

Ρόλος και λειτουργία των tRNA

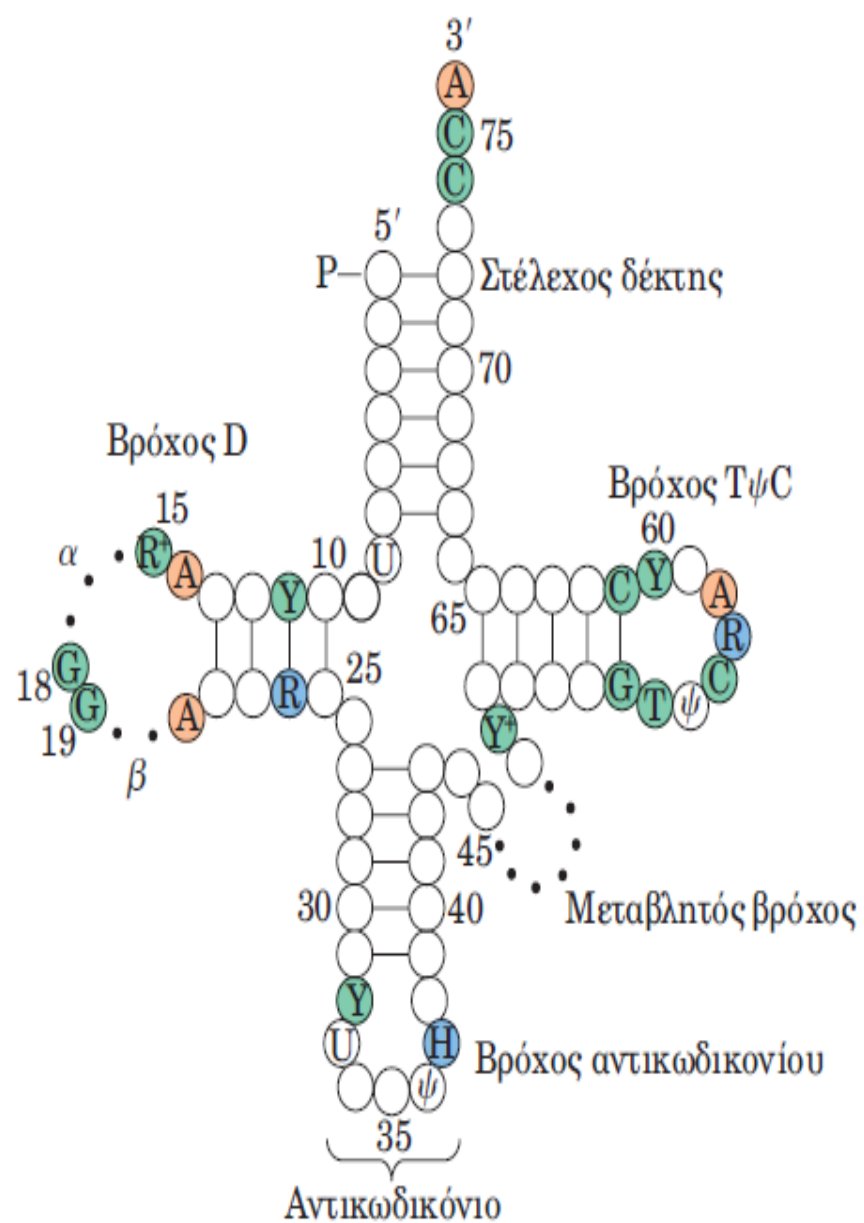
- Κάθε tRNA λειτουργεί ως **μοριακός μεταφραστής**
- Αναγνωρίζει συγκεκριμένο κωδικόνιο στο mRNA
 - μέσω του **αντικωδικονίου**
- Μεταφέρει το σωστό αμινοξύ στο ριβόσωμα
- Συμμετέχει στην επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας

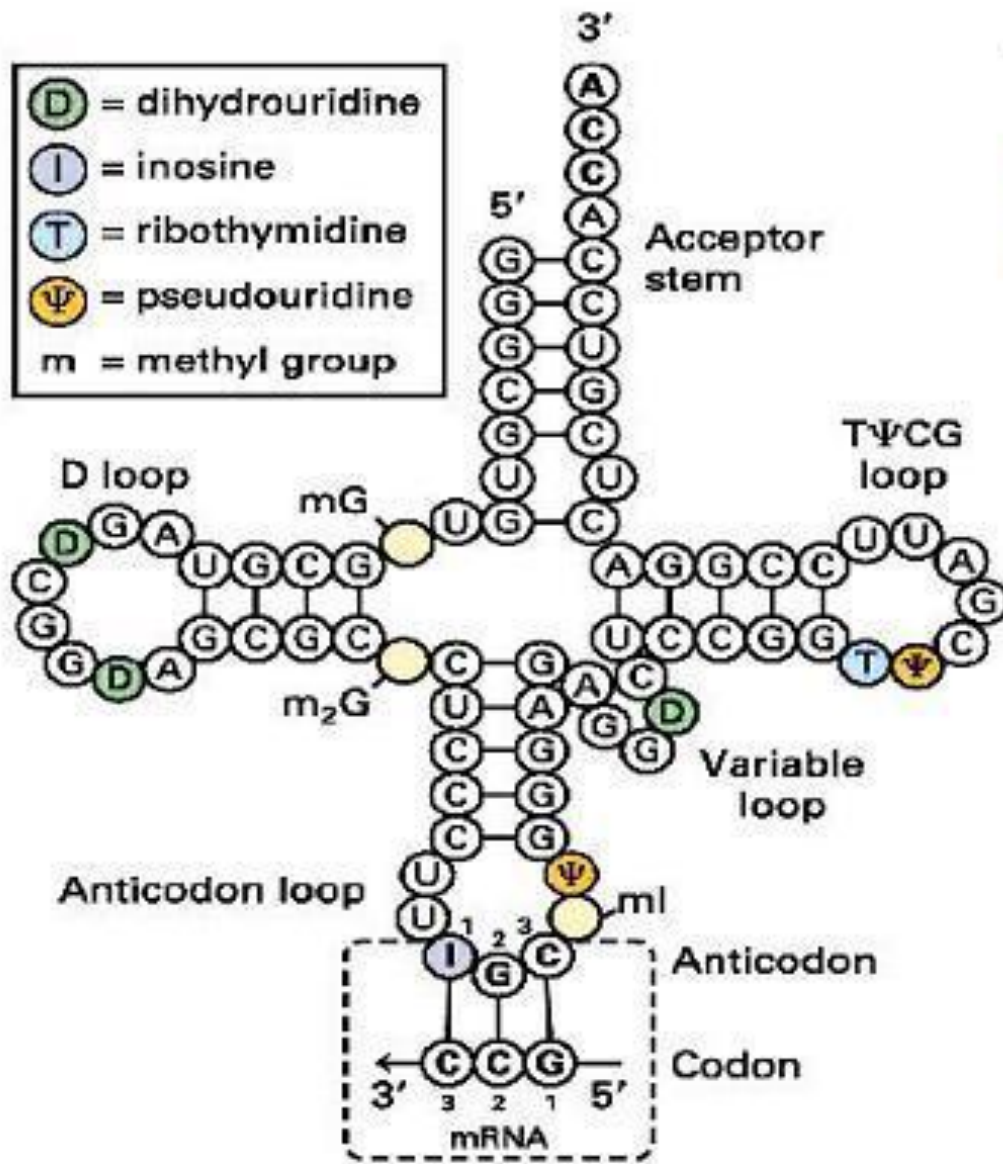
Υπάρχουν:

- τουλάχιστον ένα ή περισσότερα είδη tRNA για κάθε αμινοξύ
- συνολικά περισσότερα από 20 διαφορετικά tRNAs

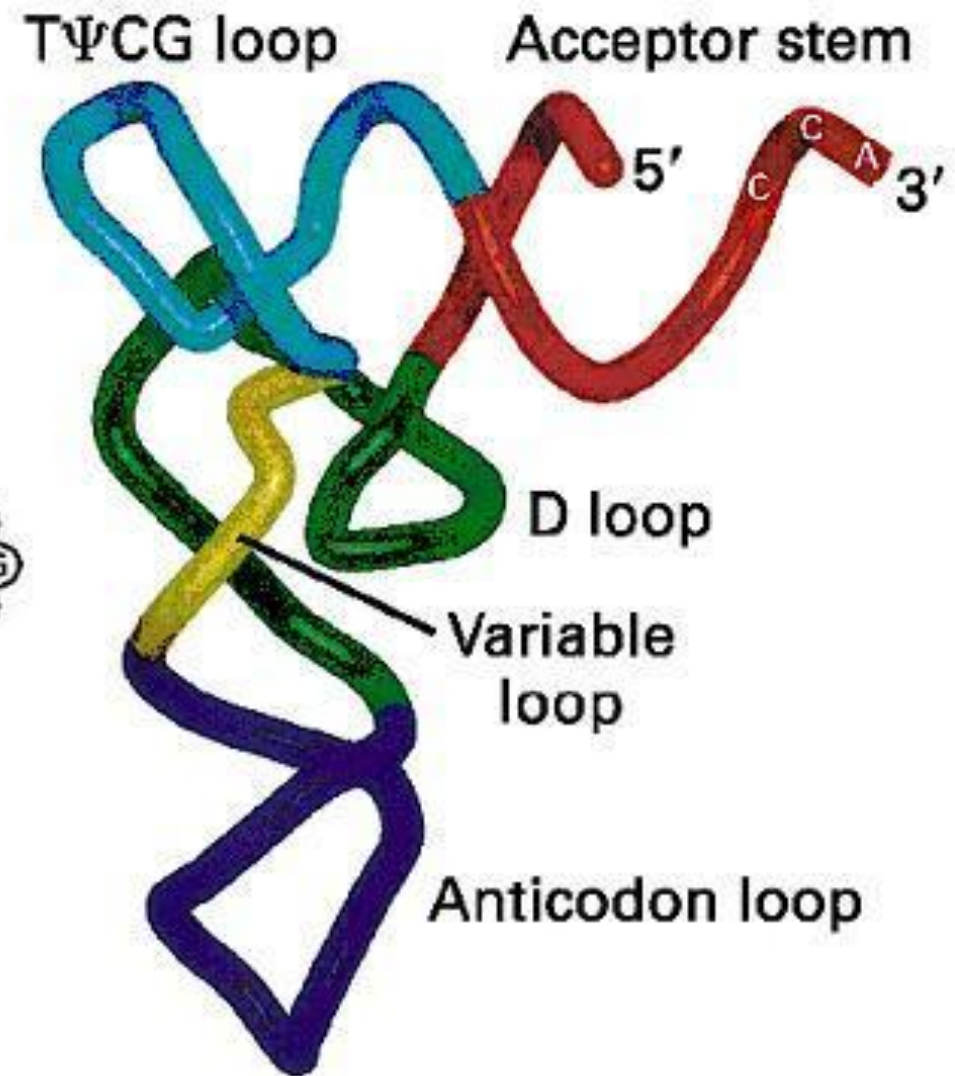
Αυτό συμβαίνει λόγω:

- του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα (**wobble**)



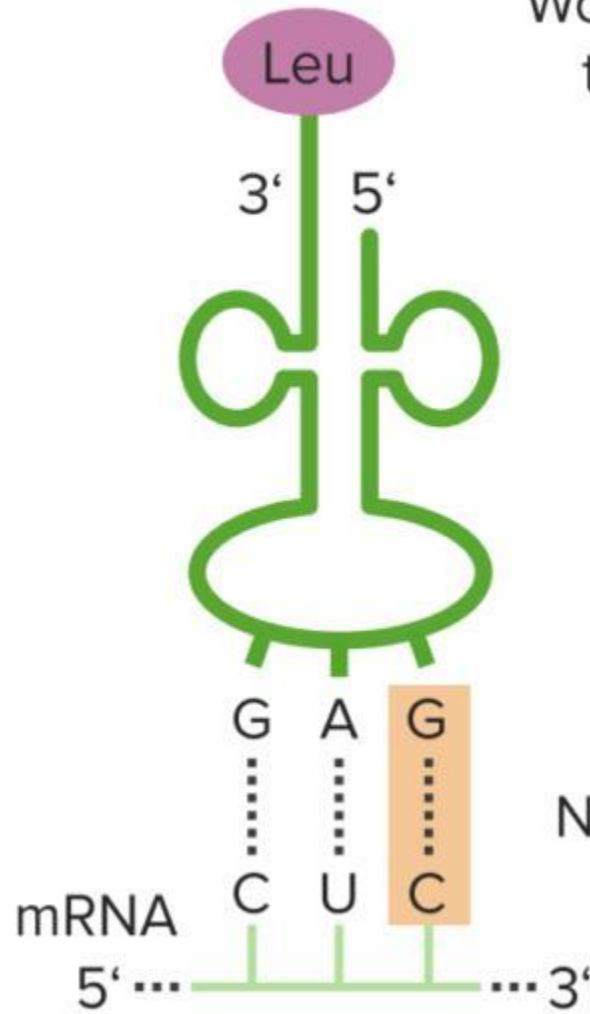


tRNA. Structure secondaire



tRNA. Structure tertiaire

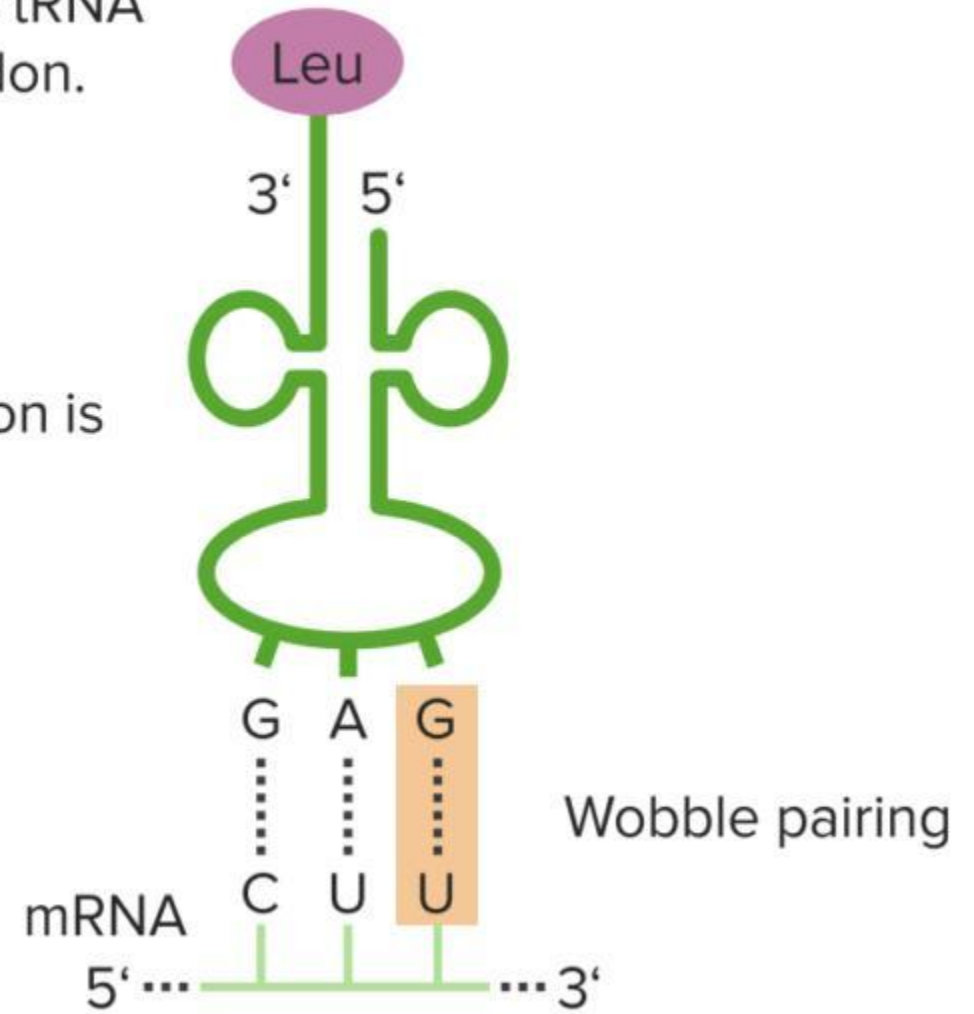
Wobble pairing allows a single tRNA to "read" more than one codon.



Normal pairing

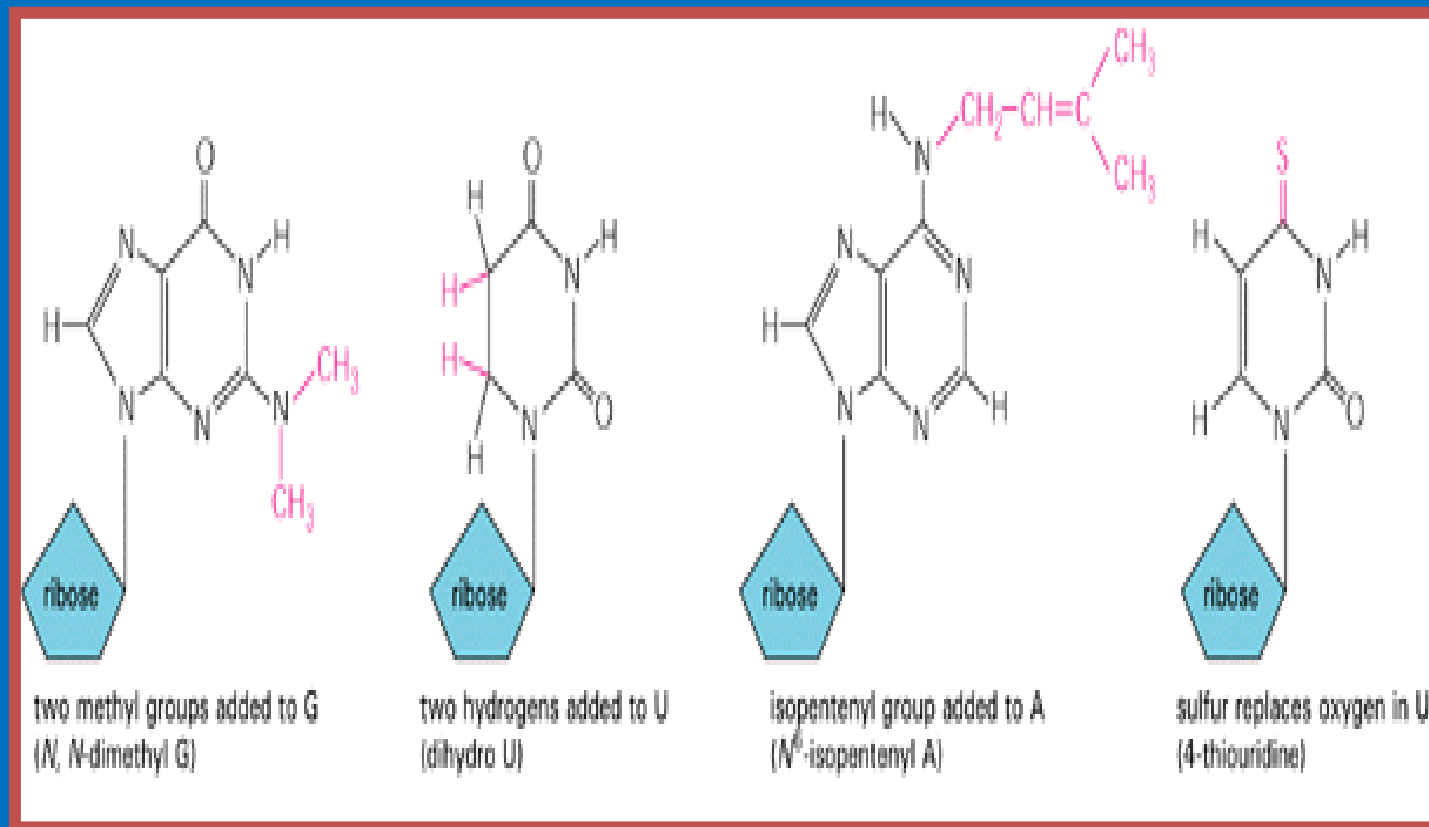
Identical leucine tRNAs

Pairing in the third position is less stringent.



Wobble pairing

Περιέχουν πολλές ασυνήθεις βάσεις ανά μόριο, τυπικά μεταξύ 7 και 15.



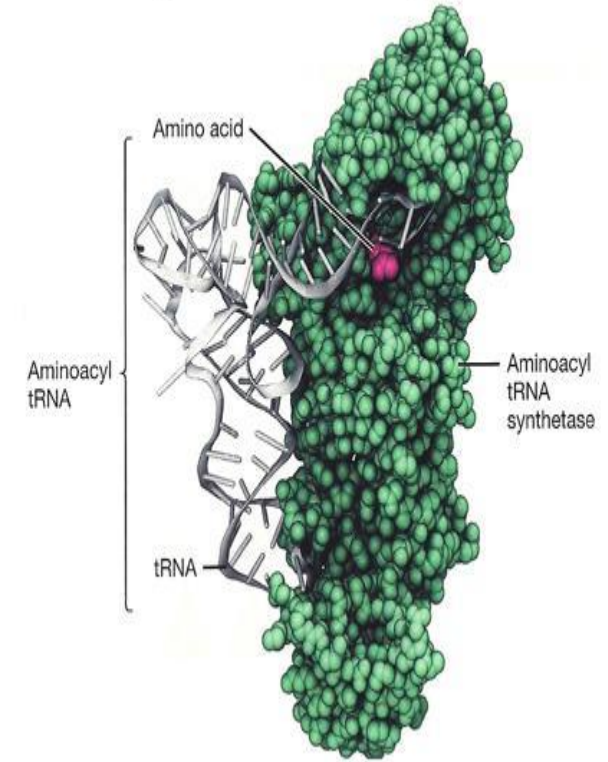
Τα tRNA και η “φόρτισή” τους

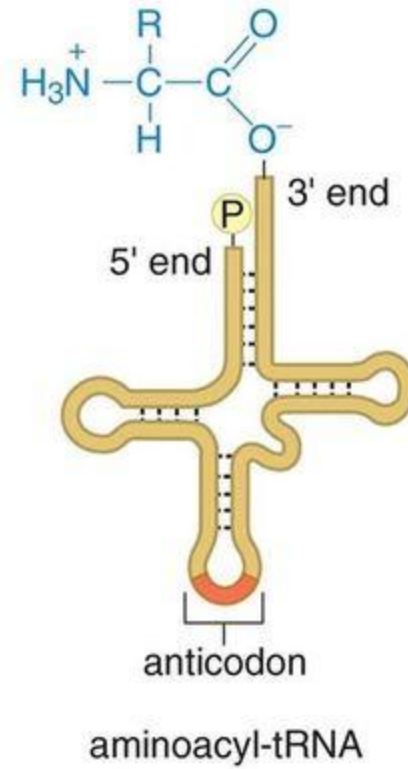
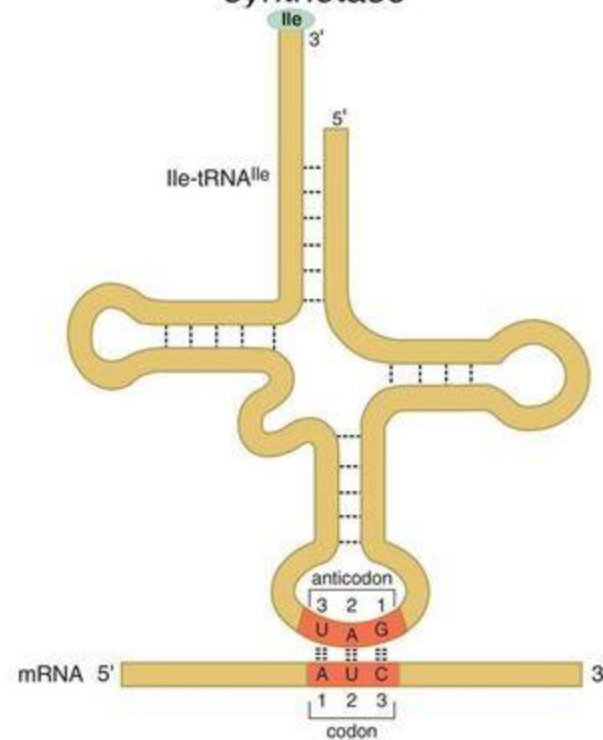
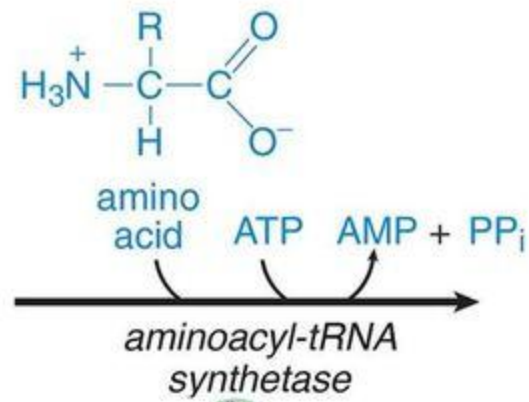
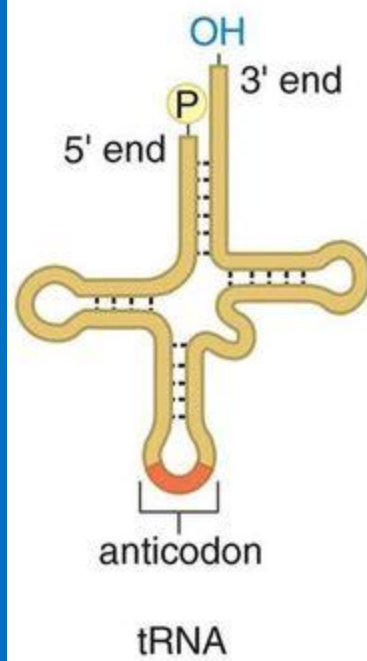
- Τα tRNA είναι:
 - προσαρμοστικά μόρια (adapters) που συνδέουν
 - τα κωδικόνια του mRNA
 - με τα σωστά αμινοξέα
 - Κάθε tRNA:
 - διαθέτει αντικωδικόνιο
 - που αναγνωρίζει συμπληρωματικά ένα κωδικόνιο στο mRNA
 - Το αμινοξύ:
 - συνδέεται στο 3' άκρο CCA του tRNA
 - μέσω εστερικού δεσμού (αμινοακυλο-εστέρας)
 - συγκεκριμένα στο 3'-OH της αδενοσίνης
 - tRNA που φέρει αμινοξύ:
- ονομάζεται φορτισμένο tRNA (charged tRNA ή aminoacyl-tRNA)

Ρόλος των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών

- Η σύνδεση του σωστού αμινοξέος με το σωστό tRNA γίνεται από:
 - αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες (aminoacyl-tRNA synthetases)
 - Υπάρχουν:
 - 20 διαφορετικές συνθετάσες (μία για κάθε αμινοξύ)
 - Κάθε συνθετάση:
 - αναγνωρίζει:
 - ένα συγκεκριμένο αμινοξύ
 - και ένα ή περισσότερα tRNA που το μεταφέρουν
 - Επιπλέον:
 - διαθέτει συχνά μηχανισμό επιδιόρθωσης (editing)
 - απομακρύνει λανθασμένα αμινοξέα

Aminoacyl tRNA synthetase

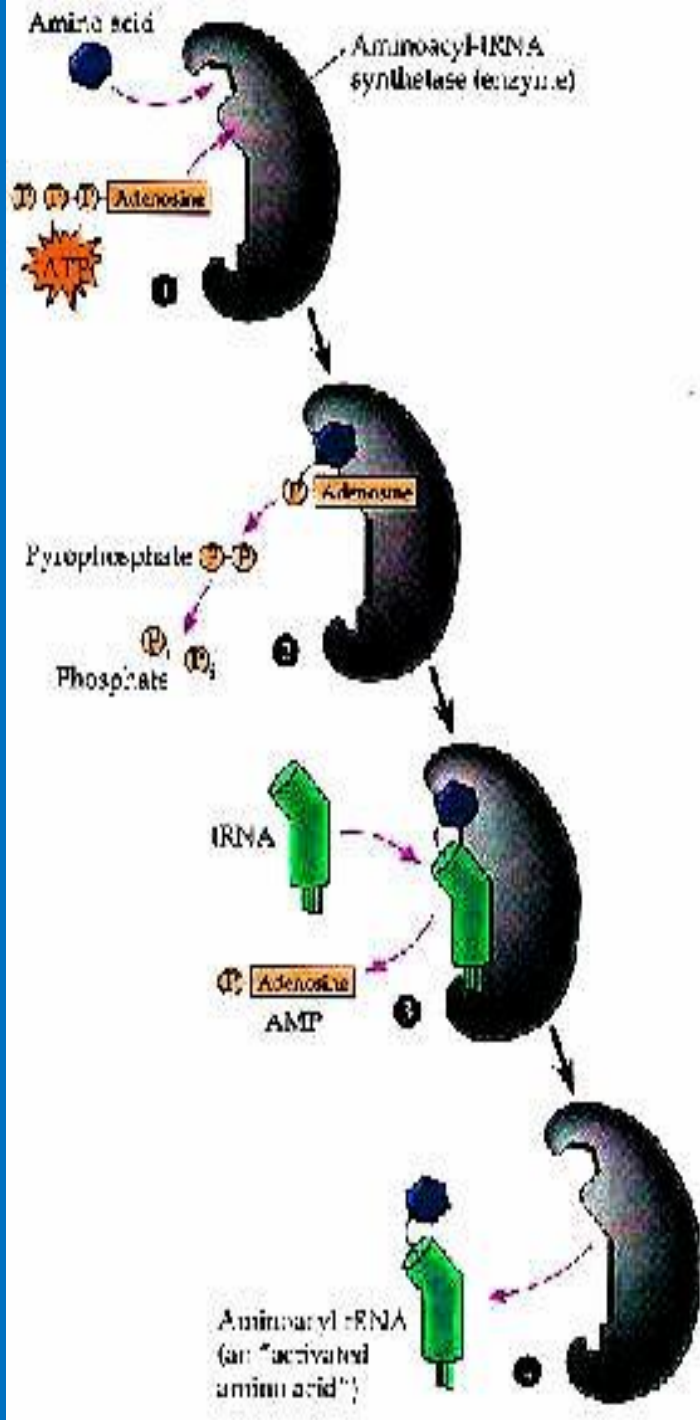




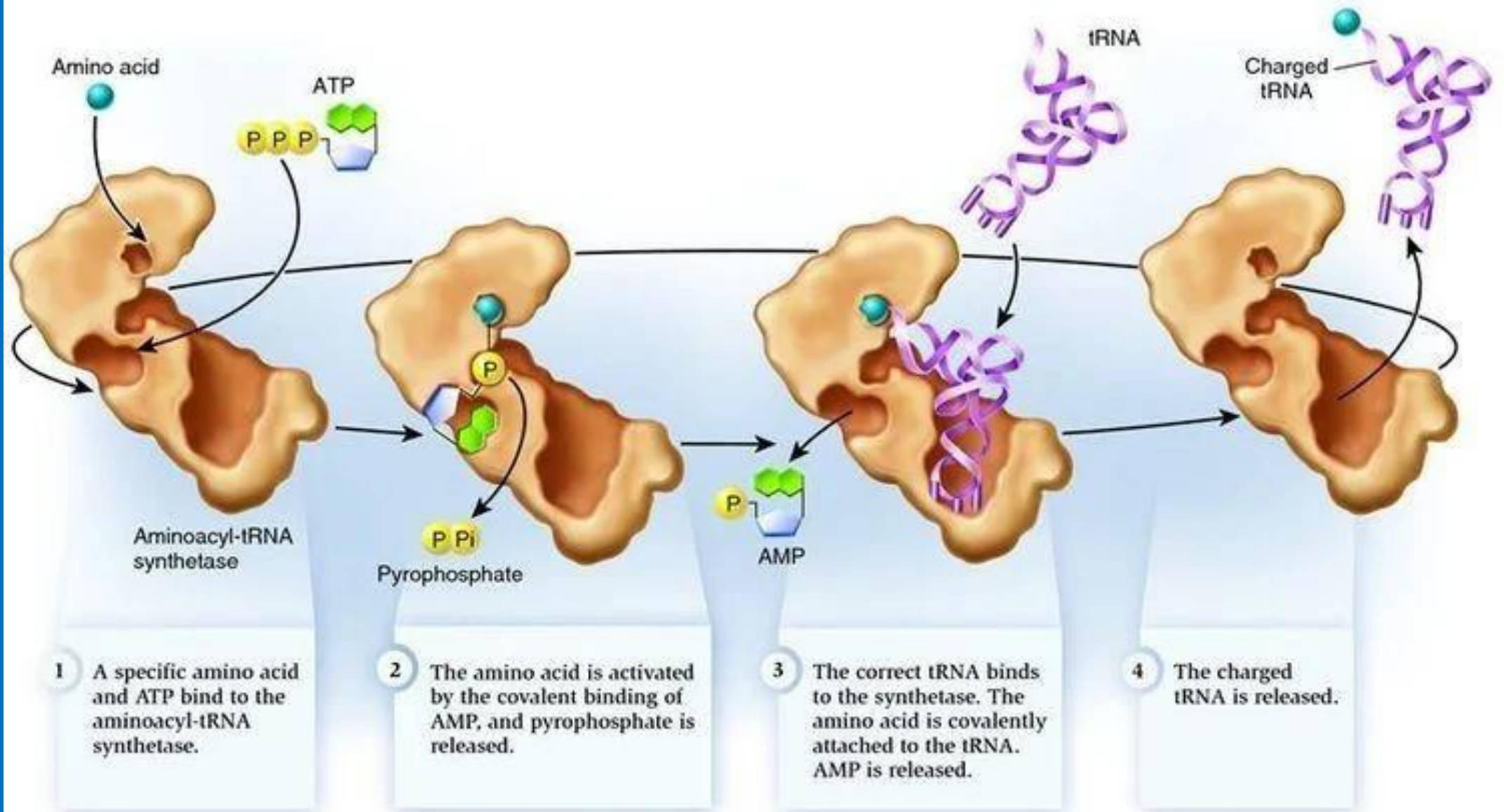
Ενεργοποίηση των αμινοξέων

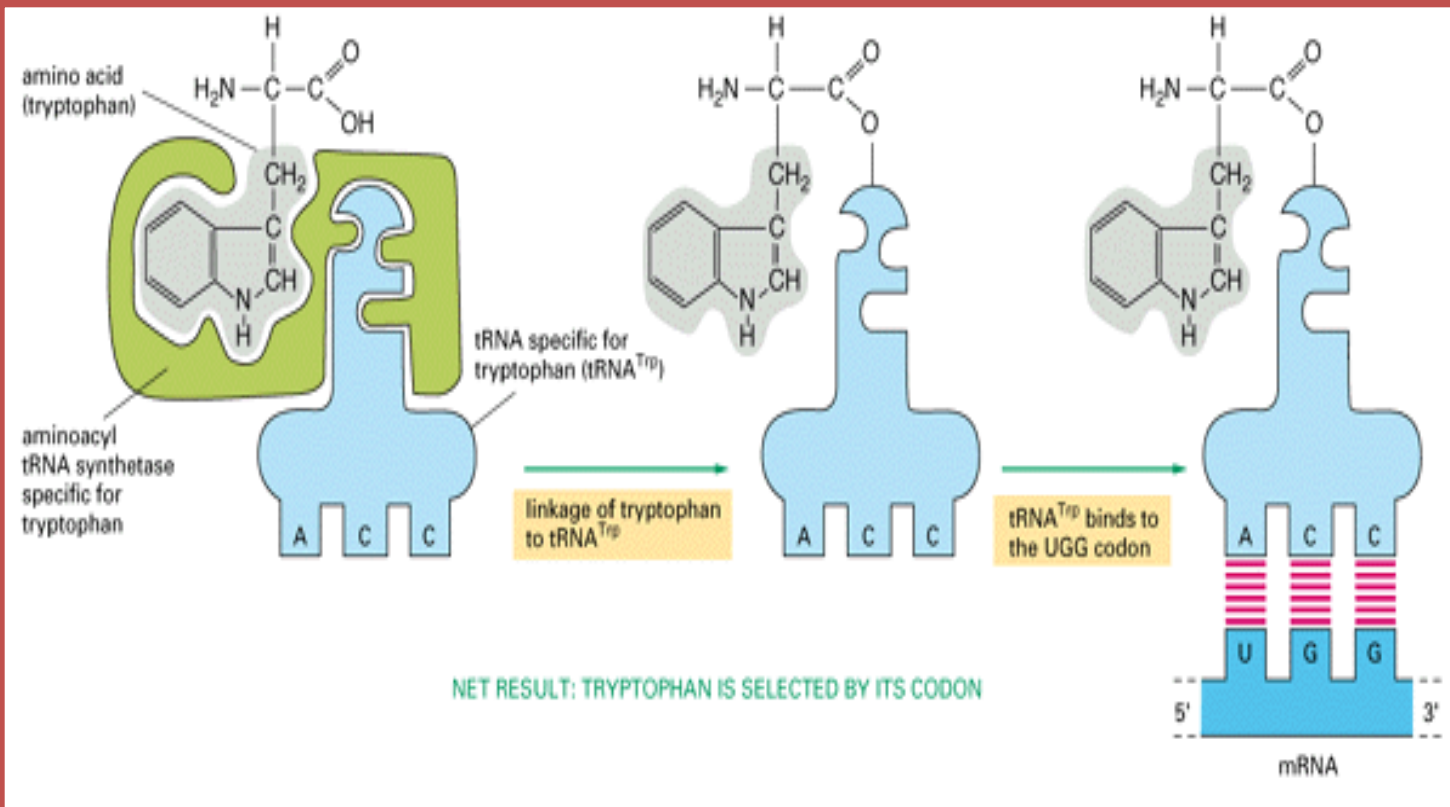
Αμινοξύ + ATP $\rightarrow$ αμινοακυλο-AMP + PPi

αμινοακυλο-AMP + tRNA $\rightarrow$ AMP +
αμινοακυλο- tRNA



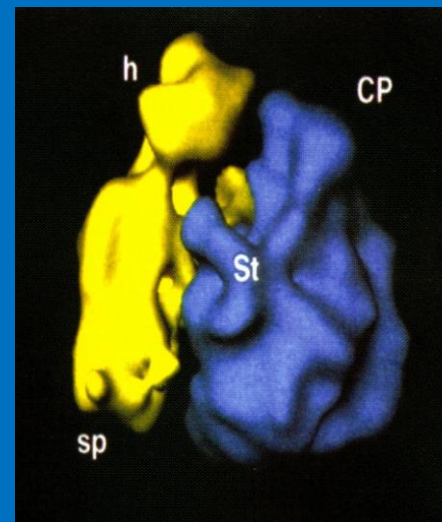
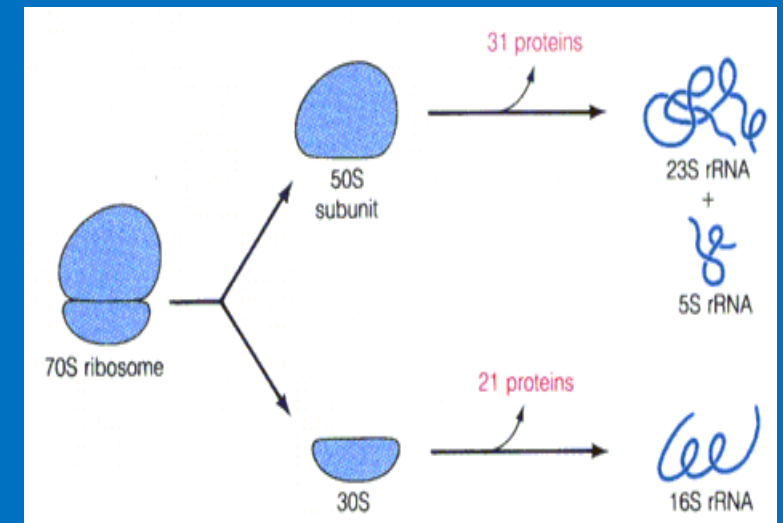
Για κάθε αμινοξύ υπάρχει μία **αμινοακυλο-tRNA συνθετάση**, η οποία μπορεί και αναγνωρίζει και όλα τα ισοδεκτικά tRNA του συγκεκριμένου αμινοξέος. Τα δύο στάδια της αντίδρασης εξυπηρετούν έναν μηχανισμό ελέγχου ενσωμάτωσης του σωστού αμινοξέος.

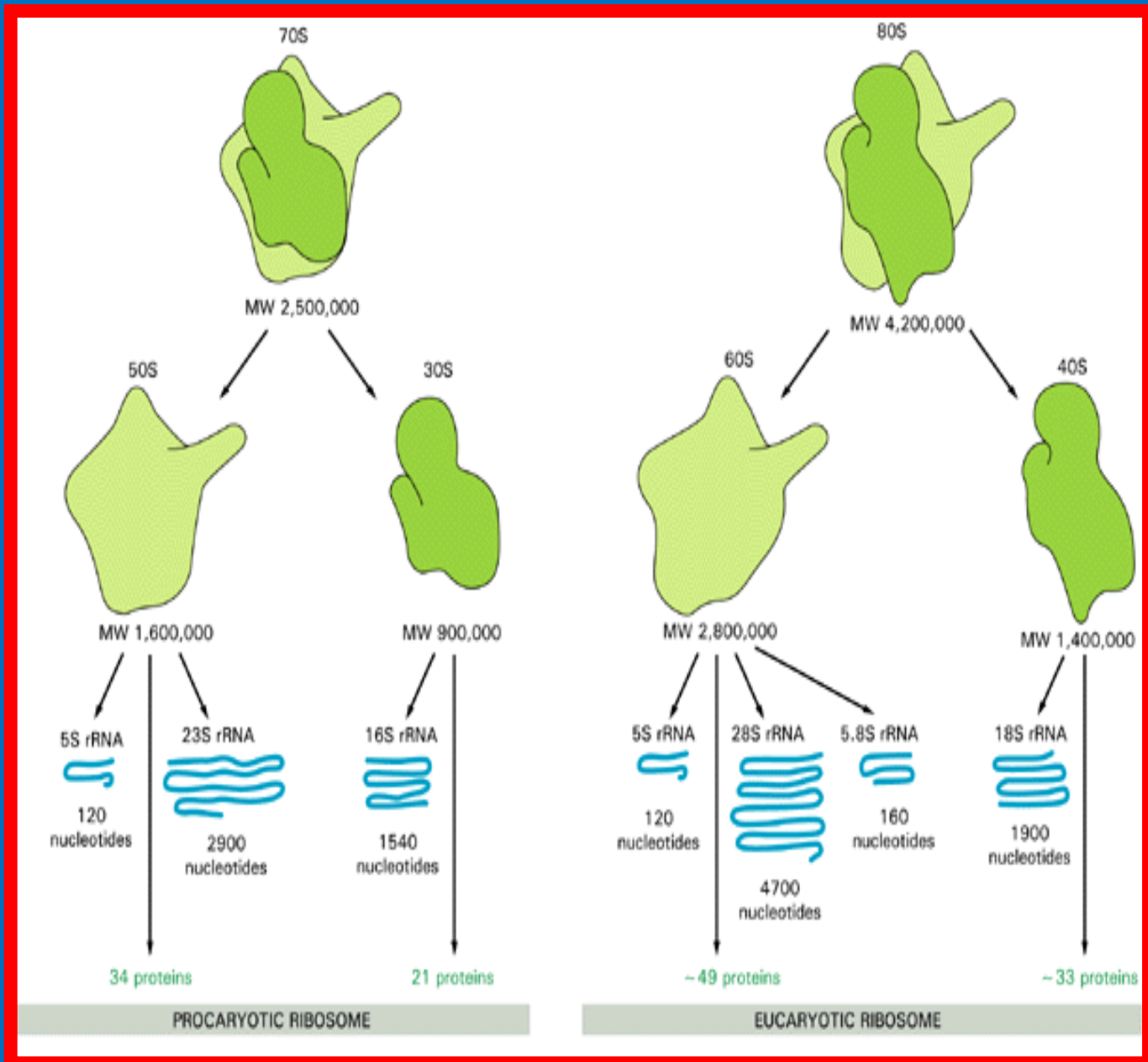




Σύμπλοκα RNA – πρωτεϊνών π.χ. ριβοσώματα

Ριβόσωμα	Σωματικό βάρος	Σταθερή καθίζησης	RNA	Πρωτεΐνες
Προκαρυωτικό	$2,8 \times 10^6$	70 S		
Μεγάλη υπομονάδα	$1,8 \times 10^6$	50 S	23 S και 5 S	30
Μικρή υπομονάδα	1×10^6	30 S	16S	20
Ευκαρυωτικό	4×10^6	70 - 80 S		
Μεγάλη υπομονάδα	$2,7 \times 10^6$	60 S	28 S, 5,8 S, 5 S	>50
Μικρή υπομονάδα	$1,3 \times 10^6$	40 S	18 S	30





Αν και υπάρχουν 61 κωδικόνια που προσδιορίζουν την ενσωμάτωση των 20 αμινοξέων ο αριθμός των διαφορετικών tRNA είναι 35 στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και 50 στους ευκαρυωτικούς. Δηλαδή ορισμένα tRNA (**ισοδεκτικά**) μπορούν και αναγνωρίζουν περισσό-τερα του ενός κωδικόνια. Αυτό συμβαίνει γιατί η πρώτη βάση του αντικωδικονίου μπορεί να αναγνωρίζει περισσότερες από μία ως τρίτη βάση του αντικωδικονίου. Το φαινόμενο αυτό καλείται ταλάντωση (wobble) και συμβάλει στην εκφύλιση του γενετικού κώδικα.

Επιτρεπόμενα ζυγαρώματα στην τρίτη βάση του κωδικίου σύμφωνα με την υπόθεση «wobble».

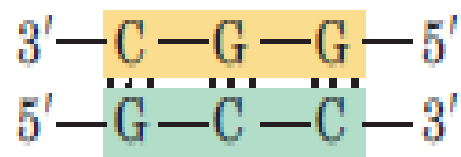
Πρώτη βάση του αντικωδικίου	Τρίτη βάση του κωδικίου
C	G
A	U
U	A ή G
G	U ή C
I	U, C, ή A

Π.χ το αντικωδικόνιο (**IGC**) του tRNA της αλανίνης στους ζυμομύκητες μπορεί και αναγνωρίζει και τα τρία κωδικόνια της αλανίνης (**GCU, GCC, GCA**).



tRNA

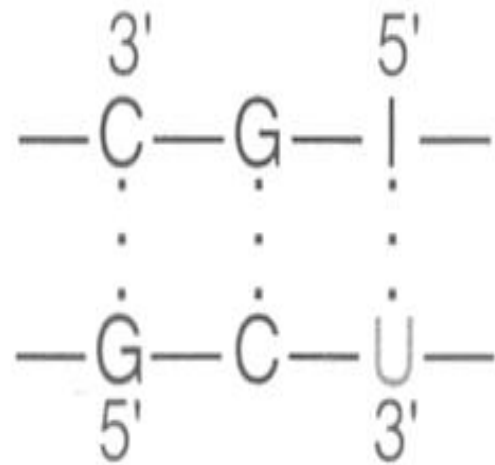
Αντικωδικόνιο



Κωδικόνιο

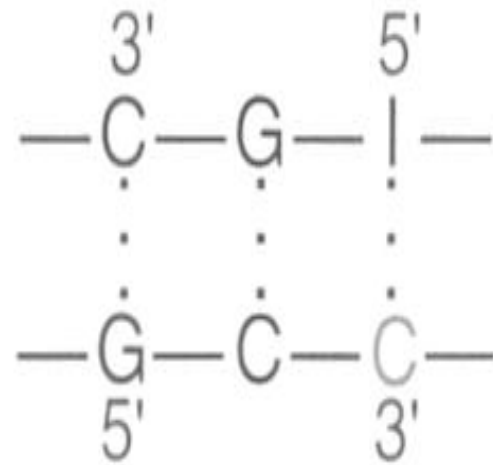
mRNA

ΑΝΤΙΚΩΔΙΚΙΟ



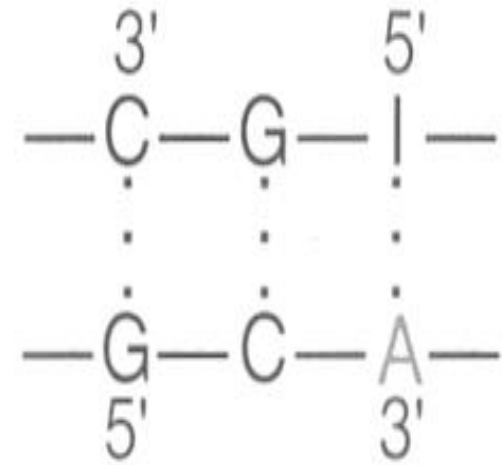
Κωδίκιο

ΑΝΤΙΚΩΔΙΚΙΟ



Κωδίκιο

ΑΝΤΙΚΩΔΙΚΙΟ



Κωδίκιο

ΠΙΝΑΚΑΣ 30.1

Ο γενετικός κώδικας

Πρώτη βάση (5'-άκρο)	Δεύτερη βάση				Τρίτη βάση (3'- άκρο)
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met*	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

Οι τρεις λειτουργικές θέσεις του ριβοσώματος

A θέση (Aminoacyl site)

- εισέρχεται το νέο αμινοακυλο-tRNA
- μεταφέρει το επόμενο αμινοξύ

P θέση (Peptidyl site)

- συγκρατεί το tRNA με την αναπτυσσόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα
- πραγματοποιείται ο σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού

E θέση (Exit site)

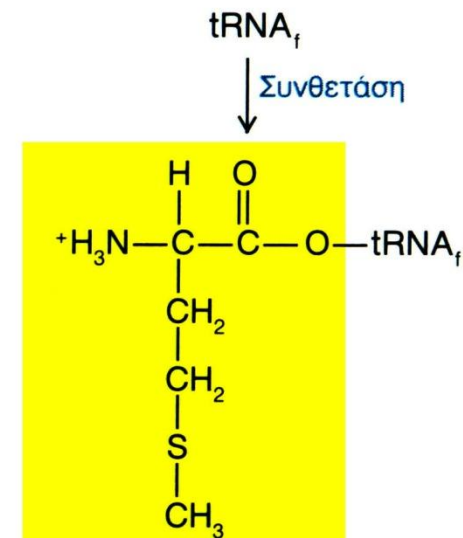
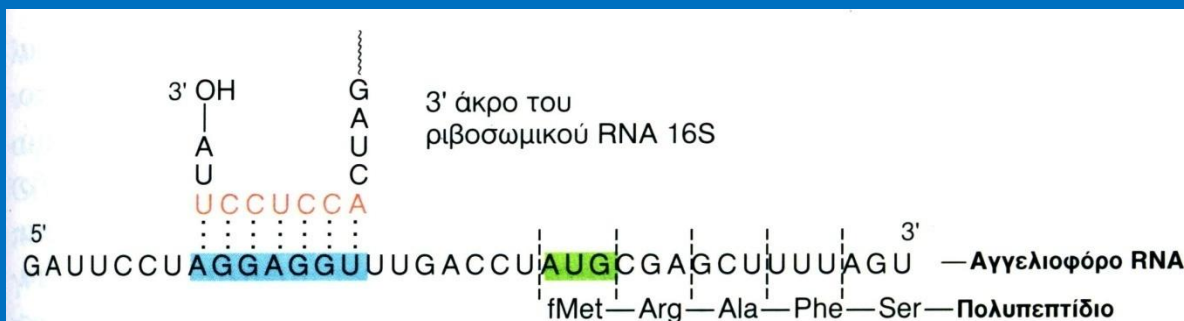
- απομακρύνεται το «άδειο» tRNA

Πως αρχίζει η πρωτεϊνοσύνθεση?

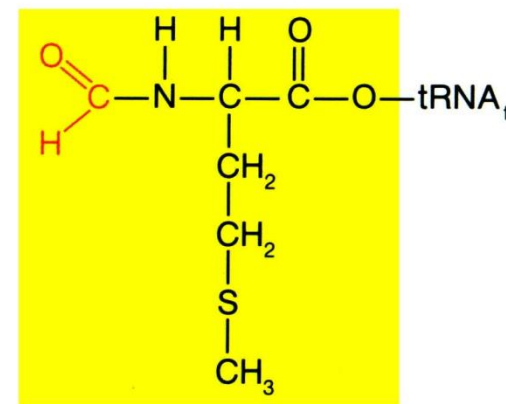
Η μετάφραση δεν αρχίζει κατευθείαν στο 5' άκρο του mRNA. Το πρώτο κωδικόνιο που μεταφράζεται είναι το AUG που κωδικοποιεί την φορμυλο-μεθειονίνη, η οποία έρχεται στο ριβόσωμα από ένα ειδικό tRNA ($tRNA_f$) διαφορετικό από αυτό που εισάγει μεθειονίνη σε εσωτερικές θέσεις ($tRNA_m$).

Πως το εναρκτήριο AUG διακρίνεται από εκείνο που κωδικοποιεί μια εσωτερική Met?

Το εναρκτήριο AUG βρίσκεται λίγες βάσεις μετά από μια περιοχή πλούσια σε πουρίνες, η οποία ονομάζεται αλληλουχία *Shine-Dalgarno* και ζευγαρώνει με το 3' άκρο του 16S rRNA.



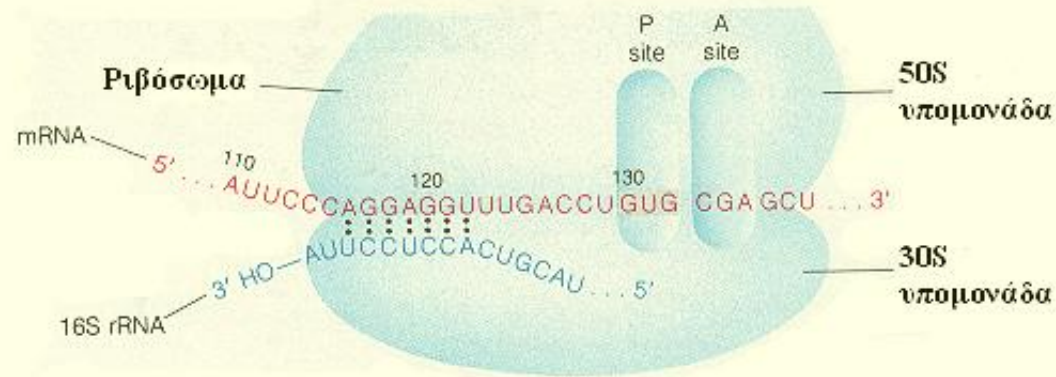
Μεθειονυλο- $tRNA_f$
(Met- $tRNA_f$)



Φορμυλομεθειονυλο- $tRNA_f$
(fMet- $tRNA_f$)

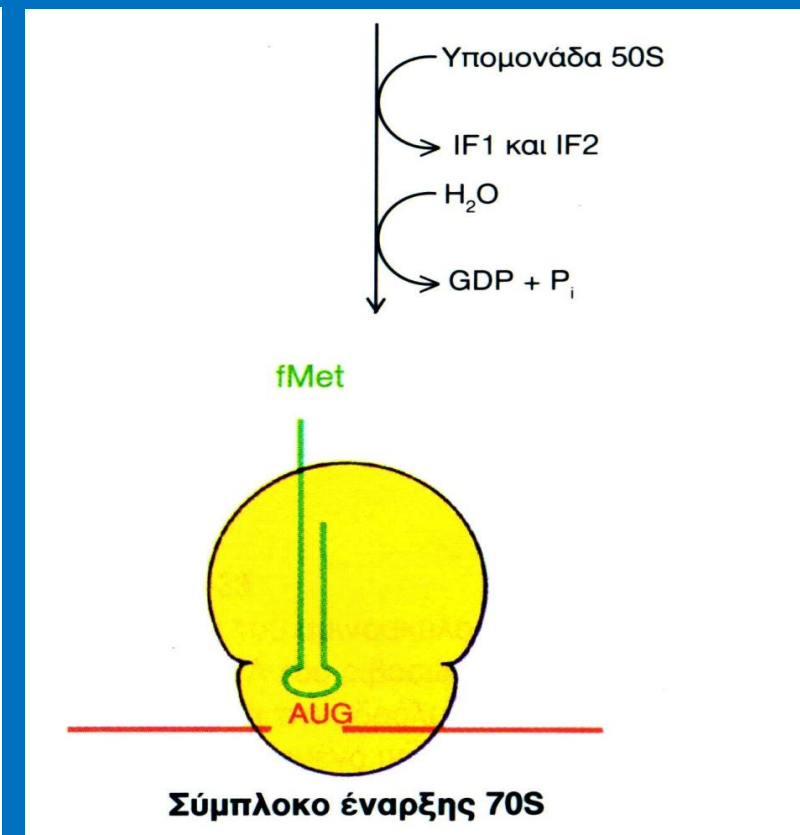
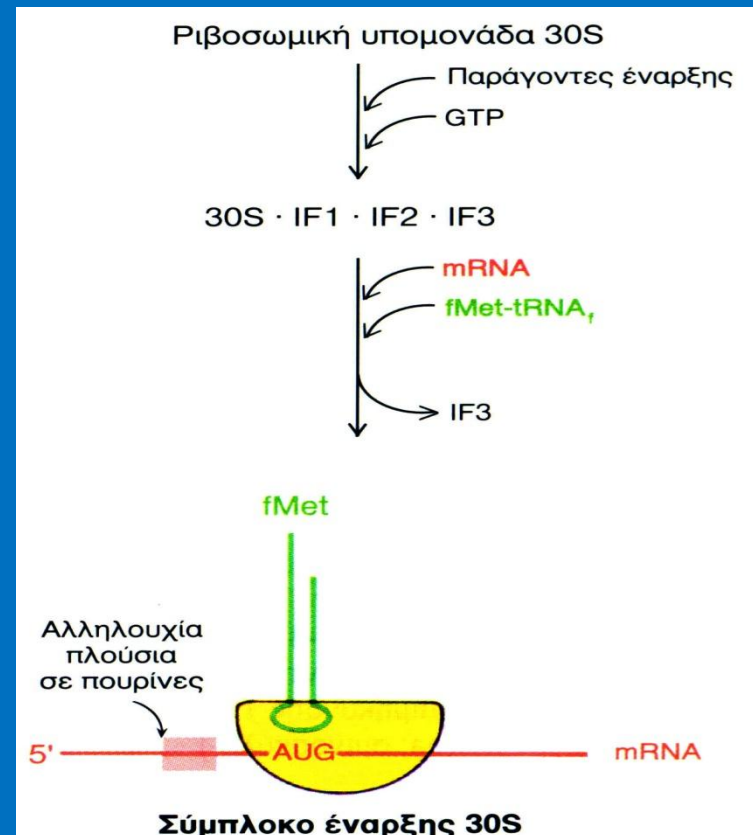
AGCACGAGGGGAAAUCUGAUGGAACGCUAC	<i>E. coli trpA</i>
UUUGGAUGGAGUGAAACGAUGGCGAUUGCA	<i>E. coli araB</i>
GGUAACCAGGUAACAACCAUGCGAGUGUUG	<i>E. coli thrA</i>
CAAUUCAGGGUGGUGAAUGUGAAACCAGUA	<i>E. coli lacI</i>
AAUCUUGGAGGCUUUUUUUAUGGUUCGUUCU	ϕ X174 phage A protein
UAACUAAGGAUGAAAUGCAUGUCUAAGACA	Q β phage replicase
UCCUAGGAGGUUUGACCUAUGCGAGCUUUU	R17 phage A protein
AUGUACUAAGGAGGUUGUAUGGAACAACGC	λ phage <i>cro</i>

└──────────┘
└──┘
 Pairs with Pairs with
 16S rRNA initiator tRNA



Πως το mRNA και το φορμυλομεθειονυλο-tRNAf συνδέονται με το ριβόσωμα προκειμένου να αρχίσει η πρωτεϊνοσύνθεση?

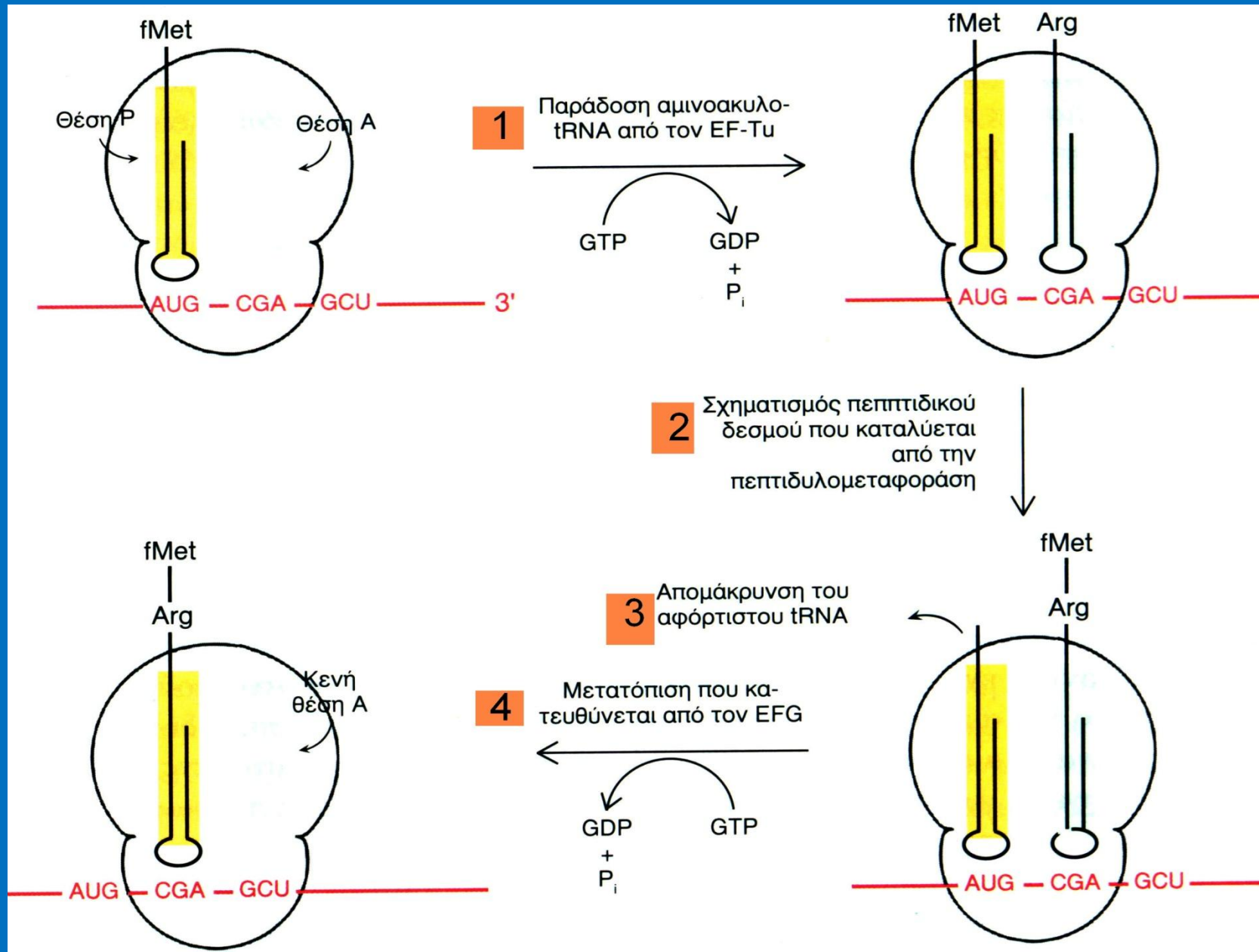
Απαιτούνται τρεις πρωτεϊνικοί *παράγοντες έναρξης* (IF_1 , IF_2 και IF_3) που αρχικά προσδένονται στην μικρή υπομονάδα. Στη συνέχεια η δέσμευση του GTP στον IF_2 κάνει δυνατή την δέσμευση του mRNA και του εναρκτηρίου tRNA στο σύμπλοκο. Ακολουθεί η απομάκρυνση των παραγόντων έναρξης και η δέσμευση της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας.



Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΑΡΞΗΣ IF2

- Ο IF2 είναι GTP-άση
- συνδέεται με GTP και το fMet-tRNA^f
- μεταφέρει το εναρκτήριο tRNA στη θέση P της υπομονάδας 30S
- βοηθά στην αναγνώριση του κωδικονίου έναρξης AUG
 - Η υδρόλυση $\text{GTP} \rightarrow \text{GDP} + \text{P}_i$:
 - προκαλεί αποδέσμευση του IF2
 - επιτρέπει τη σύνδεση της υπομονάδας 50S
 - σχηματίζει το σύμπλοκο έναρξης 70S
- εξασφαλίζει τη σωστή έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης

Στάδιο επιμήκυνσης



ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ EF-Tu ΚΑΙ EF-Ts ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑΣ

- Ο EF-Tu-GTP μεταφέρει το αμινοακυλο-tRNA στη θέση A του ριβοσώματος
- Εάν το αντικωδικόνιο του tRNA ζευγαρώσει σωστά με το κωδικόνιο:
 - υδρολύεται το $GTP \rightarrow GDP + P_i$
 - ο EF-Tu αποσυνδέεται
 - το tRNA παραμένει στο ριβόσωμα
- Εάν η σύζευξη είναι λανθασμένη:
 - το tRNA απομακρύνεται
 - δεν σχηματίζεται πεπτιδικός δεσμός
- Ο EF-Ts:
 - απομακρύνει το GDP από τον EF-Tu
 - επιτρέπει νέα σύνδεση GTP
- επαναφέρει τον EF-Tu στην ενεργή μορφή

Αποτέλεσμα:

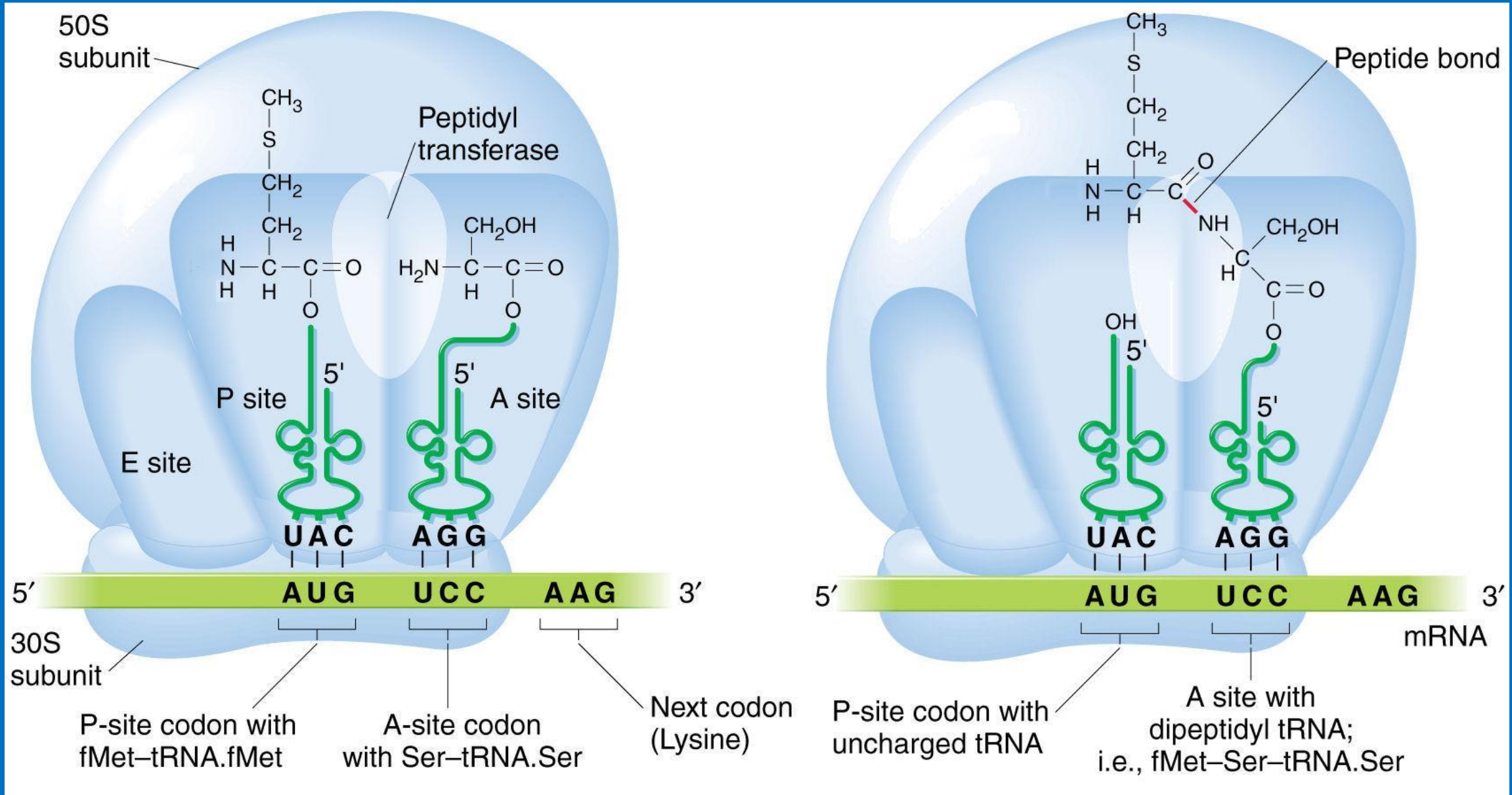
- πραγματοποιείται έλεγχος πιστότητας (proofreading)
- μόνο τα σωστά tRNA συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση

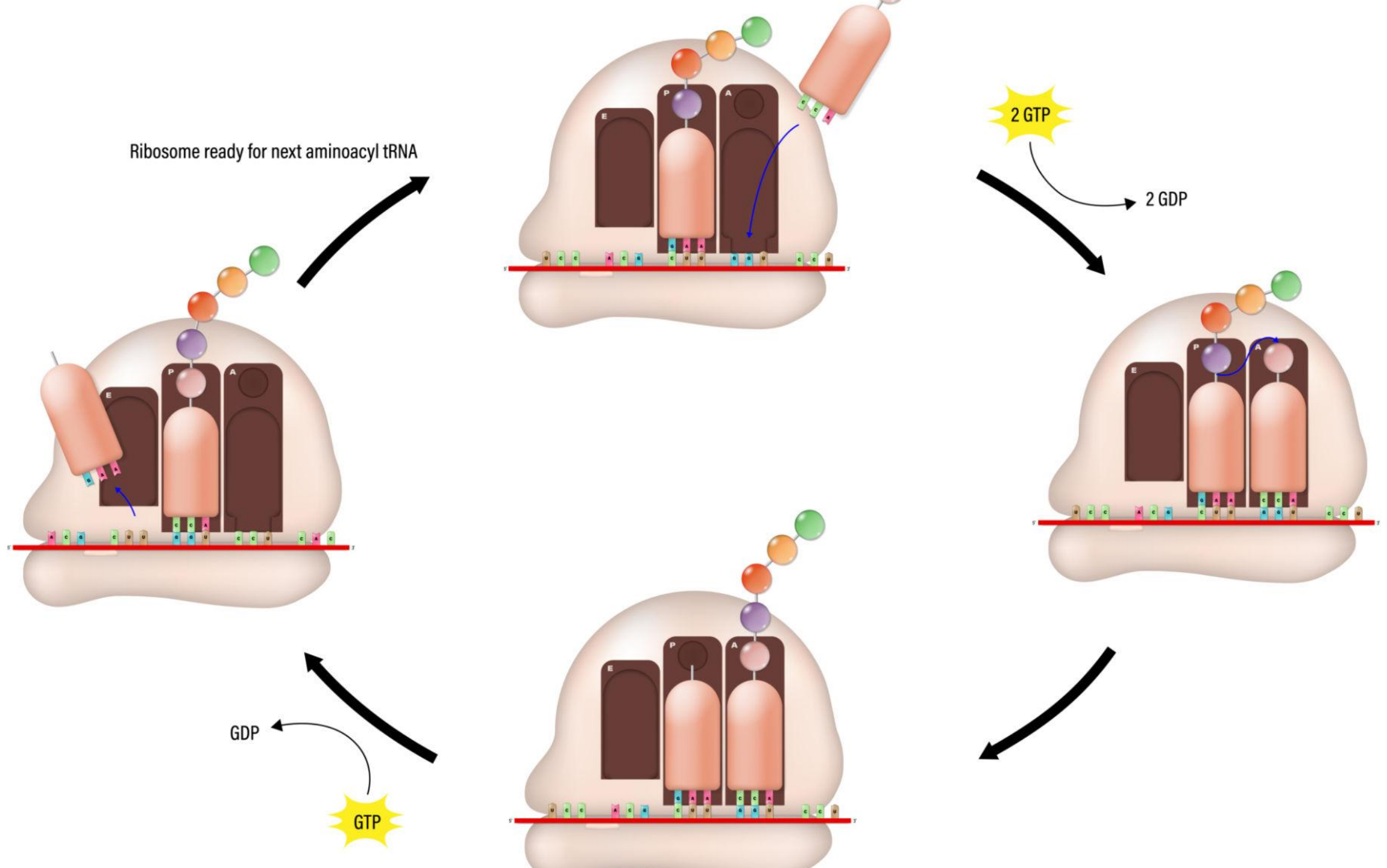
•Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού

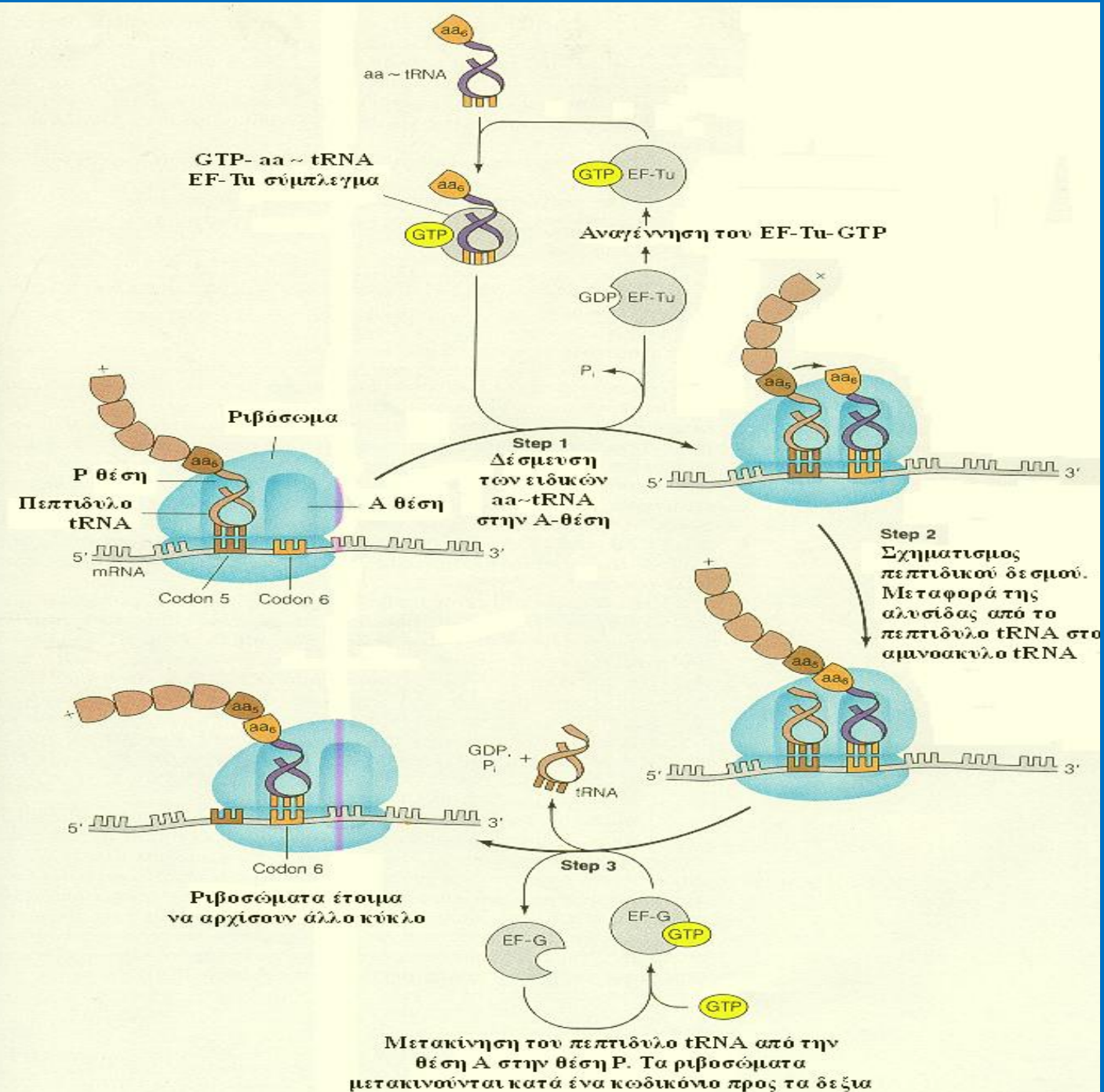
- Το αμινοακυλο-tRNA καταλαμβάνει τη θέση A
- Το fMet-tRNA βρίσκεται στη θέση P
- Ο παράγοντας EF-Tu έχει ήδη αποδεσμευθεί μετά τη σωστή σύζευξη κωδικονίου—αντικωδικονίου
 - Το ριβόσωμα είναι πλέον έτοιμο: για τον σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού
- Ο πεπτιδικός δεσμός σχηματίζεται: μεταξύ του αμινοξέος της θέσης A και της αναπτυσσόμενης πεπτιδικής αλυσίδας της θέσης P
- Η αντίδραση καταλύεται από την πεπτιδυλο-μεταφοράση , καταλυτική ενεργότητα της υπομονάδας 50S

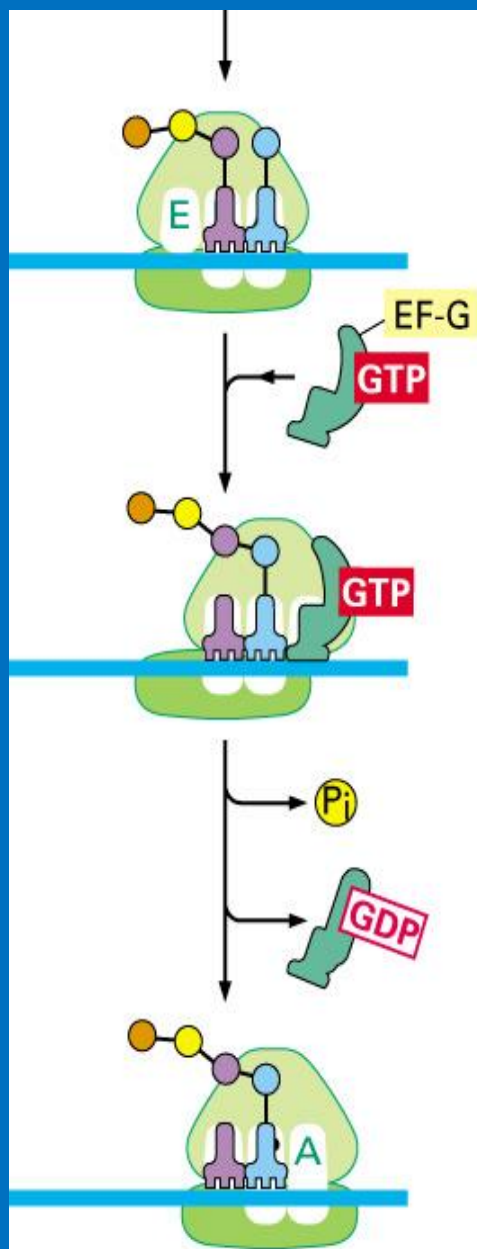
•Αποτέλεσμα:

- η πεπτιδική αλυσίδα μεταφέρεται στο tRNA της θέσης A









Μετατόπιση (Translocation) του ριβοσώματος

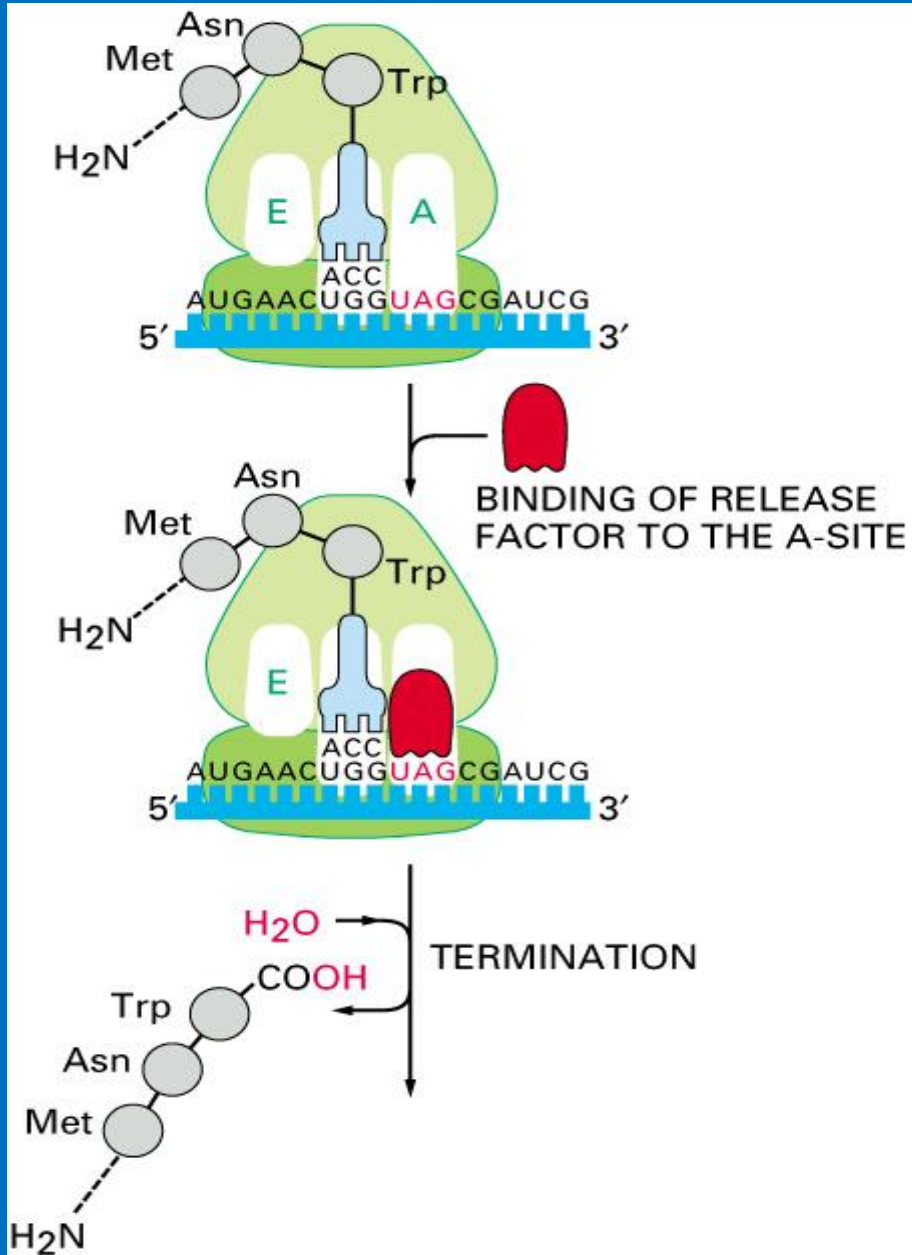
- Μετά τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού: η αναπτυσσόμενη πεπτιδική αλυσίδα βρίσκεται πλέον στο tRNA της θέσης A
- Ο παράγοντας επιμήκυνσης **EF-G** (ή EF-2 στα ευκαρυωτικά κύτταρα): συνδέεται με GTP προσδένεται στο ριβόσωμα
- Η υδρόλυση $GTP \rightarrow GDP + P_i$: παρέχει ενέργεια, προκαλεί μετατόπιση του ριβοσώματος κατά ένα κωδικόνιο πάνω στο mRNA

Κατά τη μετατόπιση:

- το tRNA με την πεπτιδική αλυσίδα: μετακινείται από τη θέση A στη θέση P
- το «άδειο» tRNA: μετακινείται από τη θέση P στη θέση E και τελικά απομακρύνεται από το ριβόσωμα
- Η θέση A: γίνεται ξανά ελεύθερη για την είσοδο νέου αμινοακυλο-tRNA

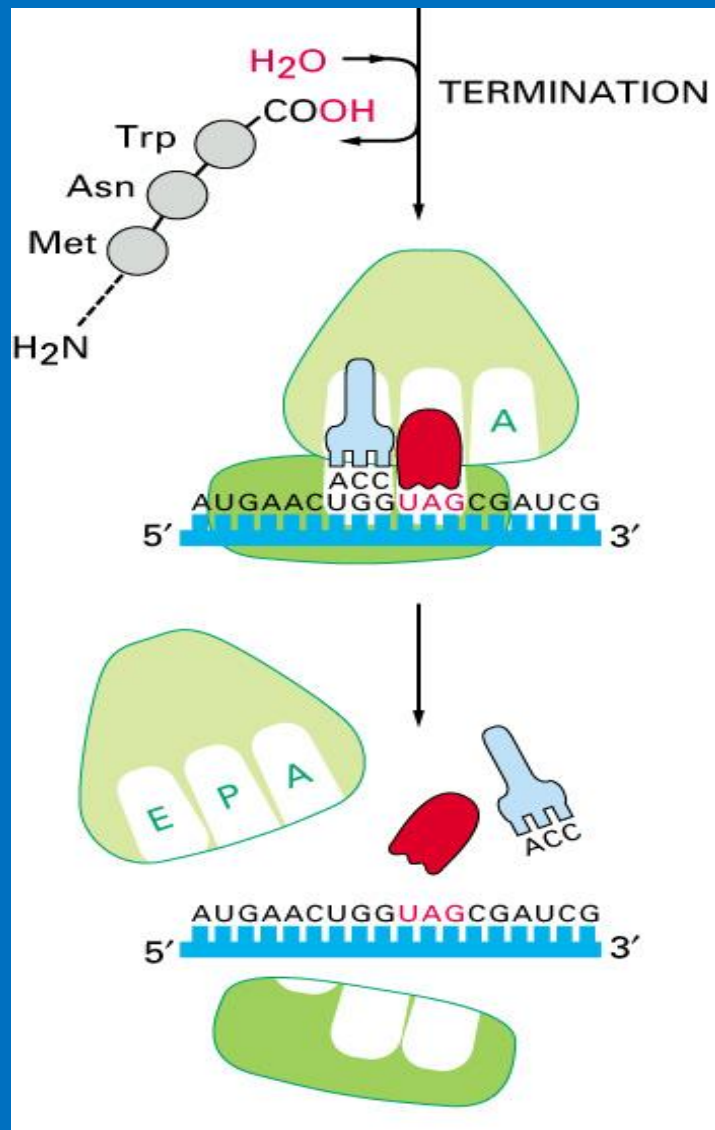
Σημασία:

- η υδρόλυση GTP από τους παράγοντες EF-Tu και EF-G:
 - εξασφαλίζει την κατεύθυνση και την πιστότητα της πρωτεϊνοσύνθεσης
 - επιτρέπει τη συνεχή επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας



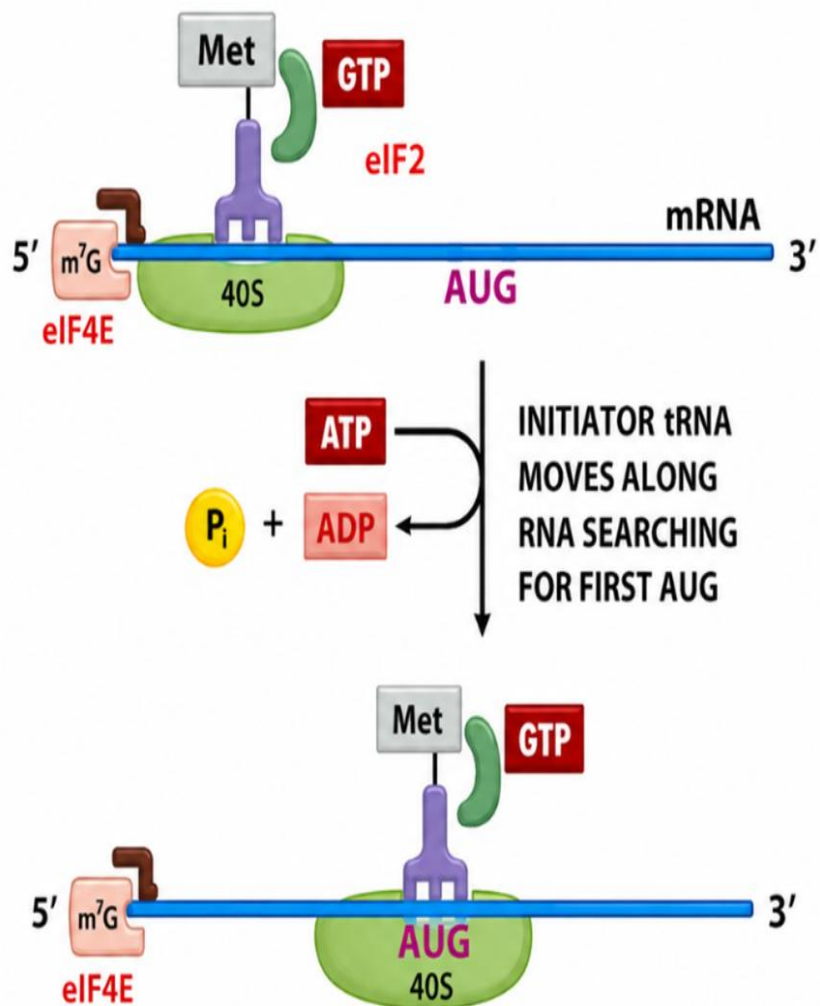
ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗΣ

- Ο τερματισμός της μετάφρασης αρχίζει: όταν στη θέση A εμφανιστεί κωδικόνιο λήξης (UAA, UAG ή UGA)
 - Τα κωδικόνια λήξης: δεν αναγνωρίζονται από tRNA αναγνωρίζονται από παράγοντες απελευθέρωσης (release factors)
 - Ο παράγοντας απελευθέρωσης: προσδένεται στη θέση A του ριβοσώματος προκαλεί υδρόλυση του δεσμού μεταξύ πεπτιδικής αλυσίδας και tRNA
 - Με τη συμμετοχή H_2O : η πολυπεπτιδική αλυσίδα απελευθερώνεται
 - ολοκληρώνεται η πρωτεϊνοσύνθεση
- Αποτέλεσμα:**
- η νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη αποδεσμεύεται
 - οι ριβοσωμικές υπομονάδες διαχωρίζονται
 - το ριβόσωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά σε νέο κύκλο μετάφρασης



Αποσυναρμολόγηση και ανακύκλωση του ριβοσώματος

- Μετά την απελευθέρωση της πρωτεΐνης: το tRNA απομακρύνεται, οι παράγοντες απελευθέρωσης αποσυνδέονται
 - Το ριβόσωμα: διαχωρίζεται στις υπομονάδες 50S και 30S
 - Το mRNA: αποδεσμεύεται από το ριβόσωμα
- Αποτέλεσμα:**
- οι ριβοσωμικές υπομονάδες ανακυκλώνονται
 - μπορούν να συμμετάσχουν σε νέο κύκλο πρωτεϊνοσύνθεσης

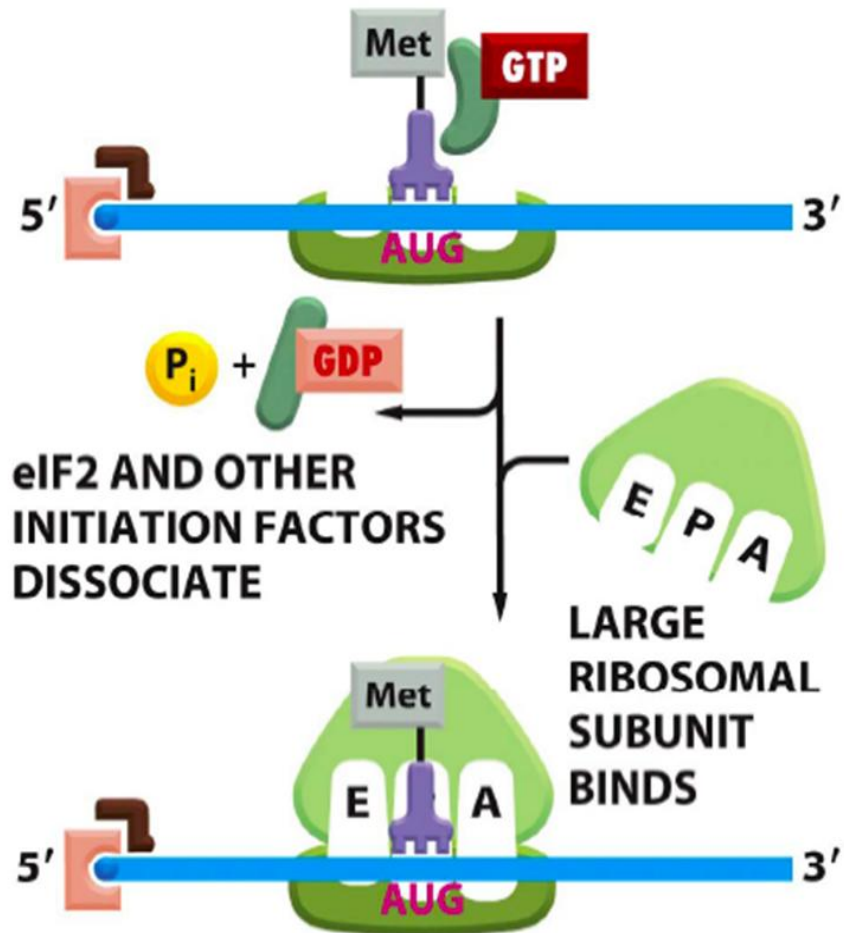


Ευκαρυωτική έναρξη της μετάφρασης

- Ο παράγοντας έναρξης eIF4E: αναγνωρίζει το 5' cap του mRNA
- Ο eIF2-GTP: συνδέεται με το εναρκτήριο Met-tRNA_i
- Μαζί με τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 40S: σχηματίζουν το σύμπλοκο προέναρξης 43S
- Το σύμπλοκο: σαρώνει το mRNA από το 5' → 3' αναζητώντας το πρώτο AUG
 - Η διαδικασία σάρωσης: απαιτεί ενέργεια από ATP
- Όταν αναγνωριστεί το AUG: το Met-tRNA_i τοποθετείται στη θέση P
 - ακολουθεί σύνδεση της μεγάλης υπομονάδας 60S
 - σχηματίζεται το ριβόσωμα 80S

Σημασία:

- εξασφαλίζεται η σωστή επιλογή του κωδικονίου έναρξης
- αρχίζει η πρωτεϊνοσύνθεση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς



Τελικό στάδιο ευκαρυωτικής έναρξης της μετάφρασης

- Μετά την αναγνώριση του AUG: το Met-tRNA_i παραμένει στη θέση P της υπομονάδας 40S
- Ο eIF2 υδρολύει: $GTP \rightarrow GDP + P_i$
- Οι παράγοντες έναρξης: αποσυνδέονται από το σύμπλοκο
- Η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα 60S: συνδέεται με την 40S
- Σχηματίζεται το πλήρες ριβόσωμα 80S: με το εναρκτήριο tRNA στη θέση P και τη θέση A ελεύθερη για το επόμενο αμινοακυλο-tRNA

Αποτέλεσμα:

- ολοκληρώνεται το στάδιο έναρξης
- αρχίζει η επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας