

MOLEKÜLER BİYOLOJİ II B208

Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Prokaryotlarda Translasyon: Polipeptit Sentezi

- mRNA molekülü 5'→3' yönünde translasyona uğramaktadır
- Amino asit'ler büyüekte olan polipeptit zincirine N-terminus'tan başlayacak şekilde eklenmekte ve C-terminus'a doğru ilerlemektedir
- Bütün durumlar da, polipeptit zincirindeki amino asit sekansı 5'→3' yönünde okunan mRNA kodonundaki düzene tekbül etmektedir
- 5'→3' yönünde translasyonu gerçekleştiren mRNA molekülünün N terminal → C terminal yönünde polipeptit sentezine nasıl sebep olduğunu anlamak için translasyon işlemini [iç başlık altında inceleyebiliriz](#)

TRANSLASYON

Prokaryotlarda Translasyon: Polipeptit Sentezi

mRNA ribozoma bağlanarak translasyon için uygun pozisyonu alır



mRNA kodonlarındaki yerleşim şekilleri ile belirlenmiş bir düzende amino asitler ardışık bir şekilde peptit bağları ile bağlanırlar



mRNA ve yeni oluşan polipeptit zinciri ribozomdan ayrılır

Polipeptit Zincir Sentezinin Başlaması (Initiation)

Translasyonun başlangıcı (*initiation*) için
Ribozomal alt üniteler, mRNA, initiator tRNA ve
başlangıç faktörleri gereklidir

Bakterilerde translasyonun başlaması için gerekli olan protein faktörleri

Factor	Fonksiyon
IF-1	tRNA ların A bölgesine zamansız (premature) bağlanmasına engel olur
IF-2	fMet-tRNA ^{fMet} in 30S ribozomal alt üniteye bağlanmasını kolaylaştırır
IF-3	30S alt üniteye bağlanarak 50S alt ünitenin zamansız bağlanarak ortaklık kurmasına engel olur ve P bölgesinin fMet-tRNA ^{fMet} için olan spesifitesini artırır

Prokaryotlarda Polipeptit Zincir Sentezinin Başlaması

Prokaryot ve ökaryotlardaki
translasyon başlangıcı arasındaki temel farklılık
bakterilerde translasyon başlangıç kompleksinin
başlangıç kodonu üzerinde
(yani protein sentezinin başlayacağı noktada) kurulmasıdır.
Ökaryotlar, başlangıç noktasının belirlenmesinde daha dolaylı
bir işlem uygularlar

Prokaryotlarda Polipeptit Zincir Sentezinin Başlaması (1)

Translasyonun prokaryotlarda başlangıç işlemi
üç başlık altında incelenebilir

- 1) IF1, IF2 ve IF3 başlangıç faktörleri küçük (30S) ribozomal alt üniteye bağlanır (IF2'ye bağlanan GTP molekülü ile)

Prokaryotlarda Polipeptit Zincir Sentezinin Başlaması (2)

- mRNA ve ilk amino asidi taşıyan tRNA (genelde her zaman methionine), **30S ribozomal alt üniteye bağlanır.**
- mRNA molekülü sahip olduğu **Shine-Dalgarno** sekansı aracılığı ile ribozomun 30S alt ünitesine bağlanır

Prokaryotlarda Polipeptit Zincir Sentezinin Başlaması (2)

- **Shine-Dalgarno (SD)** sekans veya **ribozom bağlanma bölgesi (RBS)** olarak ifade edilen sekans, prokaryotik mRNA üzerinde başlangıç kodonunun (AUG) biraz yukarısında yaklaşık 3-9 bazdan oluşmuş **purinlerce** zengin bölge

Shine-Dalgarno
sequence ↓

Prokaryotlarda Polipeptit Zincir Sentezinin Başlaması (2)

- mRNA molekülünün ribozomun küçük alt ünitesindeki mRNA bağlanma bölgesine bağlanması, *mRNA'nın AUG başlangıç kodonunu ribozomun P bölgesine yerleştirir* ve burada da uygun tRNA'nın antikodonuna bağlanır



Shine-Dalgarno (ribosome binding) sekansı:

- **Shine-Dalgarno (SD)** veya **ribozom bağlanma bölgesi (RBS)** olarak ifade edilen sekans, başlangıç kodonunun (AUG) biraz yukarısında yaklaşık 3-9 bazdan oluşmuş **purin** nükleotitleri içermektedir
- mRNA molekülünde bulunan bu purin'ler; ribozomun, ribozomun bağlanma bölgesini oluşturan 16S rRNA'nın 3' ucunda bulunan **pirimidin** bazlarınca zengin bölge ile tamamlayıcı baz eşleşmeleri yapar

Shine-Dalgarno (ribosome binding) sekansı:

- Prokaryotik mRNA'nın 5' UTR'sinde bulunan ve purin bazlarına (consensus = AGGAGG) zengin sekans
- Bu sekans mRNA molekülünün ribozoma bağlanması esnasında görev yapar

Prokaryotlarda Poliipeptit Zincir Sentezinin Başlaması (2)

Bazı prokaryotik ribozom-bağlanma bölgelerine ait sekanslar

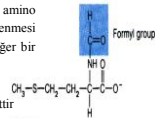
Prokaryotlarda Poliipeptit Zincir Sentezinin Başlaması (2)

AUG başlangıç kodonu methionyl-tRNA^{Met} tarafından tanınır

- Bakteriyal hücreler **methionine** amino asidine spesifik olan **iki farklı tip tRNA** molekülü içermektedir
 - Bunlardan bir tanesi, **tRNA^{Met}** olarak isimlendirilmiş olan, poliipeptit zincirinin arada kalan bölgelerine eklenecek şekilde yönlendirilmiş normal methionine amino asiti içermektedir
 - **tRNA^{Met}** olarak isimlendirilen diğeri, tRNA molekülüne bağlandıktan sonra **N-formylmethionine** (fMet) türüne dönüştürülen methionine amino asitini taşımaktadır

N-formylmethionine'de, methionine amino asitinin amino grubu formyl grubunun eklenmesi neticesinde bloke edilmiştir, dolayısıyla diğer bir amino asit ile peptid bağı oluşturamaz

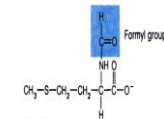
Bu amaç için sadece karboksil grubu müsaittir



Prokaryotlarda Poliipeptit Zincir Sentezinin Başlaması (2)

AUG başlangıç kodonu methionyl-tRNA^{Met} tarafından tanınır

- Bu sebepten dolayı, **N-formylmethionine** büyümekte olan poliipeptit zincirinin sadece N-terminal ucunda bulunur, bu da **tRNA^{Met}** molekülünün translasyon işlemini başlatan **initiator (başlatıcı) tRNA** olarak görev yaptığını önmektedir



- Poliipeptit zincirinin tamamlanmasını takiben (bazı durumda ise daha sentezlenirken), **formyl grup** ve bazen de **methionine** amino asitinin kendisi enzimatik olarak açığa çıkarılır

Prokaryotlarda Polipeptit Zincir Sentezinin Başlaması (2)

Initiation esnasında, *N-formylmethionine*'e bağlanmış olan **initiator tRNA**, GTP molekülüne bağlı IF2 initiation faktör'ün yardımı ile 30S ribozomal alt ünitenin P bölgesine bağlanır

Prokaryotlarda Polipeptit Zincir Sentezinin Başlaması (2)

- **GTP-IF2**, initiator tRNA^{Met} molekülünü diğer tRNA tiplerinden ayır eder
- **IF2** 'nin bu katkısı, AUG başlangıç kodonunun initiator tRNA^{Met} molekülüne bağlanırken, mRNA üzerinde bulunan diğer AUG kodonlarının neden tRNA^{Met} molekülüne bağlandığını açıklamaktadır

Prokaryotlarda Polipeptit Zincir Sentezinin Başlaması (3)

- 3) **70S initiation kompleks**; serbest 50S ribozomal alt ünitenin 30S initiation kompleks ile birleşmesi neticesinde oluşur
- 50S alt ünitenin bağlanması, IF2 ile beraber olan GTP'nin hidrolizi neticesinde gerçekleşir (IF2 ribozomdan ayrılırken)

Polipeptit Zincirinin Uzaması (Elongation)

Polipeptit zincirinin uzaması (**elongation**) için ardı ardına tekrarlanan 3 işlem döngüsü gereklidir

- 1) Aminoacyl tRNA molekülünün bağlanması,
- 2) Peptid bağının oluşumu
- 3) Translokasyon

***E. coli* protein sentezinde elongasyon işleminde gerekli olan çözünür protein faktörleri**

<i>Factor</i>	<i>Kütle (kD)</i>	<i>Fonksiyon</i>
<i>Elongasyon Faktörleri</i>		
EF-Tu	43	aminoacyl-tRNA ve GTP ye bağlanır
EF-Ts	74	EF-Tu üzerinden GDP yi alır
EF-G	77	GTP yi ribozoma bağlayarak translokasyonu sağlar

1) Aminoacyl tRNA molekülünün bağlanması

Bu yeni aminoacyl-tRNA molekülünün bağlanması *EF-Tu* ve *EF-Ts* olarak isimlendirilen 2 protein **elongasyon faktörünün** varlığına ihtiyaç duyar ve 2GTP molekülünün hidrolizi ile gerçekleşir

1) Aminoacyl tRNA molekülünün bağlanması

mRNA molekülündeki ikinci kodona tamamlayıcı antikodona sahip aminoacyl-tRNA molekülü ribozomun A bölgesine bağlandığında **ELONGASYON** başlar

1) Aminoacyl tRNA molekülünün bağlanması

- Aminoacyl-tRNA molekülünü ribozomun A bölgesine naklede
 - [EF-Tu-2GTP kompleksi initiator tRNA dışında, tüm aminoacyl-tRNA moleküllerinin ribozoma bağlanmasını sağlar](#)
 - Aminoacyl-tRNA ribozoma transfer edildiğinde, GTP molekülü hidrolize olur ve neticede EF-Tu-2GDP açığa çıkar
-
- *EF-Ts* faktörünün görevi ise elongasyon siklusunun bir sonraki siklusu için EF-Tu-2GDP molekülünden EF-Tu-2GTP oluşturmaktır

1) Aminoacyl tRNA molekülünün bağlanması

Eğer yeni gelen [aminoacyl tRNA molekülünün antikodonu](#) ribozomun A bölgesinde yer alan [mRNA'nın kodonuna tamamlayıcı değilse](#) aminoacyl-tRNA molekülü GTP'nin hidrolizinin gerçekleşmesine yetecek sürede ribozoma bağlı kalmaz



1) Aminoacyl tRNA molekülünün bağlanması

Kodon ve antikodon arasındaki [baz eşleşmeleri birbirine yakınsa](#) (tam tamamlayıcı değilse), geçici bir bağlanma meydana gelir ve GTP hidrolize olur



1) Aminoacyl tRNA molekülünün bağlanması

Aminoacyl tRNA antikodonu ile mRNA kodonu arasındaki [uyumsuzluk](#) ribozomun A bölgesinde [anormal bir yapının](#) oluşumunu sağlar

Bu yapı ribozom tarafından tespit edilerek bağlanmış aminoacyl-tRNA molekülünün atılmasını sağlar

[Translasyonda son hata oranı](#) [eklenen 10.000 amino asit'de sadece 1 yanlış amino asit'dir](#)



2) Peptit bağ oluşumu (Transpeptidasyon)

- Uygun aminoacyl-tRNA ribozomun A bölgesine bağlandıktan sonra, yapılması gereken A bölgesine bağlanmış [amino asidin amino grubu](#) ile P bölgesindeki tRNA molekülüne bağlı olan [amino asidin karboksil grubu](#) arasındaki [peptit bağının](#) oluşturulmasıdır
- Bu aktivite, büyük ribozomal alt ünite de yer alan [23S rRNA](#) molekülünün [peptidil transferaz](#) aktivitesi ile katalize edilmektedir
- Dolayısıyla, 23S rRNA bir [ribozim](#) örneğidir (tamamen RNA'dan yapılmış enzim)

3) Translokasyon

- **EF-G-GTP kompleksi** ribozoma bağlanıp GTP hidrolize olduktan sonra, büyümekte olan polipeptit zincirini taşıyan tRNA molekülü ribozomun A bölgesinden P bölgesine kayar

3) Translokasyon

Birbirini takip eden her bir amino asit eklendikçe, [mRNA molekülü 5'→3' yönünde](#) ileriye doğru okunur

Büyümekte olan polipeptit zincirinin amino terminal ucu ribozomun 50S ünitesinden dışarıya doğru çıkar ve zincir uzaması devam ederken [kendi üzerinde](#) [kattanmalar](#) yapar

Polipeptit sentezi çok hızlıdır...

Büyümekte olan bir *E. coli* hücresinde
400 amino asit uzunluğundaki bir polipeptit
10 saniyede !!!!! sentezlenir



Polipeptit Zincirinin Sonlanması (Terminasyon)

Polipeptit zincirinin sonlanması ([termination](#)) için stop kodonu tanyan serbest bırakma (release) faktörlerine ihtiyaç vardır

***E. coli* protein sentezinde terminasyon işleminde gerekli olan soluble protein faktörleri**

- Bunun yerine, stop kodon **release faktör** olarak isimlendirilen proteinler tarafından tanınır
- Release faktör ribozomun A bölgesine bağlandıktan sonra tamamlanmış polipeptidin peptidyl tRNA molekülünden ayrılmasını sağlayarak translyasyon işlemini sonlandırır

Factor	Kütle (kD)	Fonksiyon
<i>Release Factors</i>		
RF-1	36	UAA ve UAG Stop kodonlarını tanır
RF-2	38	UAA ve UGA Stop kodonlarını tanır
RF-3	46	GTP'ye bağlanarak RF-1 ve RF-2'nin bağlanmasını stimüle eder

Translyasyonun terminasyonu

Polipeptit su molekülüne transfer olur

Ve neticede polipeptidin en sonunda serbest karboksil grup oluşur

Polipeptit açığa çıkınca ribozomal kompleksin diğer bileşenleri de ayrılır ve yeni initiation kompleksin oluşumunda tekrar kullanılabilirler için artık serbest haldedirler

Translyasyonun terminasyonu

Elongasyon işlemi bir döngü şeklinde devam eder, bir kodondan sonra diğer kodon okunur ve amino asitler polipeptit zincirine eklenir..... ta ki mRNA molekülündeki olası üç stop kodondan (UAA, UAG ve UGA) biri ribozomun A bölgesine gelene kadar

Diğer kodonlar da gözlemlenen durumun aksine, stop kodonu tanıyan bir tRNA molekülü yoktur

Bunun yerine, stop kodon **release faktör** olarak isimlendirilen proteinler tarafından tanınır

Release faktör ribozomun A bölgesine bağlandıktan sonra tamamlanmış polipeptidin peptidyl tRNA molekülünden ayrılmasını sağlayarak translyasyon işlemini sonlandırır

Protein sentezi, hücrenin enerji bütçesinin önemli bir kısmını kullanır

Polipeptit zincirinin uzaması eklenen **her bir amino asit** başına en az 5 "yüksek-enerji" bağının hidrolizini gerekli kılmaktadır



- Bu bağlardan **iki tanesi** aminoacyl-tRNA synthetase reaksiyonu esnasında ATP'nin AMP'ye hidrolizi neticesinde sağlanır
- Geri kalan **üç tanesi** ise 3 molekül GTP tarafından sağlanmaktadır (Bunlardan iki tanesi yeni gelen aminoacyl-tRNA'nın A bölgesine bağlanmasında kullanılır, bir tanesi de translokasyon basamağında kullanılır)

Translasyon esnasında dikkat edilmesi gereken önemli bir husus,

GTP molekülü

tipik ATP benzeri enerji sağlayıcı olarak görev yapmaz:

yani;

hidrolizi kovalent bağların oluşumu ile direkt ilgili değildir.....

GTP; bunun yerine,

initiation ve elongation faktörlerde

konformasyonel değişikliğe sebep olur

(onlara bağlanıp ayrılarak)



Konformasyon veya şekildeki bu değişiklik faktörlerin ribozoma bağlanıp (kovalent bağlarla) ayrılmasını sağlar

Ayrıca,

Ef-Tu faktörüne bağlı GTP molekülünün hidrolizi

translasyon işleminin hassasiyetine ve doğruluğuna katkıda bulunur

(A bölgesine gelen yanlış aminoacyl-tRNA'nın atılmasını sağlayan proofreading mekanizmasında rol oynar)

