

Program predavanj maj-junij 2013

Datum izvajanja		Vsebina predavanja / vaj
8. 5. 2013	P2 11-15	DNA, replikacija, RNA, transkripcija, translacija
15. 5. 2013	P2 11-15	Mutacije, variabilnost genoma PBL- naloge
22.5.2013	P2 11-15	Metode molekularne diagnostike (izolacija DNA, PCR, EF, RFLP, SSCP, sekveniranje, RT-PCR, mikromreže) KARIOTIP PBL-sprotnopreverjanje
24.5.2013	P1 13-17	Klon-metode Etični vidiki-diskusija PBL- naloge
29. 5. 2013	P2 11-15	Genska tehnologija, matične celice, celično in tkivno inženirstvo PBL- naloge
31. 5. 2013	P1 13-17	Celična diagnostika in celične kulture PBL- sprotno preverjanje
5. 6. 2013	P2 11-15	Priprava na izpit
17.6.2013 ob 10h	P1	Izpit 1
1.7.2013 ob 10h	P1	Izpit 2
30.8.2013 ob 10h	P2	Izpit 3
13.9.2013 ob 10h	P2	Izpit 4

DNA, RNA struktura, podvajanje, transkripcija, translacija

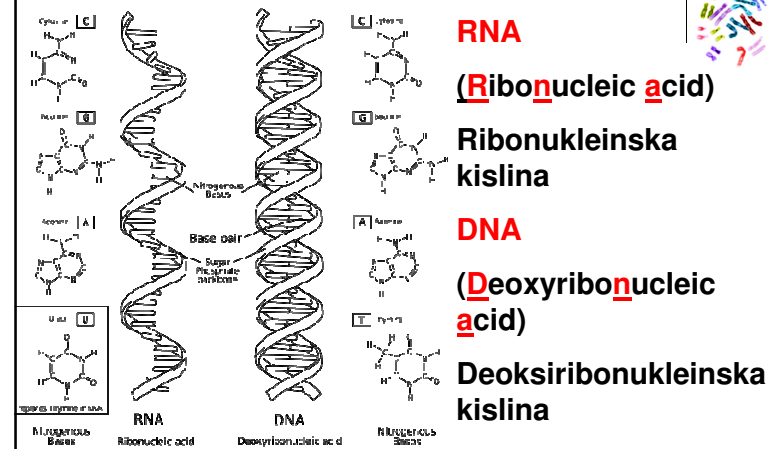
Celična biologija z genetiko
LBM
kozmetologija
šol. leto 2012/13
Prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan



Viri

- Celična Biologija, K.Jezernik, P- Veranič, M. Sterle, 2012 Ljubljana
- Cell biology and genetics, Joanne Evans, Ania L. Manson, Elsevier Health Sciences, 2008
- Terminologija:
<http://bio.ijs.si/SBD/terminologija.html>
- Kimbal biology: <http://biology-pages.info>

Nukleinske kisline



Nukleinske kisline



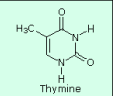



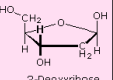
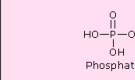

- Makromolekule, polimeri sestavljeni iz enostavnih ponavljajočih se enot - nukleotidov
- Molekule **DNA** "skladiščijo" genetske informacije, nahajajo se v jedru (kromosomi) ter v mitohondrijih (mitohondrijska DNA)
- Molekule **RNA** sodelujejo pri sintezi polipeptidov (proteinov), nahajajo se v jedru, jedrcu, citoplazmi, ribosomih

Osnovni gradniki nukleinskih kislin so nukleotidi



- Nukleotidi so sestavljeni iz sledečih komponent:
 - Sladkor (deoksiriboza/riboza)
 - Dušikova baza (purini A, G; pirimidini: C, T/U)
 - Fosfatna skupina

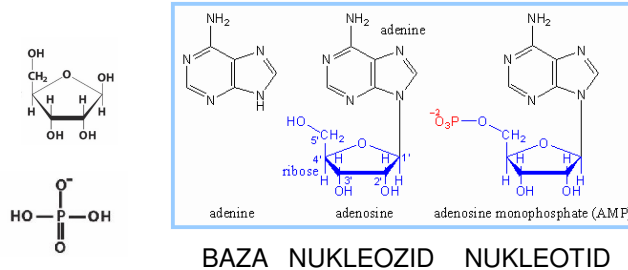
Components of Nucleic Acids

	DNA only	DNA & RNA		RNA only
Nitrogen Bases	 Thymine	 Adenine	 Guanine	 Cytosine
Sugars & Phosphate	 2-Deoxyribose	 Phosphate		 Ribose

Nukleozidi, nukleotidi

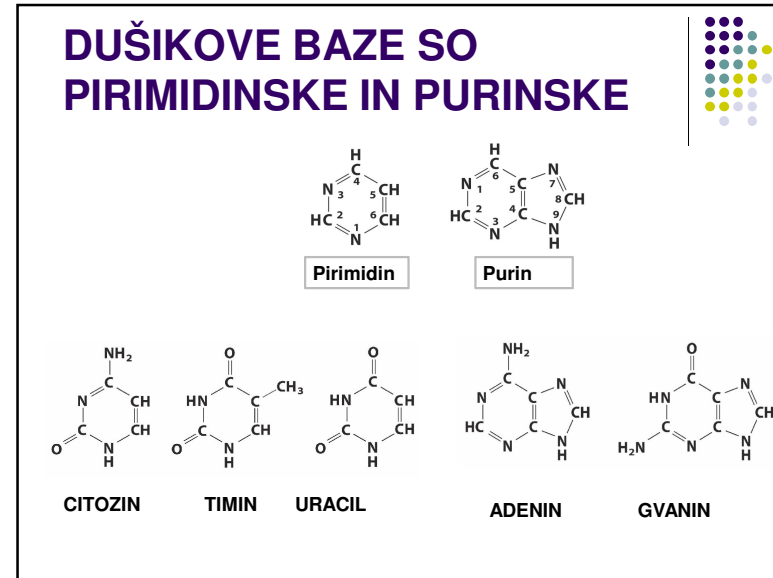
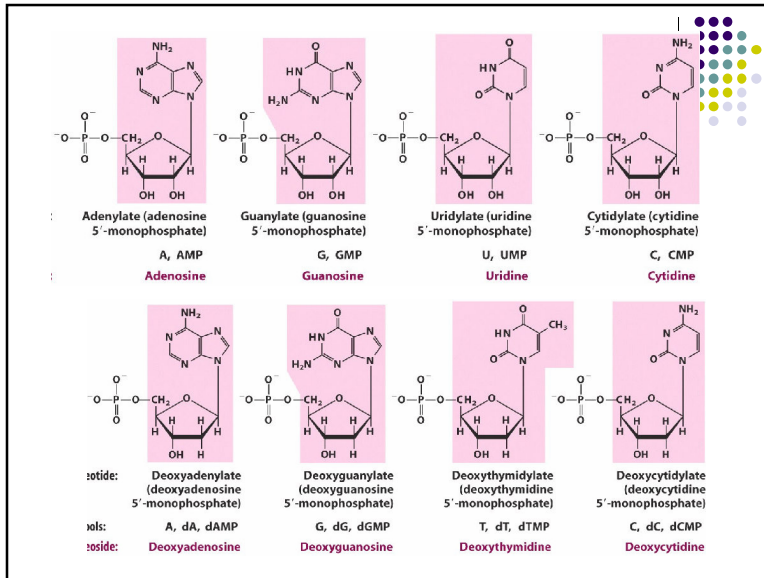


- Nukleozid: baza + sladkor
- Nukleo**T**id: baza + sladkor + fosfatna skupina
- NMP, NDP, NTP



- baza + riboza (deoksi-riboza) = nukleozid
- baza + riboza (deoksi-riboza) + fosfat (1-3) = nukleotid

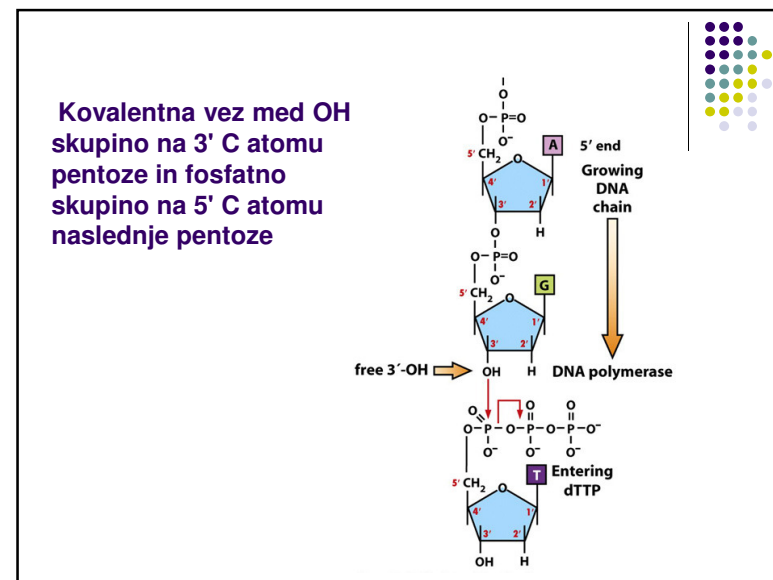
baza	nukleozid	nukleotid
<i>baza</i>	<i>baza + riboza</i>	<i>baza + riboza + fosfat(1-3)</i>
citozin	citidin	citidin-mono(di,tri)-fosfat
timin	timidin	timidin-mono(di,tri)-fosfat
uracil	uridin	uridin-mono(di,tri)-fosfat
adenin	adenozin	adenozin-mono(di,tri)-fosfat
gvanin	gvanozin	gvanozin mono(di,tri)-fosfat

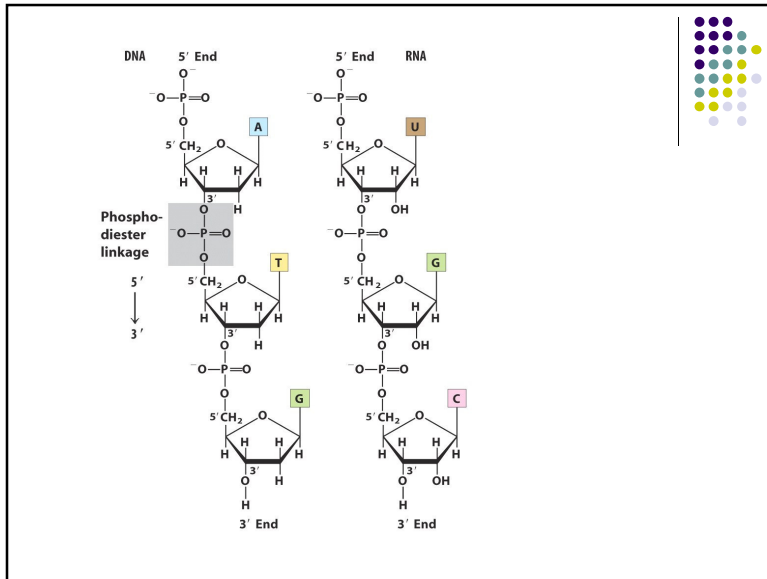


Polimerizacija nukleotidov – fosfodiesterska vez

- Močna kovalentna vez
- Med fosfatom na 5' mestu enega sladkorja in OH skupino na 3' mestu drugega sladkorja
- Sekvenco pišemo v smeri 5'→3'
- Negativni naboj (polianion)

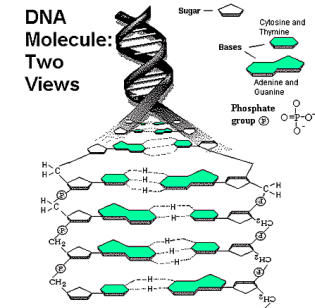
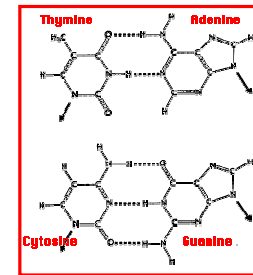
nucleic acid 5' end 3' end (etc)





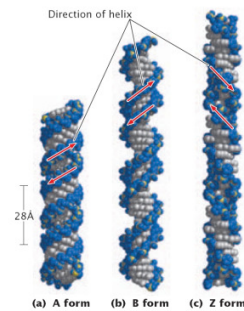
Tvorba dvojne vijačnice DNA – šibke nekovalentne vezi

- Vodikove vezi
med A in T (dvojna vez), med C in G (trojna vez)



Dvojna vijačnica

- Antiparalelna
- Desnosučna DNA (večina)
B oblika: 10 bp/ obrat
A oblika: bolj kompaktna
- Levosučna DNA
Z oblika



Dvojna vijačnica

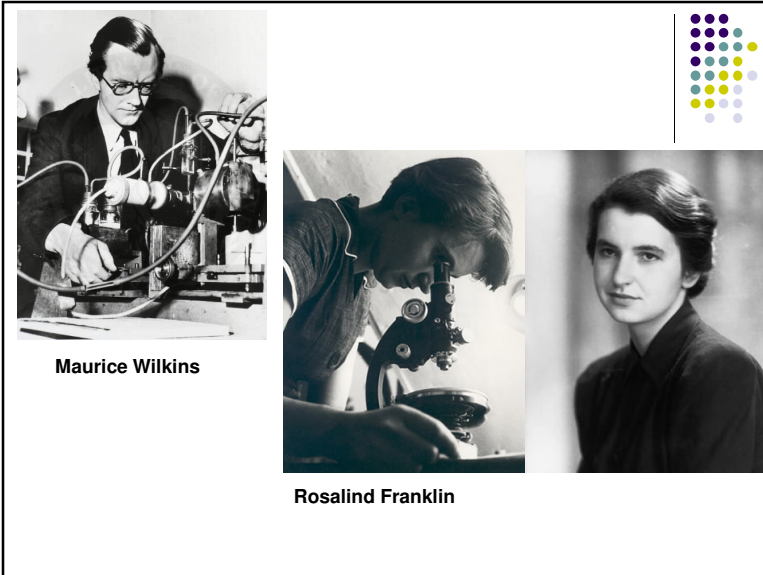
Leta 1953 sta Watson in Crick predstavila model dvojne vijačnice, čeprav sta

Rozalinda Franklin in Maurice Wilkins izvedla večino kristalografskih poskusov.

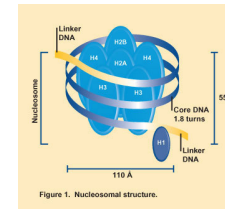
1962 Nobeleva nagrada
Watson, Crick in Wilkins



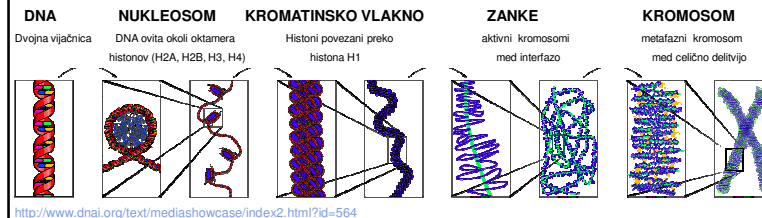
James Watson in Francis Crick z modelom dvojne vijačnice



Pakiranje DNA v kromosome

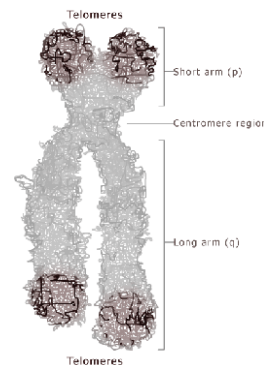


- DNA je zelo dolga molekula (dolžina celotne DNA v posamezni diploidni celici je med 2-3 m)
- “zapakirana” je v jedru, ki ima premer 5 mikronov



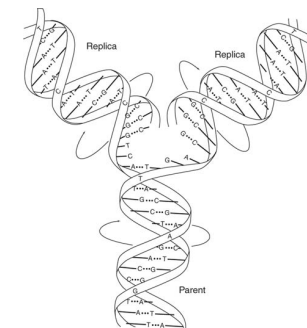
Centromere in telomere

- Centromere: regije, kjer se kromatidi združita.
- Telomere: regije na konicah kromosomov.
- Ročice kromosomov:
 - Kratka = p
 - Dolga = q



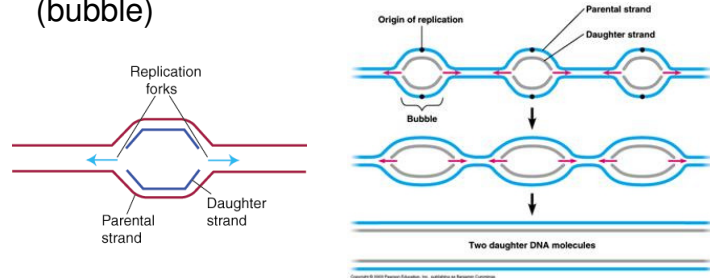
Podvojevanje DNA (I)

- DNA se podvoji pred vsako celično delitvijo
- Encim **helikaza** razpre dvojno vijačnico → vsaka veriga je matrica za sintezo nove, komplementarne verige (semikonzervativno podvojevanje)
- Encim **DNA polimeraza** sintetizira novo verigo iz nukleotidnih prekurzorjev (deoksিনukleozid trifosfati; dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

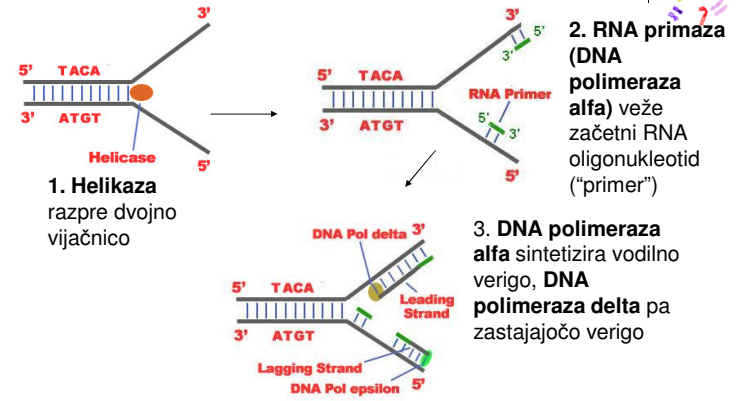


Podvojevanje DNA (II)

- Mesto začetka podvojevanja (origin of replication; ORI) → **replikacijske vilice** (replication fork) → **replikacijski mehurček** (bubble)



Podvojevanje DNA (III)

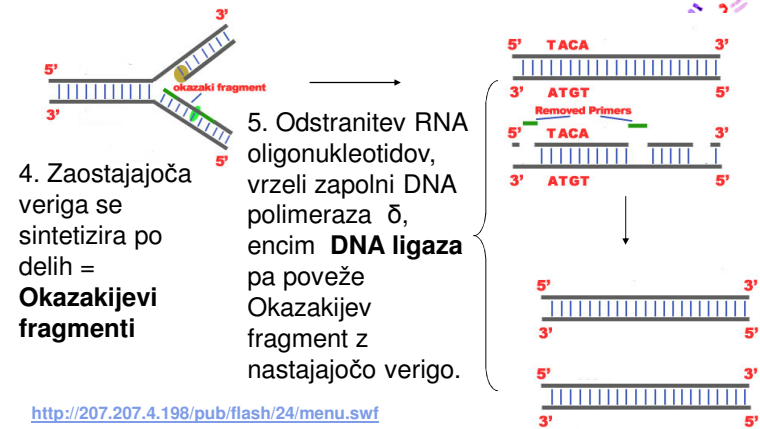


Podvojevanje DNA (IV)

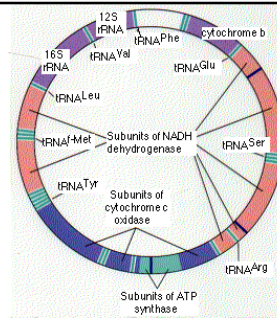
- Encim **DNA polimeraza** sintetizira novo verigo v smeri **5' → 3'** (vezava dNTP na prosto 3' OH)
- Ker sta matični verigi **antiparalelni**, se bo ena nova veriga sintetizirala kontinuirano (v smeri odpiranja replikacijskih vilic) = **vodilna veriga**
- Druga veriga se sintetizira po delih = **zastajajoča veriga**



Podvojevanje DNA (V)



Mitohondrijska DNA



- 16 500 bp
- kodira 13 funkcijskih proteinov, tRNA, rRNA
- mtDNA je cirkularna molekula, nima intronov
- dedovanje: po materi, mtDNA iz sperme ne vstopijo v oovum (?)
- študij evolucije človeka, mitohondrijska EVA 200.000 let

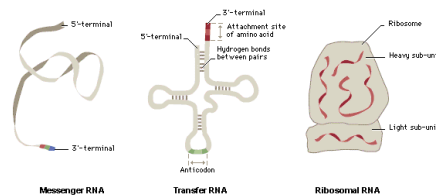
RNA



- **mRNA** (messenger) – informacijska RNA
- **tRNA** (transfer) – prenašalna RNA
- **rRNA** (ribosomal) – ribosomska RNA
- **miRNA** (micro RNA) - mikro RNA; **(s)iRNA** ((small) interfering RNA) - (mala) interferenčna RNA; **snRNA** (small nuclear RNA) - mala jedrna RNA; **snuRNA** (small nucleolar RNA) - mala nukleolarna RNA; **piRNA** (Piwi-interacting RNA); ...
- Nekateri virusi shranjujejo genetsko informacijo v obliki RNA (npr. virus HIV)

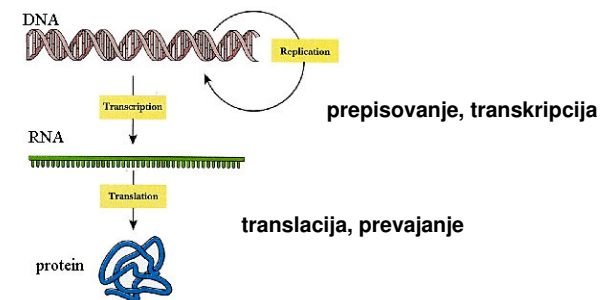
Vrste RNA

- **mRNA**: prenese informacijo o prevajanju v protein iz jedra (prepis iz DNA) do ribosoma, kjer poteka sinteza proteina
- **rRNA**: ključna sestavina ribosoma
- **tRNA**: prepozna kodon na mRNA in priskrbi ustrezno a.k. za sintezo proteina.

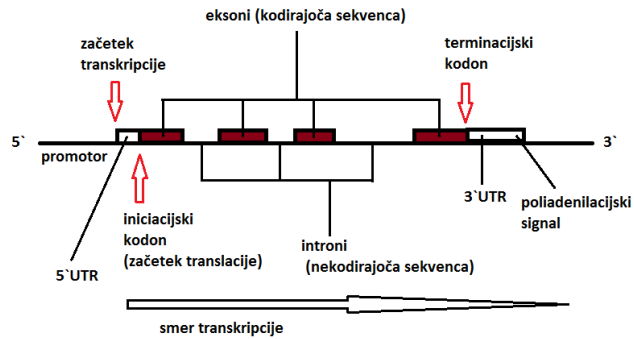


GEN

- Funkcionalna enota genoma, ki nosi informacijo
 - za sintezo mRNA in posledično proteinov (kodirajoča)
 - strukturnih, katalitičnih in regulatornih RNA (nekodirajoča)



Struktura gena



Naloga: struktura nukleinskih kislin

- Ali gre v sledečih primerih za DNA ali RNA zaporedje?

1. TGCCAATTG
2. GGGAAACCT
3. CUGGAGACC
4. GGTTCACAA
5. CUUGGGAUUAU
6. AGGGCAGGAC



Naloga: replikacija DNA

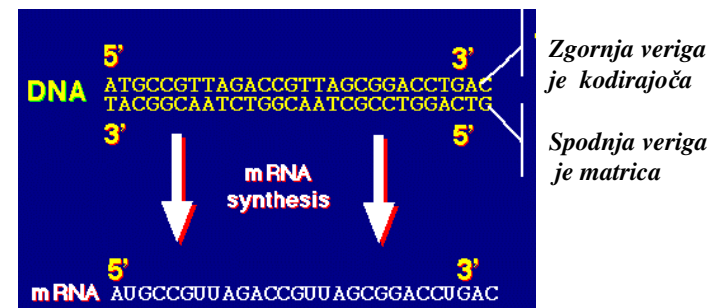
- Za sledeče verige DNA, napišite njihove komplementarne verige v smeri 5' → 3':

1. 5`-GGAGTTCCCA-3`
2. 5`-CCCAAAGTGTG-3`
3. 5`-TATAGAGACCG-3`

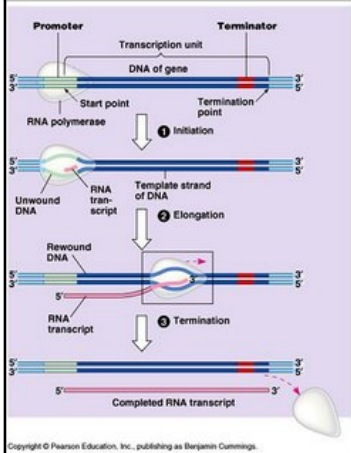


Transkripcija

Proces v katerem je sintetizirana RNA komplementarna matrični verigi in identična kodirajoči verigi, le da je T zamenjan z U. Poteka v smeri 5' → 3'. RNA polimeraza odvije dvojno vijačnico in sintetizira verigo.



Transkripcija



- Tri stopnje:
 - 1. ZAČETEK (iniciacija)**
 - 2. PODALJŠEVANJE (elongacija)**
 - 3. ZAKLJUČEK (terminacija)**
- Katalizira: **RNA polimeraza I., II., III.**
- Modulacija: **transkripcijski faktorji**



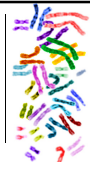
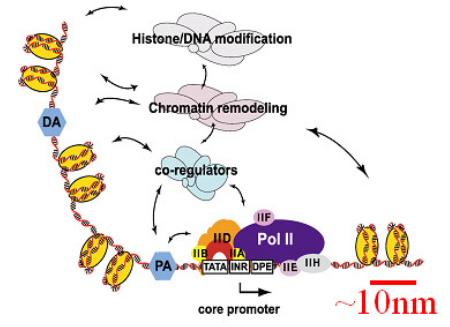
Iniciacija

RNA polimeraza II ne prepozna sama začetka transkripcije, ampak je vezana v kompleks s 6 transkripcijskimi faktorji (TFII): A, B, D, E, F, H

FTIID se veže na TATA box

TFII F ima helikazno aktivnost

TFII H fosforilira RNA polimerazo II



Vendar bazalni transkripcijski faktorji ne zadostujejo za normalen nivo transkripcije, ...

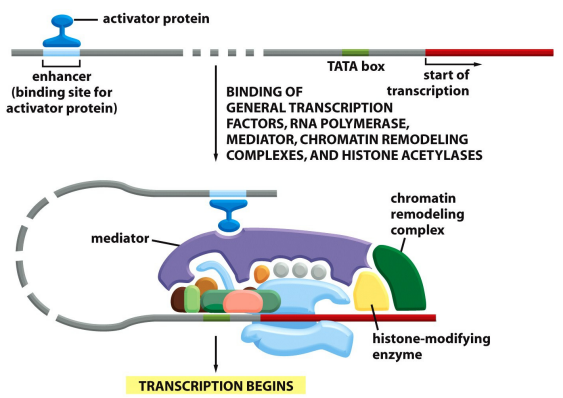
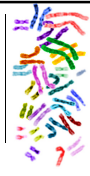


Figure 6-19 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)

Nadzor transkripcije

- **Transkripcijski faktorji/dejavniki = regulatorni proteini**, ki se vežejo na specifična zaporedja DNA in nadzorujejo (sami ali v kompleksu z drugimi proteini) izražanje genov (**aktivatorji** ali **repressorji**)
- **Regulatorni elementi = specifična zaporedja DNA** na katera se vežejo regulatorni proteini in nadzorujejo izražanje genov. Lahko se nahajajo znotraj promotorja gena ali pa so oddaljeni od gena.

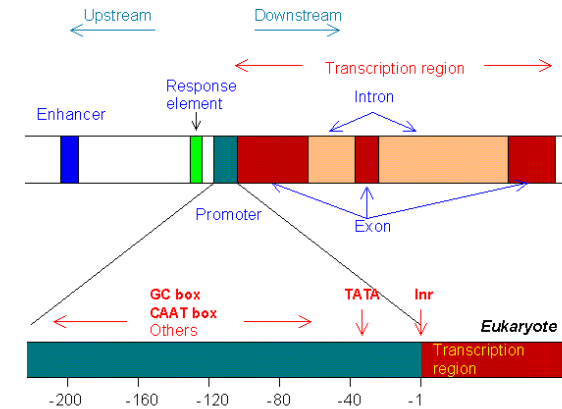


Regulatorni elementi

- **Promotor** (potreben je za iniciacijo bazalne transkripcije), lociran znotraj 200 bp pred mestom začetka transkripcije
- **Ojačevalec** (*enhancer*) ojača bazalni nivo transkripcije, lahko je zelo oddaljen od gena, katerega transkripcijo nadzoruje
- **Utiševalec** (*silencer*) zmanjša nivo transkripcije
- **Odzivni element** (*response element*) modulira transkripcijo kot odziv na specifične stimule, ki prihajajo v celico iz zunanosti (npr. steroidni hormoni, sekundarne obveščevalne molekule kot je cAMP)



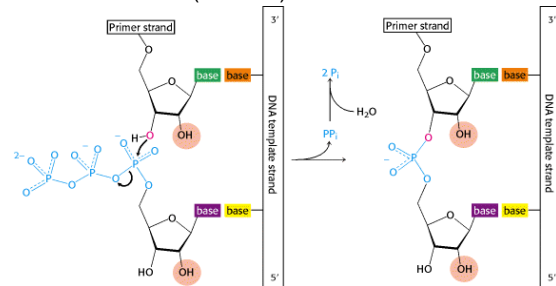
Regulatorni elementi



Elongacija

RNA polimeraza dodaja rNTP na prosti 3' konec predhodnjega nukleotida.

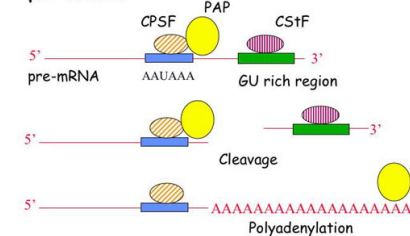
Glede na zaporedje matrične verige "izbere" ustrezen (komplementaren) rNTP in katalizira tvorbo fosfodiesterne vezi (5' → 3').



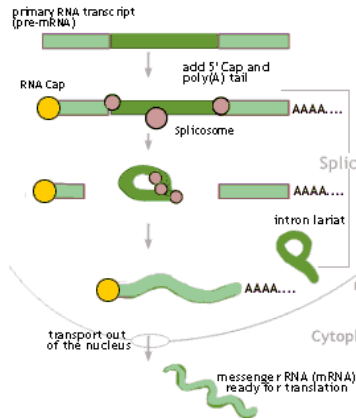
Terminacija

- Prepisovanje preko 3' mesta zrele mRNA
- Zaporedje AAUAAA zaporedje narekuje cepljenje nezrele mRNA
- Dodajanje poly A repa v bližini AAUAAA

Cleavage and Polyadenylation of Eukaryotic pre-mRNAs



Procesiranje mRNA

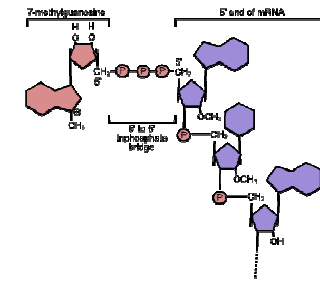


Tri glavne modifikacije:

1. "capping": dodajanje **RNA kape**
2. dodajanje **poli-A-repa**
3. "splicing": izrezovanje intronov in spajanje eksonov

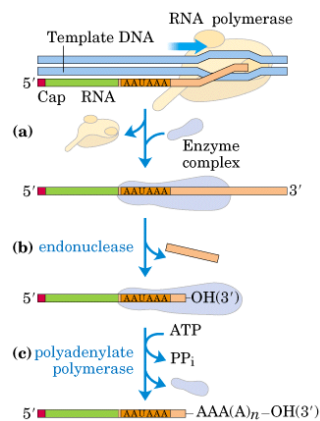
Dodajanje RNA kape/čepice

- Na 5' konec primarnega transkripta se veže metiliran nukleotid (7-metil gvanozin trifosfat).



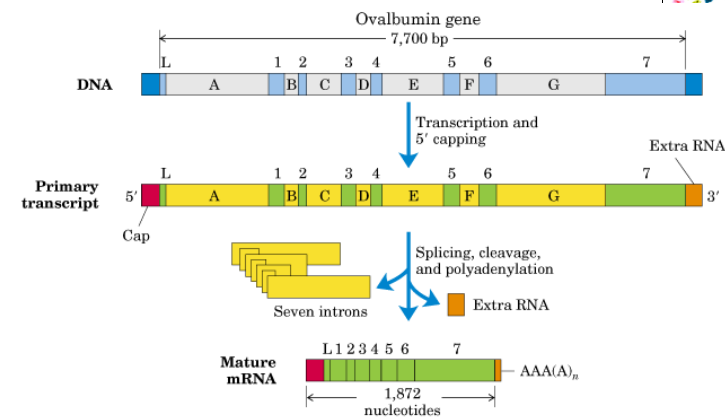
- RNA kapa ima sledeče funkcije:
 - Zaščita mRNA pred encimsko razgradnjo
 - Olajša transport mRNA iz jedra
 - Sodeluje pri splicingu
 - Pospešuje translacijo mRNA

Dodajanje poli-A-repa



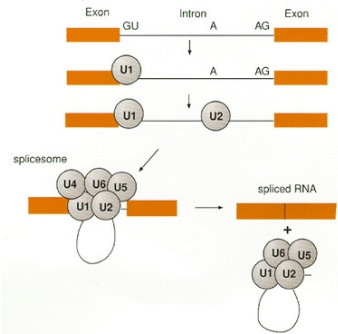
- Na 3' koncu mRNA
- Signal za poliadenilacijo je zaporedje **AAUAAA**
- 10-35 nukleotidov za tem zaporedjem pride do cepitve mRNA
- Poli-adenilat polimeraza doda ATP na 3' konec (cca 200 A pri sesalcih)
- Daljši kot je poli-A rep, bolj stabilna je mRNA.

"splicing" – izrezovanje intronov



Spliceosom

- Spliceosom je sestavljen iz:
 - Primarne mRNA
 - snRNP** (small nuclear ribonuclear particles) U1, U2, U5, U4/U6
 - Non-snRNP faktorjev
- Prva dva nukleotida v intronu sta vedno **GU** → vezava **U1** = **donorsko mesto**
- A**, ki se nahaja približno 30 mest od od 3' konca introna → vezava **U2** = **branch point**
- Zadnja dva nukleotida v intronu sta vedno **AG** → vezava **U5** = **akceptorsko mesto**



“splicing” – izrezovanje intronov

Nukleotid A (branch site) napade donorsko mesto in ga cepi. 5' konec introna se poveže z A nukleotidom (branch site). Nastane zanka podobna struktura. Prvi ekson se sprosti.

OH skupina na 3' koncu prvega eksona napade 5' konec drugega eksona in cepi intron na akceptorskem mestu.

Eksona se združita (zrela mRNA), intron pa se sprosti v obliki zanke.

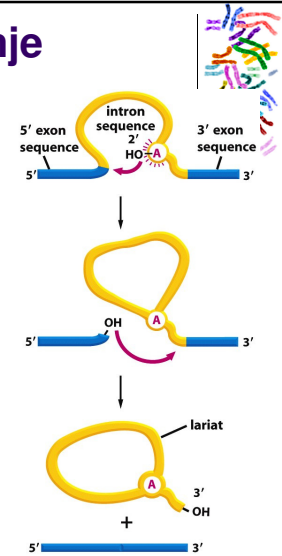
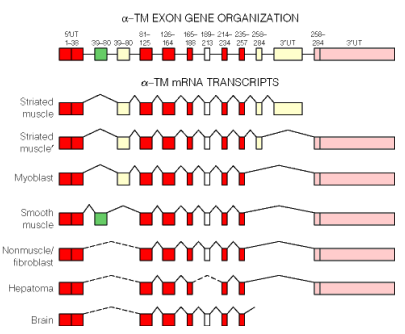


Figure 6-26a. Molecular Biology of the Cell © Garland Science 2008)

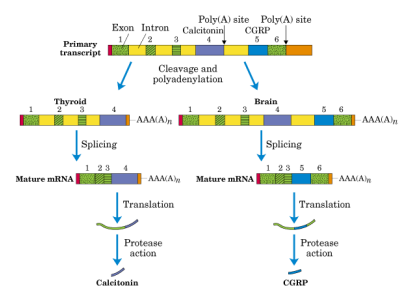
Alternativno izrezovanje intronov (alternative splicing) (I)

1 gen → več različic/različnih proteinov (zato le cca 25 000 genov v človeškem genomu)



Primer 1: tkivno specifično izražanje alfa-tropomiozina

Alternativno izrezovanje intronov (alternative splicing) (II)

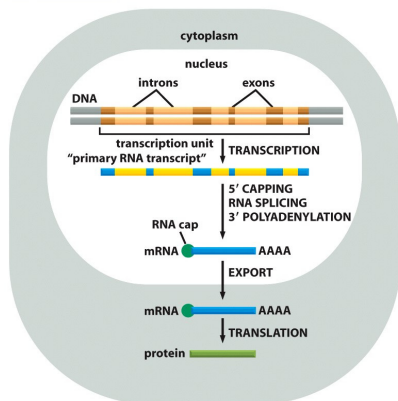


Primer 2: Transkript gena za kalcitonin pri podgani
Različno mesto poliadenilacije in alternativno izrezovanje intronov vodita v nastanek hormona kalcitonina ali CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) - odvisno od tkiva

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index

Razlike v transkripciji med pro- in evkarionti

(A) EUCARYOTES

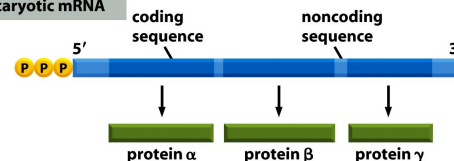


(B) PROCARYOTES

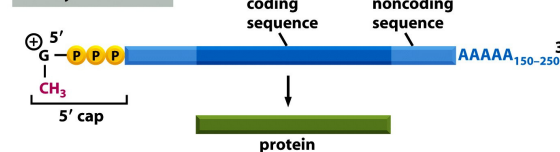


Figure 6-21 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)

prokaryotic mRNA

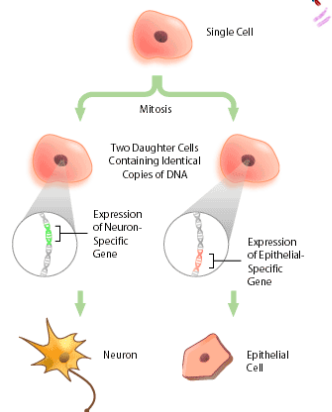


eucaryotic mRNA

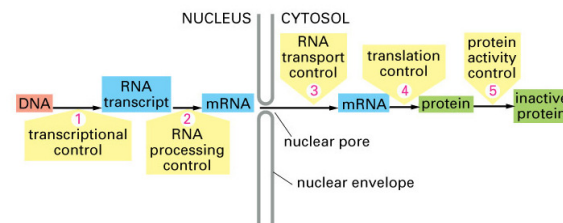


Izražanje genov (*gene expression*)

- **Izražanje genov** je kombinacija procesov transkripcije gena v mRNA, procesiranja mRNA ter translacije v protein
- Vsaka celica v organizmu ima enak genom – vendar se prepíše le majhen delček → prepisani nabor genov je odvisen od fiziološke funkcije posamezne celice/tkiva/organa

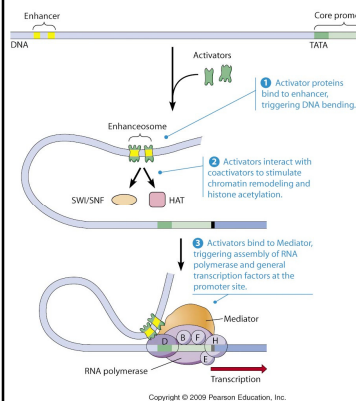


Nadzor nad izražanjem genov



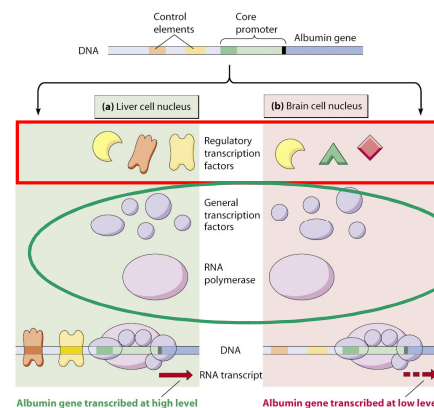
- Nadzor je možen na vseh stopnjah izražanja gena, najpogosteje pa se vrši na prvi stopnji – transkripciji.
- Epigenetski nadzor izražanja – nadzor, ki ni neposredno vezan na zaporedje DNA (npr. metilacija DNA = utišanje gena)

Primer: vezava aktivatorja na pospeševalno zaporedje



- **Osnovni promotor (core promoter)** omogoča bazalni nivo transkripcije
- **Pospeševalno zaporedje (enhancer)** ne more nadomestiti promotorja, v kombinaciji s promotorjem pa lahko bistveno poveča nivo transkripcije

Primer: regulacija izražanja albumina v različnih tkivih



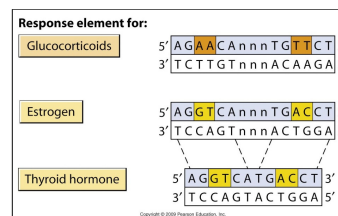
Različni transkripcijski faktorji v različnih tkivih (jetra/možgani)

Osnovni (bazalni) faktorji in RNA polimeraza so enaki v vseh tkivih

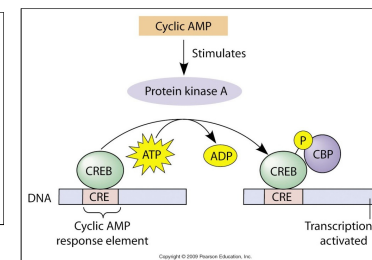
Odzivni elementi (response elements) (I)

- Sekvence, na katere se vežejo **določeni transkripcijski faktorji (TF)**:
 - **z ligandom inducirani** (ligand-inducible TF) (npr. kompleksi intracelularnih receptorjev za steroidne hormone)
 - **TF, ki jih aktivira transdukcija signala v celici** (signal, ki se iz površine celice prevede v notranjost)
- Običajno se nahajajo znotraj promotorske sekvence

Odzivni elementi (response elements) (II)



Odzivni elementi za steroidne hormone

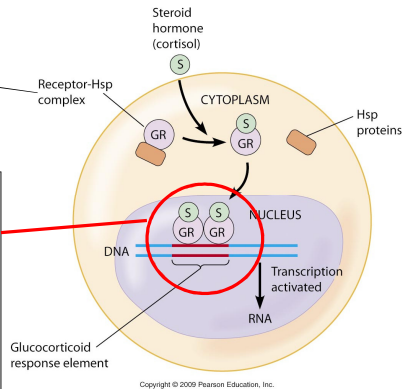


S cAMP aktivirana protein kinaza A fosforilira (aktivira) tarčne transkripcijske faktorje, kar sproži ekspresijo tarčnega gena

Primer: odzivni element za glukokortikoidne hormone

Intracelularni receptor, vezan z inhibitorjem Hsp

Vezava receptorja na odzivni element povzroči vezavo drugega glukokortikoidnega receptorja in tvorbo dimera, ki aktivira transkripcijo tarčnega gena



Motnje transkripcije: Gilbertov sindrom

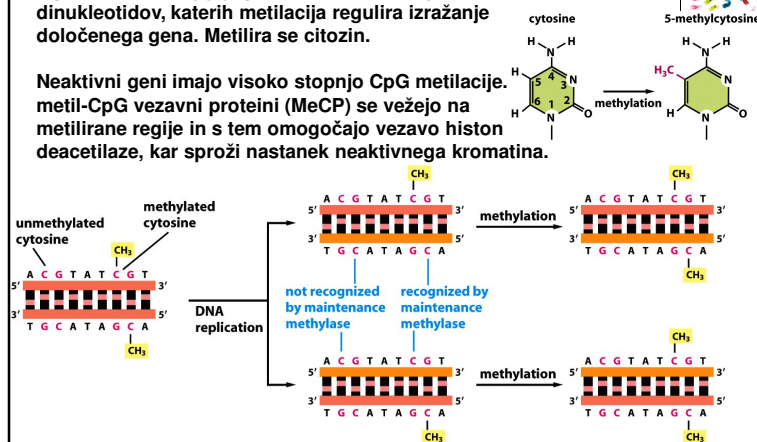
- Polimorfizem v promotski regiji gena za UDP-glukuroniltransferazo 1A1 (UGT1A1): ekspanzija TATA box: $(TA)_6TAA \rightarrow$ variantni alel $(TA)_7TAA$
- Zmanjšana ekspresija in aktivnost UGT1A1
- UGT1A1 katalizira glukuronacijo bilirubina
- Gilbertov sindrom: benigna hiperbilirubinemija (povečan nekonjugiran bilirubin) + pretiran toksičen odziv na standardne odmerke irinotekana in nekaterih drugih zdravil. Prisoten pri 10% kavkazijcev



Epigenetski nadzor – metilacija DNA

V promotski regiji je povečano število CpG dinukleotidov, katerih metilacija regulira izražanje določenega gena. Metilira se citozin.

Neaktivni geni imajo visoko stopnjo CpG metilacije. metil-CpG vezavni proteini (MeCP) se vežejo na metilirane regije in s tem omogočajo vezavo histon deacetilaze, kar sproži nastanek neaktivnega kromatina.



Motnje metilacije DNA

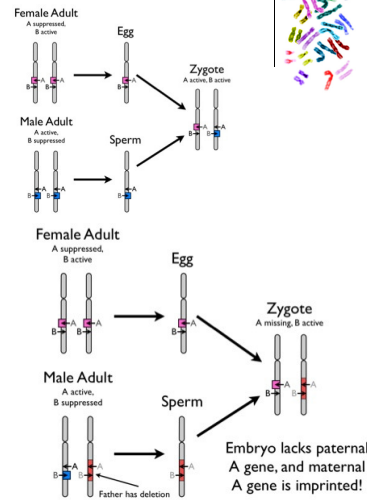
Več bolezni je povezanih z okvarjeno DNA metilacijo:

- Rak
- Rettov sindrom
- ICF sindrom,...



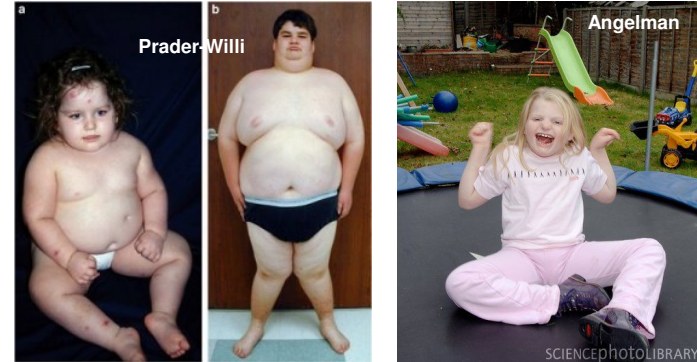
Epigenetski nadzor: imprinting

Pri večini genov poteka ekspresija obeh alelov (podedovanih od matere in očeta) simultano, pri < 1% genov pa je ekspresija odvisna od tega ali so podedovani od matere ali od očeta. Ponavadi gre za gene, ki so pomembni pri embrionalnem razvoju in razvoju v obdobju dojenčka.



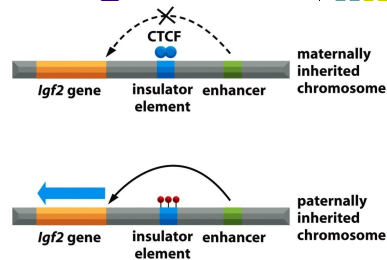
Prader-Willi & Angelman sindroma

Pri obeh sindromih se izbriše ista regija na kromosomu 15, le da pri Prader-Willi pride do izbrisanja očetovih, pri Angelman pa do materinih genov v prizadeti regiji. Sindroma sta si fenotipsko zelo različna.



Imprinting, primer: Igf2

- Igf 2, inzulinški rastni faktor 2
- Materin alel je neaktiven (nemetiliran, zato se veže CTCF, ki onemogoči delovanje enhancerja)
- Aktiven vedno očetov alel (metiliran, zato se CTCF ne more vezati)
- Metilacija elementa (regulatorna DNA sekvenca) onemogoči vezavo CTCF proteina na to sekvenco DNA
- Zato lahko enhancer aktivira gen za Igf2.



Beckwith-Wiedemann sindrom

Naloga: transkripcija

- Za sledeče matrične DNA verige napišite ustrezno mRNA v smeri 5' → 3':

- 5`-GCAGTTATA-3`
- 5`-CCCAAAGCT-3`
- 5`-TGTACAGGA-3`



Naloga: transkripcija

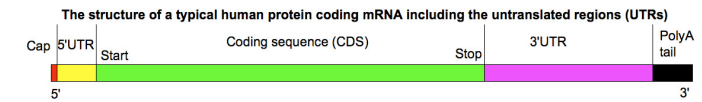
- Za DNA molekule s sledečimi kodirajočimi DNA verigami napišite ustrezno mRNA v smeri 5' → 3':

1. 5`-GCAGTTATA-3`
2. 5`-CCCAAAGCT-3`
3. 5`-TGTACAGGA-3`



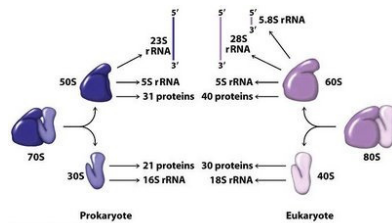
Translacija mRNA v protein

- Zrela mRNA gre iz jedra v citoplazmo
- Translacija poteka na ribosomih
- Običajno se prepíše le osrednji del evkariontske RNA (med start in stop kodonom)



Ribosomi

- Kompleksi RNA in proteinov (ribonukleoproteinski delci), kjer poteka sinteza proteinov
- Iz 2 podenot: 60S in 40S (prokarionti 50S in 30S) – med podenotama je “tunnelček” za mRNA

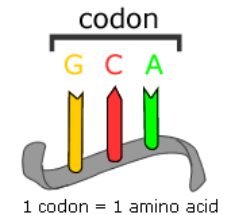


- 60S podenota vsebuje tri tipe rRNA: 28S, 5.8S in 5S rRNA ter cca 40 proteinov
- 40S podenota vsebuje le 18S rRNA in več kot 30 ribosomalnih proteinov

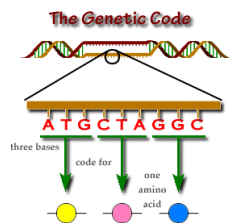
Figure 32-12 Principles of Biochemistry, 4e © 2004 Pearson Education, Inc.

Genetski kod

- Navodila za tvorbo aminokislinskega zaporedja določenega proteina so zapisana v obliki **genetskega koda**
- Ključ za dekodiranje so **kodoni (trije zaporedni nukleotidi)** na zreli molekuli mRNA
- Vsak kodon kodira za specifično aminokislino
- Dekodiranje je omogočeno z molekulami **tRNA**



“Ključ” za dekodiranje informacije na mRNA



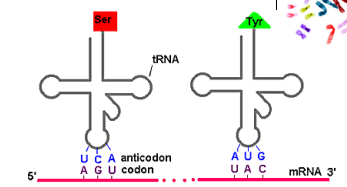
		2nd base in codon					
		U	C	A	G		
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G	3rd base in codon
	C	Leu Leu Leu	Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G	
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G	
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G	

Značilnosti genetskega koda

- **Enoznačen:** 1 triplet (kodon) kodira eno a.k.
- **Neprekrivajoč** (vsak zaporedni kodon se porabi za eno a.k.)
- **Neprekinjen** (vmes ni prekinitev – celoten zapis se prevede v protein)
- **Degeniraran:** več različnih kodonov lahko kodira isto a.k. (možnih je $4^3 = 64$ kodonov, vendar je le 20 različnih a.k.)
- **Univerzalen:** isti kod se uporablja pri vseh orgnizmih (*izjeme so mitohondriji in nekatere alge*)

tRNA – “dekoderji”

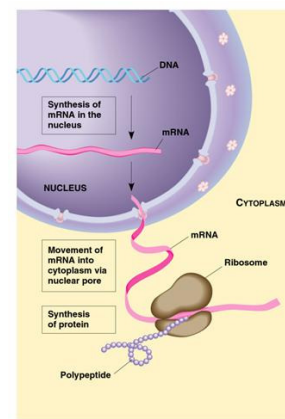
- Vsaka tRNA ima na antikodonski zanki specifično tri-nukleotidno sekvenco = **antikodon**
- Antikodon določa, katero a.k. bo imela posamezna tRNA vezano na 3' koncu



		2nd base in codon					
		U	C	A	G		
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G	3rd base in codon
	C	Leu Leu Leu	Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G	
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G	
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G	

The Genetic Code

Translacija (I)



Poteka v treh stopnjah.

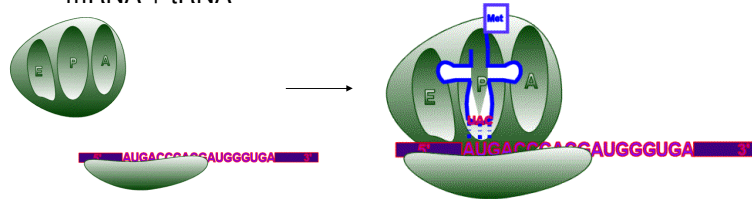
1. iniciacija
2. elongacija
3. terminacija

Sodelujejo:

1. mRNA (“koda”)
2. tRNA (“dekoder”)
3. ribosom (mesto dekodiranja)

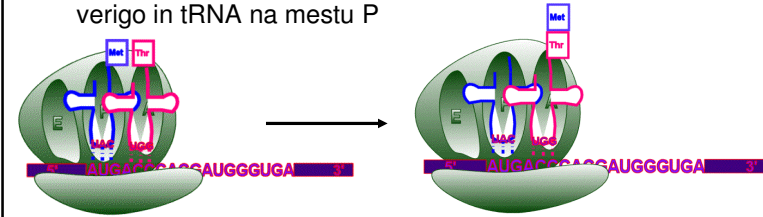
Translacija – iniciacija

- Ribosom ima tri aktivna mesta: P, A in E
- Manjša (40S) podenota ribosoma prepozna 5' konec mRNA, nato potuje vzdolž mRNA do **začetnega kodona** (skoraj vedno **AUG**) in veže ustrezno **začetno (iniciatorsko) tRNA**
- Nato se večja podenota veže na manjšo podenoto + mRNA + tRNA

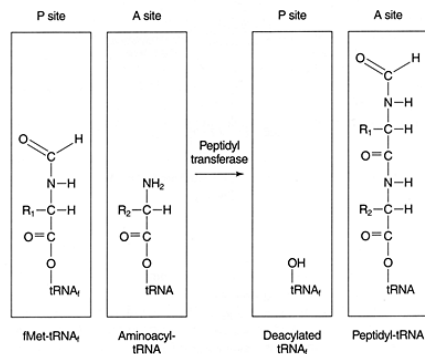


Translacija – elongacija (I)

- tRNA z ustreznim antikodonom se veže na mesto A v ribosomu
- mRNA na mestu A tvori vodikove vezi s tRNA
- rRNA komponenta ribosoma katalizira nastanek **peptidne vezi** med a.k. in cepi vez med polipeptidno verigo in tRNA na mestu P



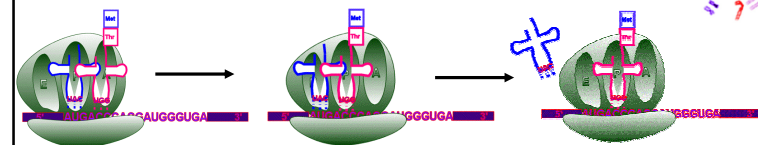
Elongacija – tvorba peptidne vezi



Mesto A:
"aminoacil"
Mesto P:
"peptidil"

- Encimska aktivnost rRNA komponente ribosoma deluje kot **peptidil transferaza**

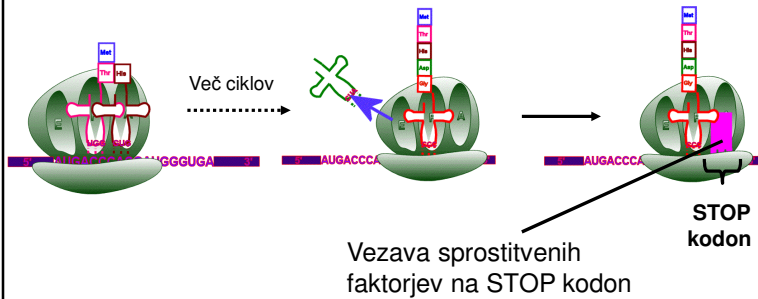
Translacija – elongacija (II)



- V naslednji stopnji pride do **translokacije**: ribosomalna podenota se premakne za en kodon proti 3' mestu (iz mesta A na mesto P)
- Začetna tRNA se pomakne na mesto E (izhodno mesto) in sprosti v citoplazmo

Translacija – elongacija (III)

- Postopek se ciklično ponavlja do **STOP kodona**



<http://bcs.whfreeman.com/thelifewire/content/chp12/1202003.html>

Translacija - terminacija

- Prisotnost **stop kodona** in **sprostivnih faktorjev** na mestu A pretvori peptidil-transferazo v **hidrolazo**, ki odcepi peptidno verigo s tRNA
- Polipeptidna veriga, tRNA in faktorji se sprostijo iz ribosoma; ribosom razpade na podenote

Translacija na spletu

- Vaja:
<http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/na/transcribe/>
- 3D animacija:
<http://www.youtube.com/watch?v=D3fOXt4MrOM&feature=related>

Naloga: translacija

- Sledeča zaporedja mRNA prevedite v proteinsko zaporedje:

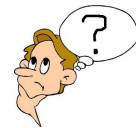
1. 5`-AUGGGACUCUUU-3`
2. 5`-CUACUGCUCUU-3`
3. 5`-UGUCGUGCAUGACUU-3`



Naloga: transkripcija in translacija

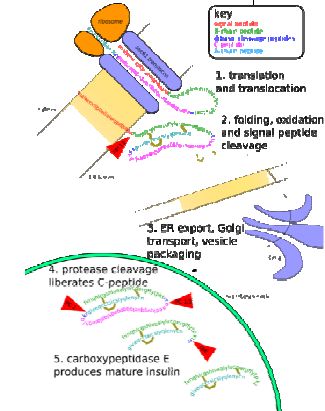
- Sledeče zaporedje kodirajče DNA verige prevedite v protein:

5`-ATGTCACACGTGTAATTTT-3`



Post-translacijske modifikacije proteinov

- Spremembe proteina po translaciji.
- Te modifikacije dajo proteinu funkcionalno aktivnost in vključujejo:
 - Glikozilacijo
 - Fosforilacijo
 - Sulfatacijo
 - Hidroksilacijo
 - Metilacijo
 - Dodajanje lipidnih skupin
 - Acetilacijo,...

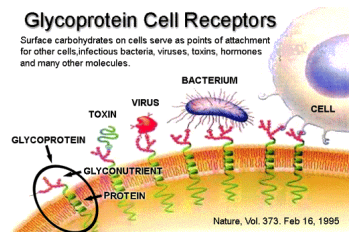


Glikozilacija

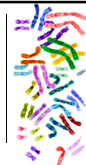
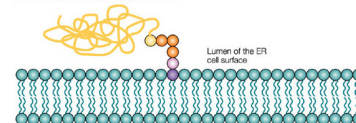
- Dodatek sladkorne skupine: **glikozilacija** → **glikoproteini**

Glycoprotein Cell Receptors

Surface carbohydrates on cells serve as points of attachment for other cells, infectious bacteria, viruses, toxins, hormones and many other molecules.

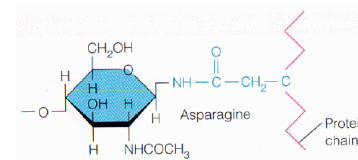


a GPI-anchored protein in the membrane

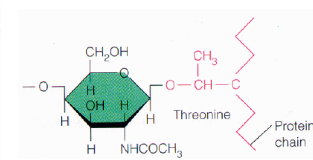


Glikozilacija

- Kovalentno vezani oligosaharidi
 - **N-glikozilacija** (na NH₂ skupini aspartata)
 - **O-glikozilacija** (na OH skupini serina in treonina)



N-acetil-glukozamin



N-acetil-galaktosamin



Motnje glikozilacije

- **Mukopolidoza tip II**
- Okvara manozna-6-fosfat glikoziltransferaze, ki glikozilira lizosomalne encime.
- Ker lizosomalni encimi ne delujejo, se različni produkti kopičijo v lizosomih in povzročajo okvare tkiv in organov.



Post-translacijske modifikacije

- **Lipoproteini:** Nekateri membranski proteini imajo dodane maščobne skupine s katerimi se "vsidrajo" v lipidni dvosloj plazemske membrane (t.i. membranska sidra). Primeri: miristoilna skupina (C14) se veže na N terminus glicina, palmitoilna skupina (C16) se veže na S atom cisteina, prenilne skupine se običajno vežejo na cisteinske preostanke v bližini C terminusa
- **Sulfatacija:** Tirozin, pomembno za transport in aktivnost proteinov
- **Hidroksilacija:** Lizin in Prolin, pomembno za pravilno strukturo kolagena
- **Acetilacija:** Lizin, sprememba naboja lizinskega ostanka v histonu H4, kar spremeni afiniteto do DNA.

Post-translacijske modifikacije

- Fosforilacija: Serin in Tirozin, vpliva na encimsko aktivnost.

