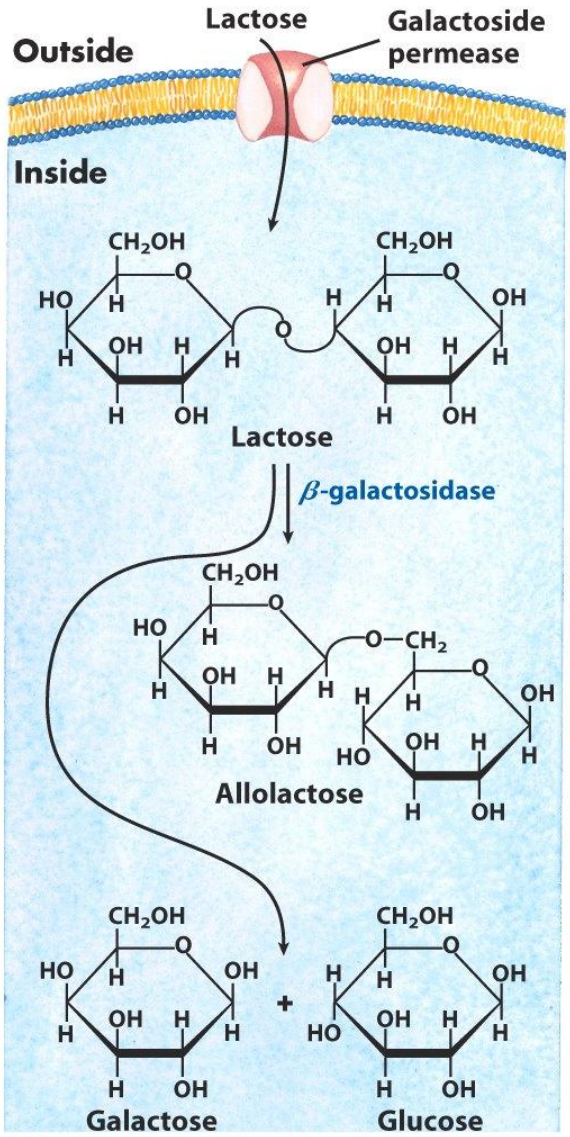


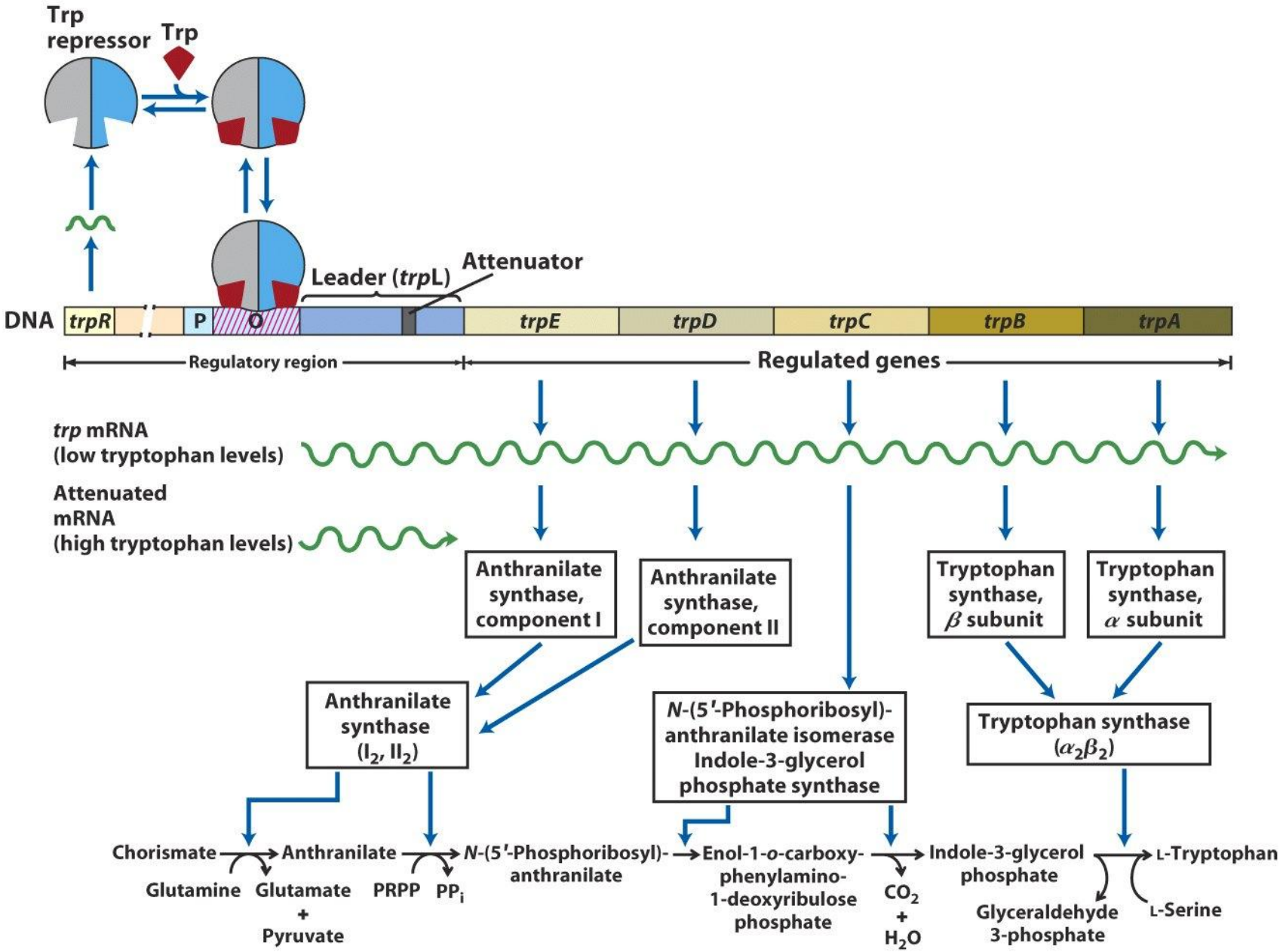
hexosová represe - lac operon

pro přednostní využívání výhodnějších zdrojů energie

represor tvoří v operátoru smyčku, přes kterou polymerasa nepřejde

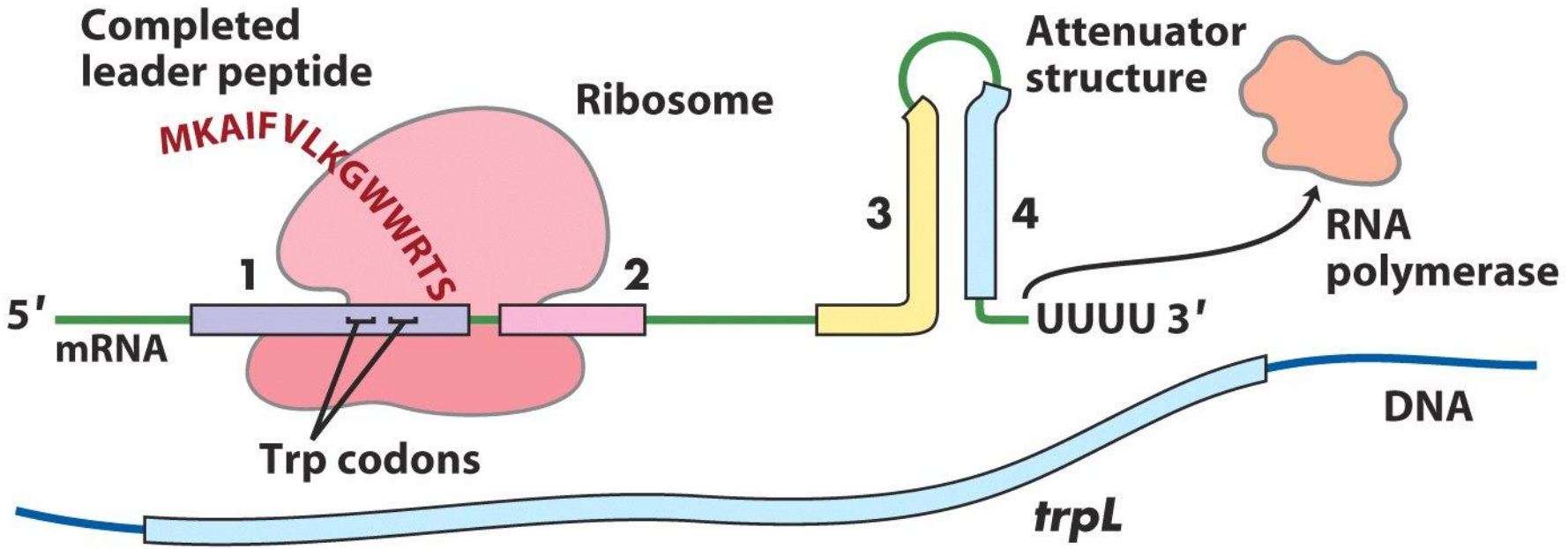




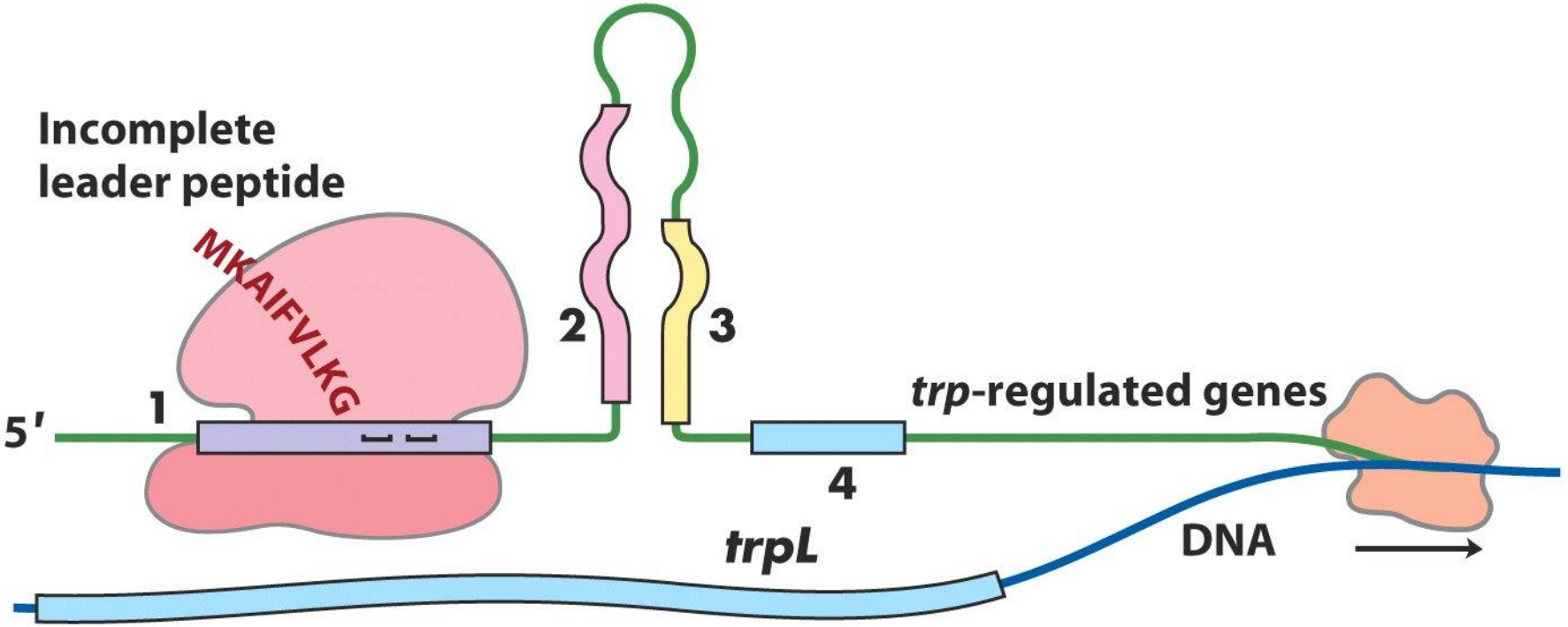

Trp repressor
Trp
Leader (trpL)
Attenuator
DNA
trpR
P
O
trpE
trpD
trpC
trpB
trpA
Regulatory region
Regulated genes
trp mRNA (low tryptophan levels)
Attenuated mRNA (high tryptophan levels)
Anthranilate synthase, component I
Anthranilate synthase, component II
Tryptophan synthase, β subunit
Tryptophan synthase, α subunit
Anthranilate synthase (I2, II2)
N-(5′-Phosphoribosyl)-anthranilate isomerase Indole-3-glycerol phosphate synthase
Tryptophan synthase (α2β2)
Chorismate
Glutamine
Glutamate + Pyruvate
Anthranilate
PRPP
PPi
N-(5′-Phosphoribosyl)-anthranilate
Enol-1-o-carboxy-phenylamino-1-deoxyribulose phosphate
CO2 + H2O
Indole-3-glycerol phosphate
Glyceraldehyde 3-phosphate
L-Serine
L-Tryptophan

atenuace – Trp operon

- využití spojení transkripce a translace u prokaryot
- několik kodonů pro Trp za sebou
- pokud je dost tryptofanu, tohle místo ribosom přejde, na mRNA se vytvoří terminační smyčka a RNA polymerasa se zastaví
- pokud není dost tryptofanu, ribosom místo s kodony pro tryptofan nepřejde, vytvoří se jiný typ vlásenky a přepis pokračuje dál



When tryptophan levels are high, the ribosome quickly translates sequence 1 (open reading frame encoding leader peptide) and blocks sequence 2 before sequence 3 is transcribed. Continued transcription leads to attenuation at the terminator-like attenuator structure formed by sequences 3 and 4.



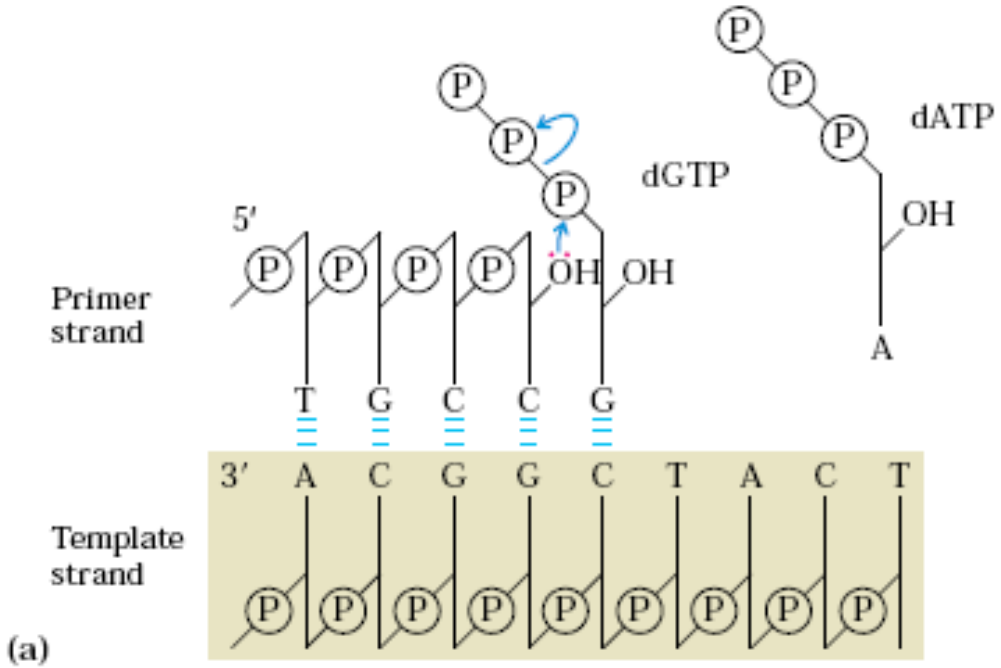
When tryptophan levels are low, the ribosome pauses at the Trp codons in sequence 1. Formation of the paired structure between sequences 2 and 3 prevents attenuation, because sequence 3 is no longer available to form the attenuator structure with sequence 4. The 2:3 structure, unlike the 3:4 attenuator, does not prevent transcription.

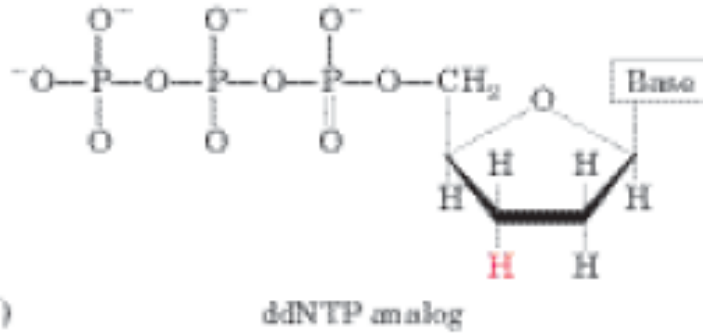
Určování sekvence DNA

- Existuje několik odlišných principů sekvenace
  - chemická metoda (Maxam-Gilbertova)
    - používají se fragmenty DNA terminálně značené pomocí ^{32}P, které jsou vystaveny působení chemických činidel, štěpících specificky pouze za jedním nebo dvěma nukleotidy. Metoda je založena na schopnosti hydrazinu, dimethyl sulfátu (DMS) a kyseliny mravenčí specificky modifikovat různé báze v molekule DNA. Poté je přidán piperidin, který katalyzuje štěpení řetězců v místech obsahujících tyto modifikované báze. Za specifitu je tedy zodpovědná první (modifikační) reakce. Pro dobrý výsledek sekvenování je nutné zajistit takové reakční podmínky, aby bylo modifikováno pouze nízké procento příslušných bází. Druhá, degradační reakce musí naopak být zcela kvantitativní

Určování sekvence DNA

- dideoxy metoda (Sangerova) – enzymová
  - metoda využívá DNA polymerasu pro vytvoření komplementární kopie jednořetězcového templátu
  - založena na schopnosti DNA polymerasy používat 2´, 3´-dideoxynukleosid trifosfáty (ddNTP) jako substráty. Je-li takováto modifikovaná báze inkorporována do rostoucího řetězce, dojde k zastavení jeho syntézy, neboť takový řetězec postrádá terminální 3´-hydroxylovou skupinu
  - DNA polymerasa nemůže iniciovat polymeraci bez přítomnosti primeru z jehož 3´ konce pokračuje elongace. Primer po připojení ke komplementární části templátu vymezuje úsek, který bude sekvenován. Deoxynukleotidy jsou připojovány na základě komplementarity k templátu a řetězec je prodlužován tvorbou fosfodiesterové vazby mezi 3´ hydroxylovou skupinou a 5´ fosfátovou skupinou nově připojovaného deoxynukleotidu.
  - Aby byly vytvořeny čtyři sekvenační směsi ukončené specificky vždy v pozici jediného nukleotidu, je do těchto reakční směsí přidán vždy pouze jeden typ ddNTP. Poměr ddNTP a směsi všech čtyř dNTP je volen tak, aby jednotlivé podíly elongačních produktů byly ukončeny se stejnou pravděpodobností. Tímto způsobem vznikají ve čtyřech elongačních reakčních směsích podíly řetězců se stejným 5´koncem definovaným použitým primerem a s variabilním 3´ koncem, zakončeným specifickým dideoxynukleotidem. Tato metoda může být různě modifikována. Po zastavení sekvenační reakce jsou dvojřetězcové molekuly DNA denaturovány tak, aby došlo k oddělení templátu od značených vláken ukončených jednotlivými dideoxynukleotidy. Tyto fragmenty jsou pak elektroforeticky za denaturačních podmínek (vysoká teplota a přítomnost močoviny) rozděleny na polyakrylamidovém gelu


dATP
dGTP
5′
OH
OH
Primer strand
T G C C G
3′ A C G G C T A C T
Template strand
(a)


Base
(b)
ddNTP analog

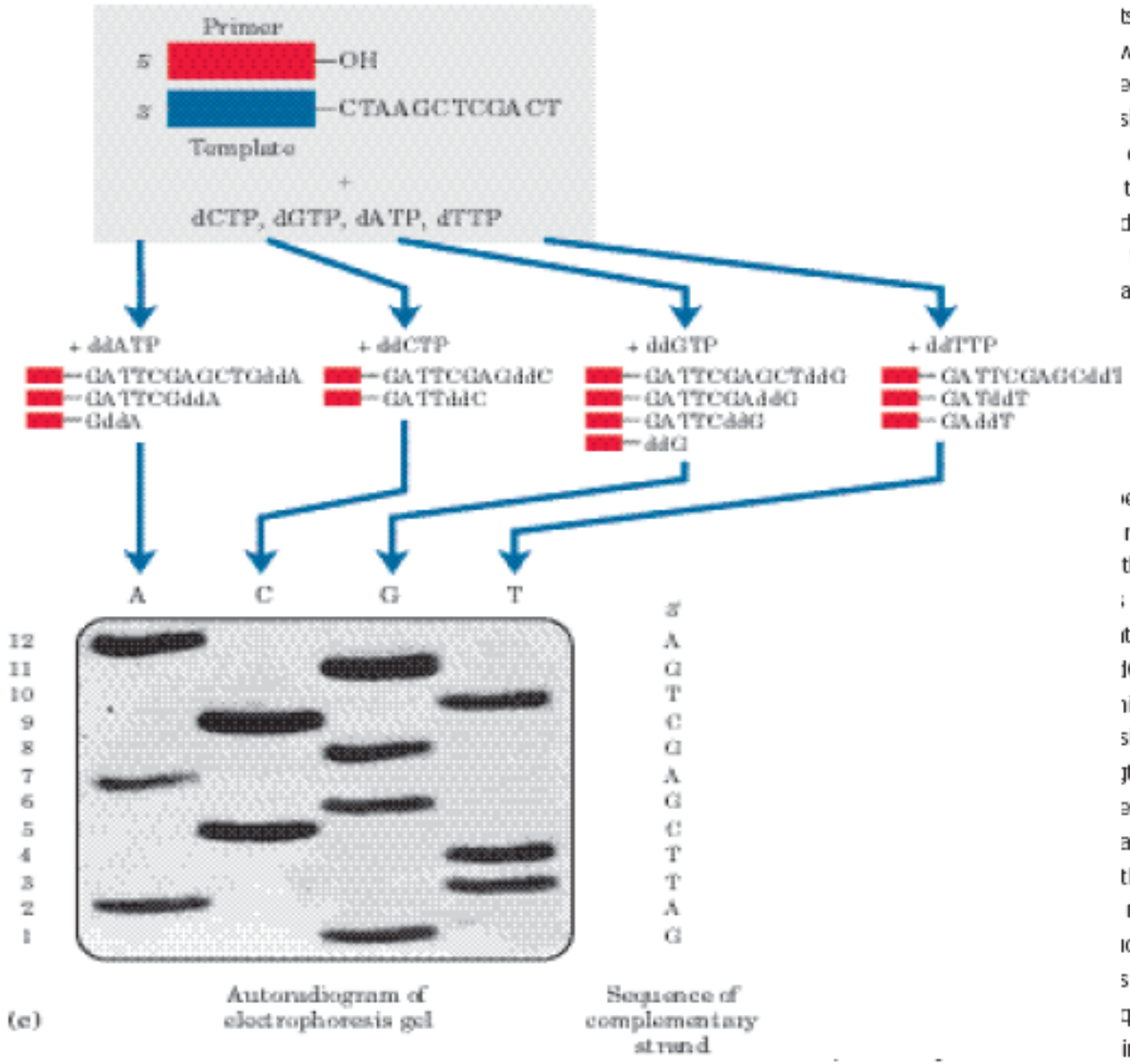
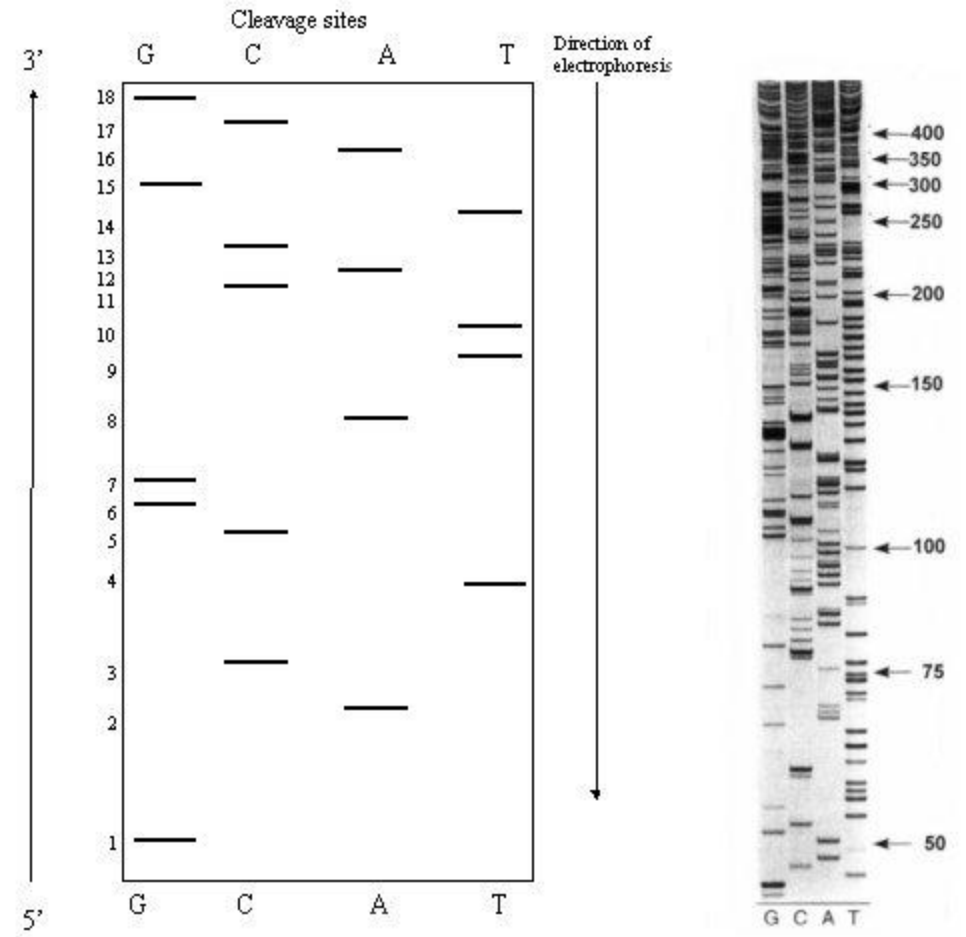
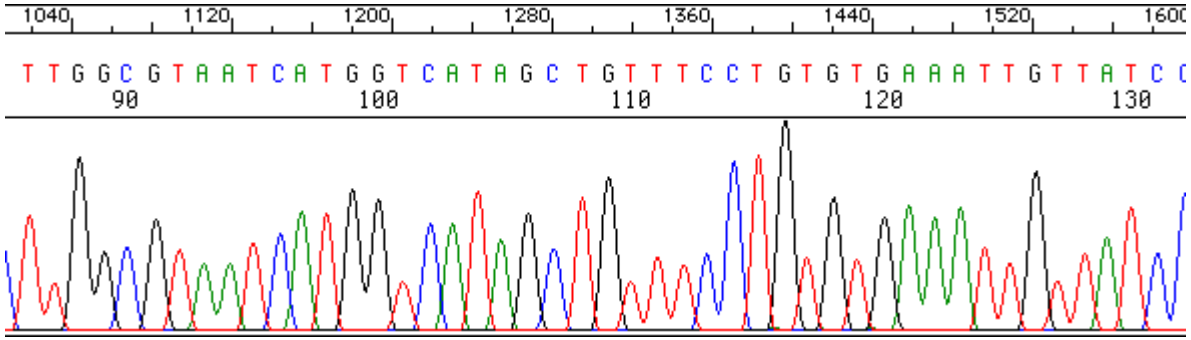


FIGURE 8–36 DNA sequencing by the Sanger method. This method makes use of the mechanism of DNA synthesis by DNA polymerases (Chapter 25). **(a)** DNA polymerases require both a primer (a short oligonucleotide strand), to which nucleotides are added, and a template strand to guide selection of each new nucleotide. In cells, the 3′-hy- ts with an incoming deoxynucleoside w phosphodiester bond. **(b)** The Sanger eoxynucleoside triphosphate (ddNTP) sis. (The Sanger method is also known ddNTP is inserted in place of a dNTP, the analog is added, because it lacks ded for the next step.

to be sequenced is used as the tem- and, and a short primer, radioactively or fluorescently labeled, is an- nealed to it. By addition of small amounts of a single ddNTP, for example ddCTP, to an otherwise reaction system, the synthesized e prematurely terminated at some lo- normally occurs. Given the excess of that the analog will be incorporated small. However, ddCTP is present in t each new strand has a high proba- C at some point during synthesis. The ixture of labeled fragments, each end- sidue in the sequence generates a set gth, such that the different-sized frag- sis, reveal the location of C residues. ately for each of the four ddNTPs, and tly from an autoradiogram of the gel. migrate faster, the fragments near the cleotide positions closest to the primer s read (in the 5′ → 3′ direction) from quence obtained is that of the strand ing analyzed.



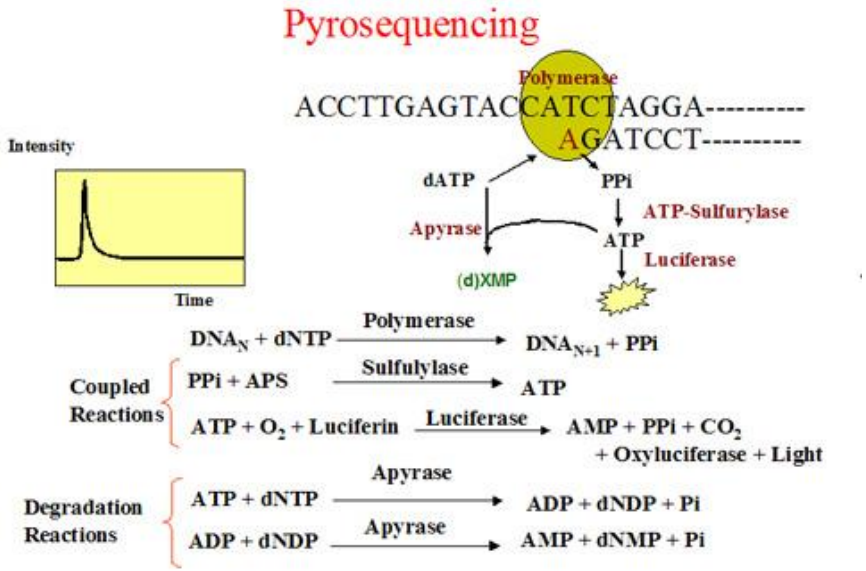
08_dideoxy_sequencing.swf



Určování sekvence DNA

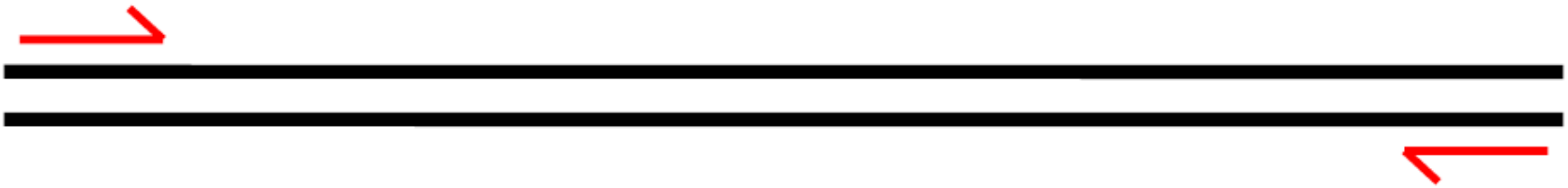
- Pyrosekvenování
  - Podobně jako Sangerova založena na syntéze nového vlákna, ale liší se způsobem detekce (bez nutnosti elektroforézy)
  - DNA polymerasa, ATP sulfurylasa, luciferasa, apyrasa
  - Adenosinfosfosulfát, luciferin

  - Připojení nového nukleotidu polymerasou – uvolnění pyrofosfátu
  - ATP suflurylasa převede PP na ATP v přítomnosti adenosinfosfosulfátu
  - ATP se spotřebuje k oxidaci luciferinu na oxiluciferin, tvorba světla
  - Nespotřebované nukleotidy a ATP odboural apyrasa
  - Další kolo cyklu



PCR – polymerasová řetězová reakce

- **P**olymerase **C**hain **R**eaction
- REPLIKACE *in vitro*
- specifické namnožení určitého úseku DNA i z komplexní směsi
- DNA templát, termostabilní DNA polymerasa, nukleotidy, primery vymezující amplifikovaný úsek



Amplifikace pomocí PCR

Pro zajištění přesných teplotních režimů a snadnější průběh amplifikace se využívá programovatelných termocyklerů.

Vzorky se do termocykleru vkládají v mikrozkumavkách o obsahu 0,2ml.

[Thermocycler Biometra T-Gradient]

Doba trvání amplifikace: 2 - 3 hodiny

Výhody a nevýhody PCR

Výhody

+ nízká mez detekce
+ možnost sériových analýz
+ možnost analýz několika parametrů v jedné reakci (multiplex PCR)
+ malé reakční objemy (nižší cena stanovení)
+ možnost analýz potravinářských surovin i technologicky opracovaných potravin

Nevýhody

- nemožnost kvantifikace pomocí klasické metody PCR
- některé sekvence podléhají patentovému zákonu (v běžné praxi jsou nedostupné pro návrh primerů)
- poměrně vysoká cena základního vybavení
- malé reakční objemy (náročné na zkušenost experimentátora a výběr vhodných podmínek reakce)

Templát pro PCR

- Stačí velmi malé množství, teoreticky jediná molekula
- Netřeba izolovat tuto molekulu od jiných
- Netřeba vysoká čistota vzorku

=>

- Krev, sliny, skvrny semene, vlas, hmyz v jantaru ☺

Aplikace

- Zdravotnická diagnostika
- „klonování“
- Forensní vědy

Modifikace, odvozené techniky

- Reverzní PCR
- Multiplex PCR
- Nested PCR
- Kvantitativní kompetitivní PCR
- Real time PCR