

蛋白质的生物合成

- 氨基酸活化
- 肽链的起始
- 肽链的延伸
- 肽链的终止
- 新合成多肽链的折叠和加工

蛋白质合成各阶段的主要成分简表

阶段	必需组分
1. 氨基酸的活化	20种氨基酸
	20种氨基酰-tRNA合成酶
	20种或更多的tRNA
	ATP, Mg ²⁺
2. 肽链的起始	mRNA
	N-甲酰甲硫氨酰-tRNA
	mRNA上的起始密码子 (AUG)
	核糖体小亚基
	核糖体大亚基
3. 肽链的延伸	GTP, Mg ²⁺
	起始因子 (IF-1, IF-2, IF-3)
	功能核糖体 (起始复合物)
	AA-tRNA
	伸长因子
	GTP, Mg ²⁺
4. 肽链的终止	肽基转移酶
	GTP
	mRNA上的终止密码子
5. 折叠和加工	释放因子 (RF-1, RF-2, RF-3)
	参与起始氨基酸的切除、修饰等加工过程的酶

1. 氨基酸的活化

氨基酸必须在氨酰—tRNA合成酶的作用下生成活化氨基酸——AA-tRNA

20种氨基酸

20种氨酰-tRNA合成酶

20种或更多的tRNA

ATP

Mg²⁺

*同一氨酰-**tRNA**合成酶具有把相同氨基酸加到两个或更多个带有不同反义密码子**tRNA**分子上的功能。

- 真核生物起始**tRNA**是**Met-tRNA^{Met}**,
- 原核生物起始**tRNA**是**fMet-tRNA^{fMet}**。

tRNA与相应氨基酸的结合是蛋白质合成中的关键步骤，可确保多肽合成的准确性。

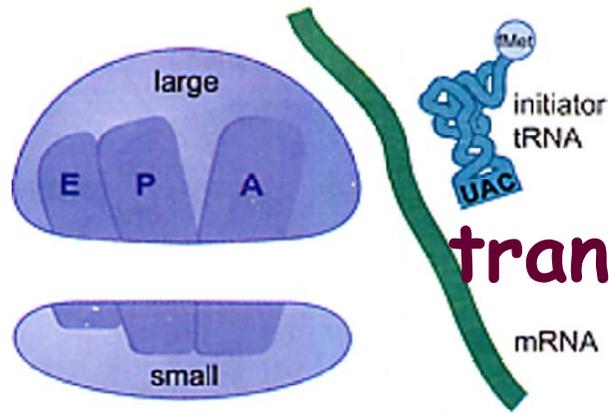
2. 翻译的起始

蛋白质合成的起始是指：

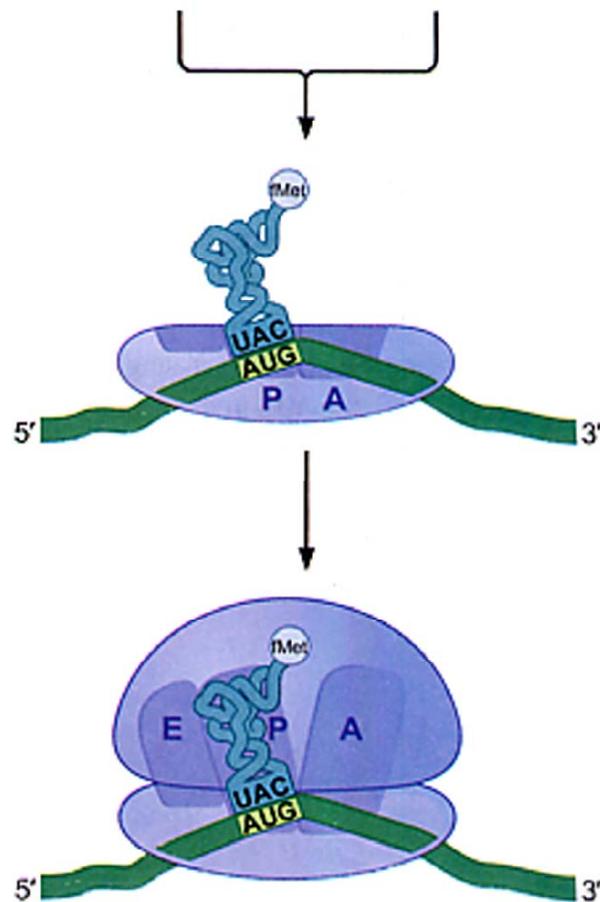
- 在模板 mRNA 编码区 5' 端形成核糖体-mRNA-起始 tRNA 复合物，
- 并将 (甲酰) 甲硫氨酸放入核糖体 P 位点。

翻译的起始需要

- **mRNA**
- **(甲酰)甲硫氨酰-tRNA**
- **mRNA上的起始密码子**
- **核糖体小亚基**
- **核糖体大亚基**
- **GTP, Mg²⁺**
- **起始因子**



Three events must occur for translation to be successfully initiated



- The ribosome must be recruited to the mRNA;
- A charged tRNA must be placed into the P site of the ribosome;
- The ribosome must be precisely positioned over the start codon (This is critical).

翻译的起始

原核生物:

- **30 S**小亚基首先与**mRNA**模板相结合,
- 再与**fMet-tRNA^{fMet}**结合,
- 最后与**50 S**大亚基结合生成
70S · mRNA · fMet-tRNA^{Met}起始复合物。

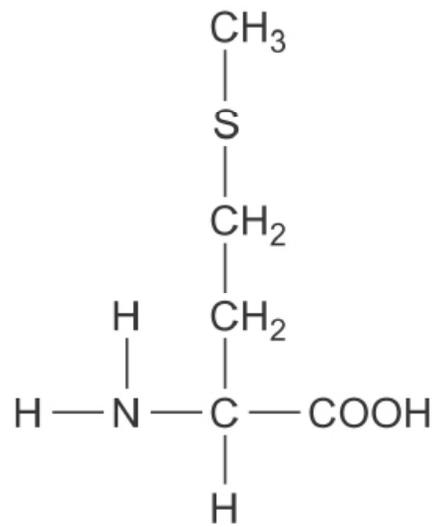
真核生物:

- **40 S**小亚基首先与**Met-tRNA^{Met}**相结合,
- 再与模板**mRNA**结合,
- 最后与**60S**大亚基结合生成
80S · mRNA · Met-tRNA^{Met}起始复合物。

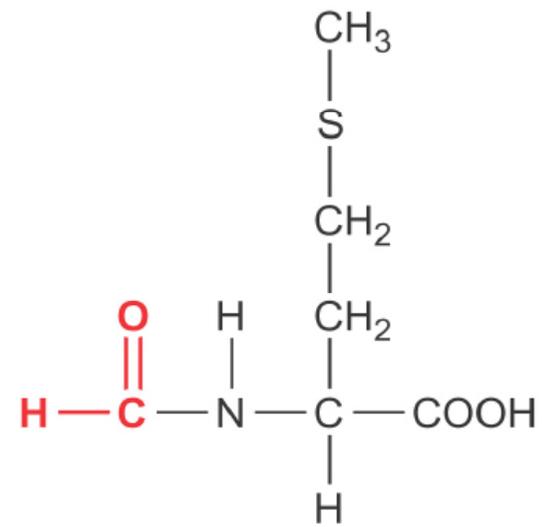
细菌的翻译的起始

- 30 S小亚基
- 模板mRNA
- **fMet-tRNA^{fmet}**
- 3个翻译起始因子, **IF-1, IF-2, IF-3**
- **GTP**
- 50 S大亚基
- **Mg²⁺**

A specialized tRNA (initiator tRNA) charged with a modified methionine (f-Met) binds directly to the prokaryotic small subunit



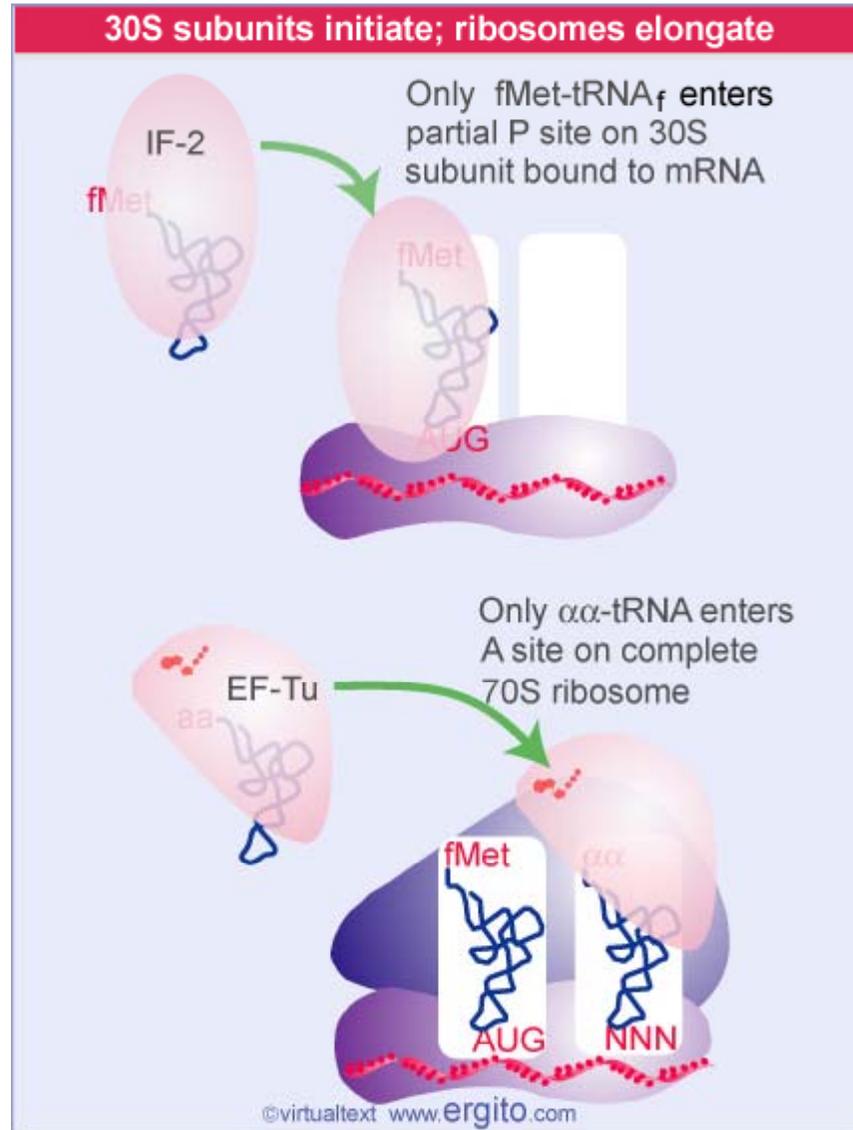
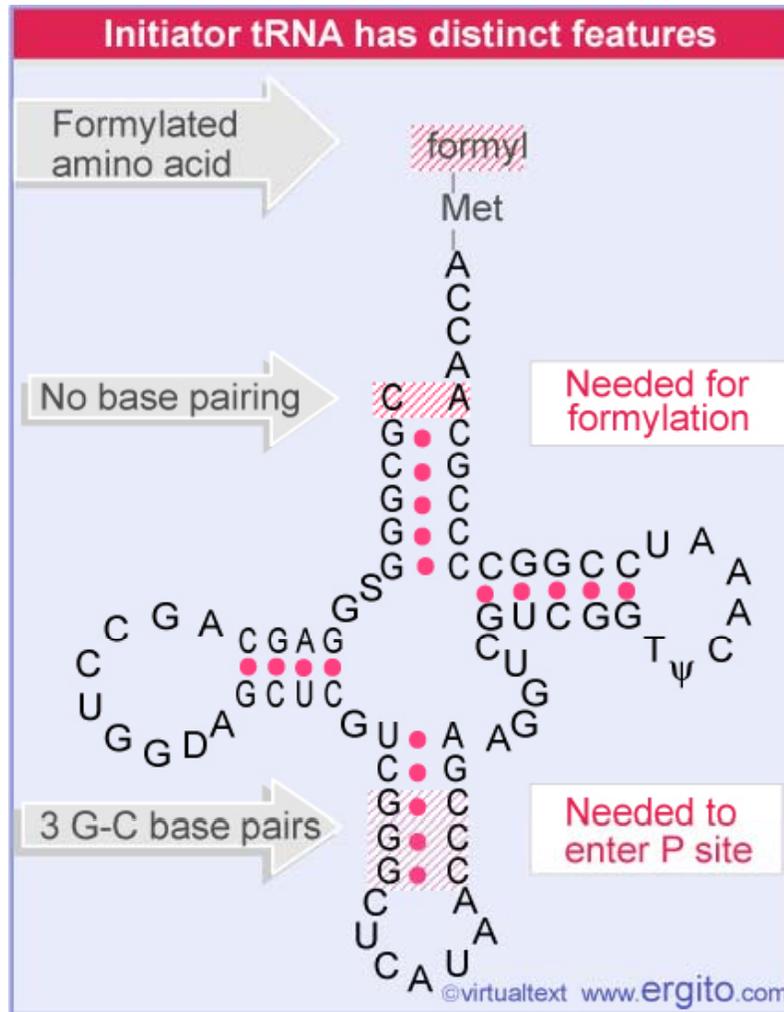
methionine



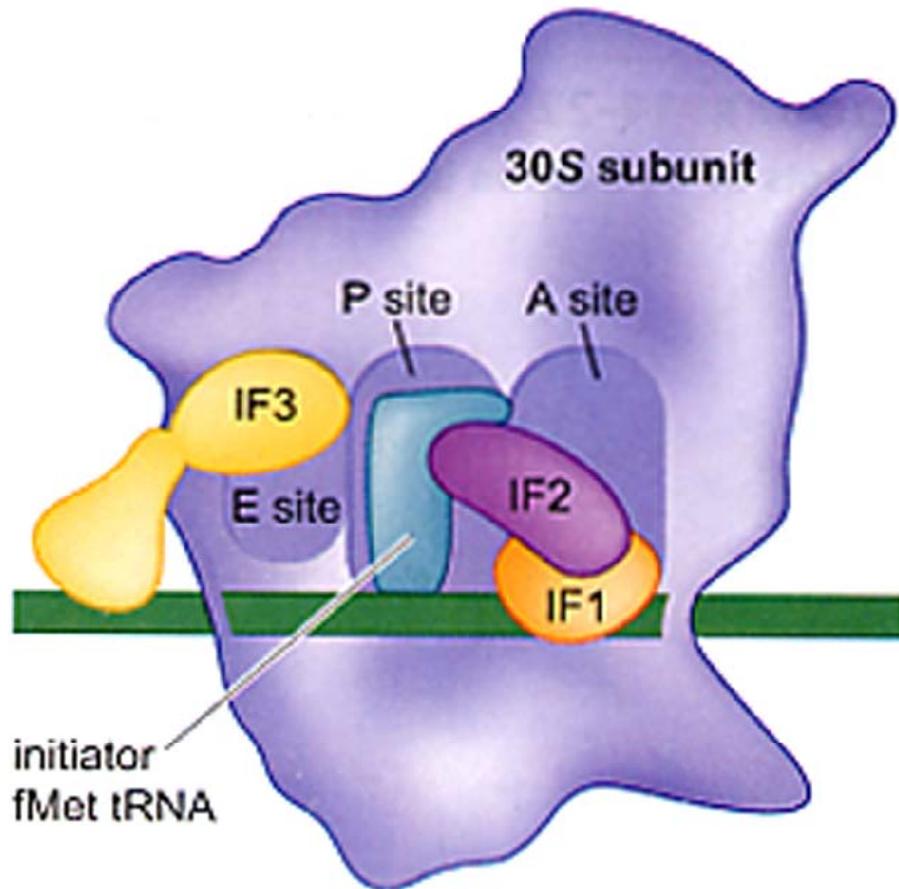
N-formyl methionine (fMet)

N-甲酰甲硫氨酸

A special initiator tRNA starts the polypeptide chain

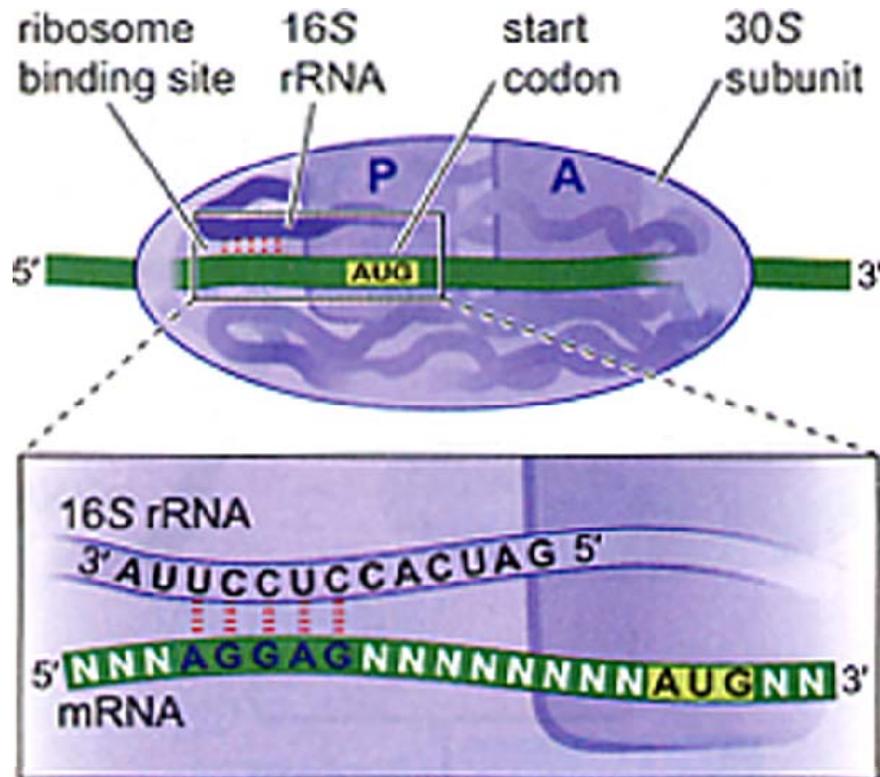


A model of initiation factor binding to the 30S ribosomal subunit



- **IF1** 防止tRNA结合到小亚基未来A位点的位置上。
- **IF2**是GTP酶,它与起始过程的3个主要成分相互作用,催化fMet-tRNA_i^{fMet}和小亚基的结合,并阻止其他负载tRNA与小亚基结合。
- **IF3**结合于小亚基并阻止其与大亚基结合,对新的循环至关重要。

The 16S rRNA interacts with the ribosome binding site to position the AUG in the P site



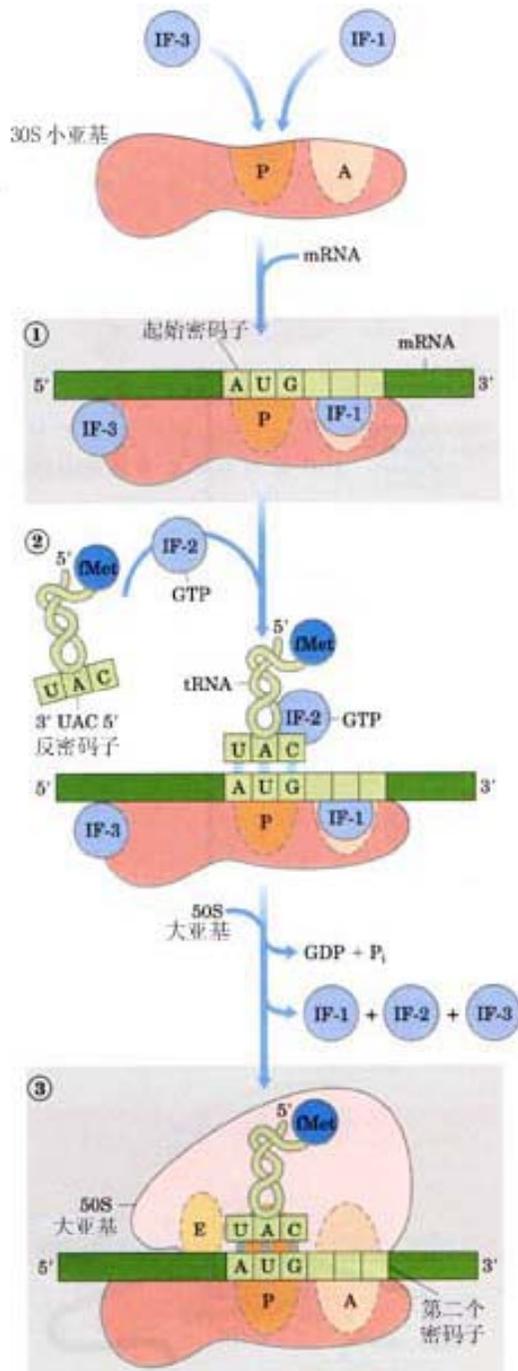
- 30S亚基具有专一性的识别和选择mRNA起始位点的性质，IF3协助该亚基完成这种选择。

- 几乎所有原核生物mRNA上都有一个5'-AGGAGGU-3'序列 (SD序列)，这个富嘌呤区与30S亚基上16S rRNA 3'末端的富嘧啶区5'-GAUCACCUCCUUA-3'相互补。

细菌翻译的起始

翻译起始复合物的形成:

1. **30S小亚基**与翻译起始因子**IF-1**, **IF-3**结合, 通过**SD序列**与**mRNA模板**相结合。
2. **fMet-tRNA^{fMet}**在**IF-2**的协同下进入小亚基的**P位**, **tRNA**上的反密码子与**mRNA**上的起始密码子配对。
3. 带有**tRNA**、**mRNA**、三个翻译起始因子的小亚基复合物与**50S大亚基**结合, 释放翻译起始因子。

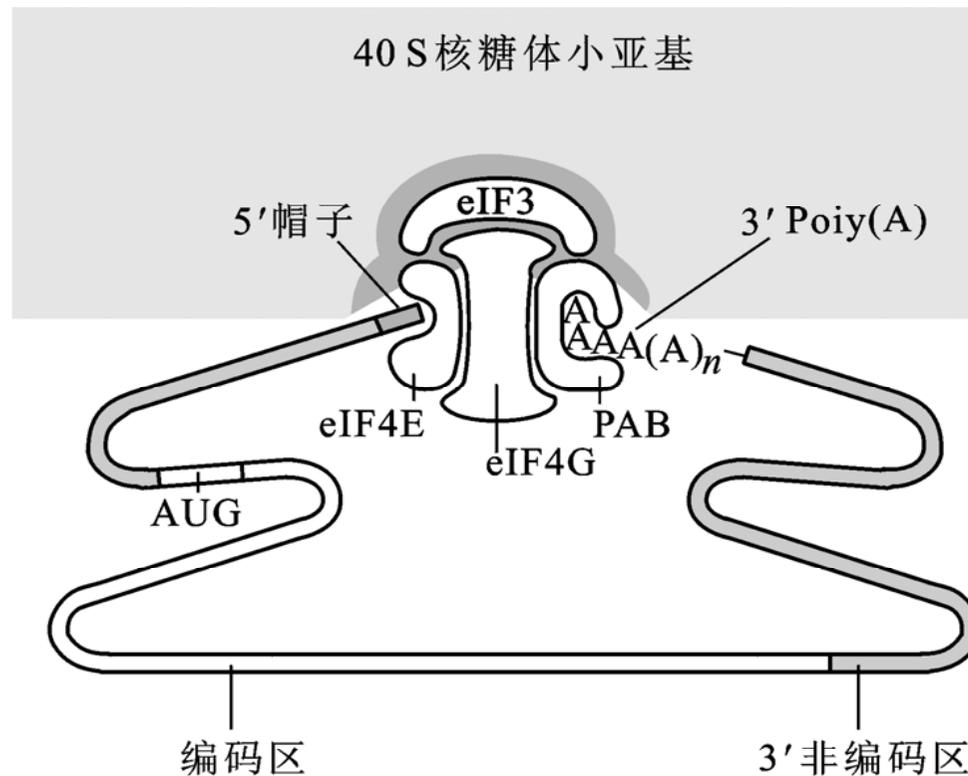


真核生物蛋白质生物合成的起始

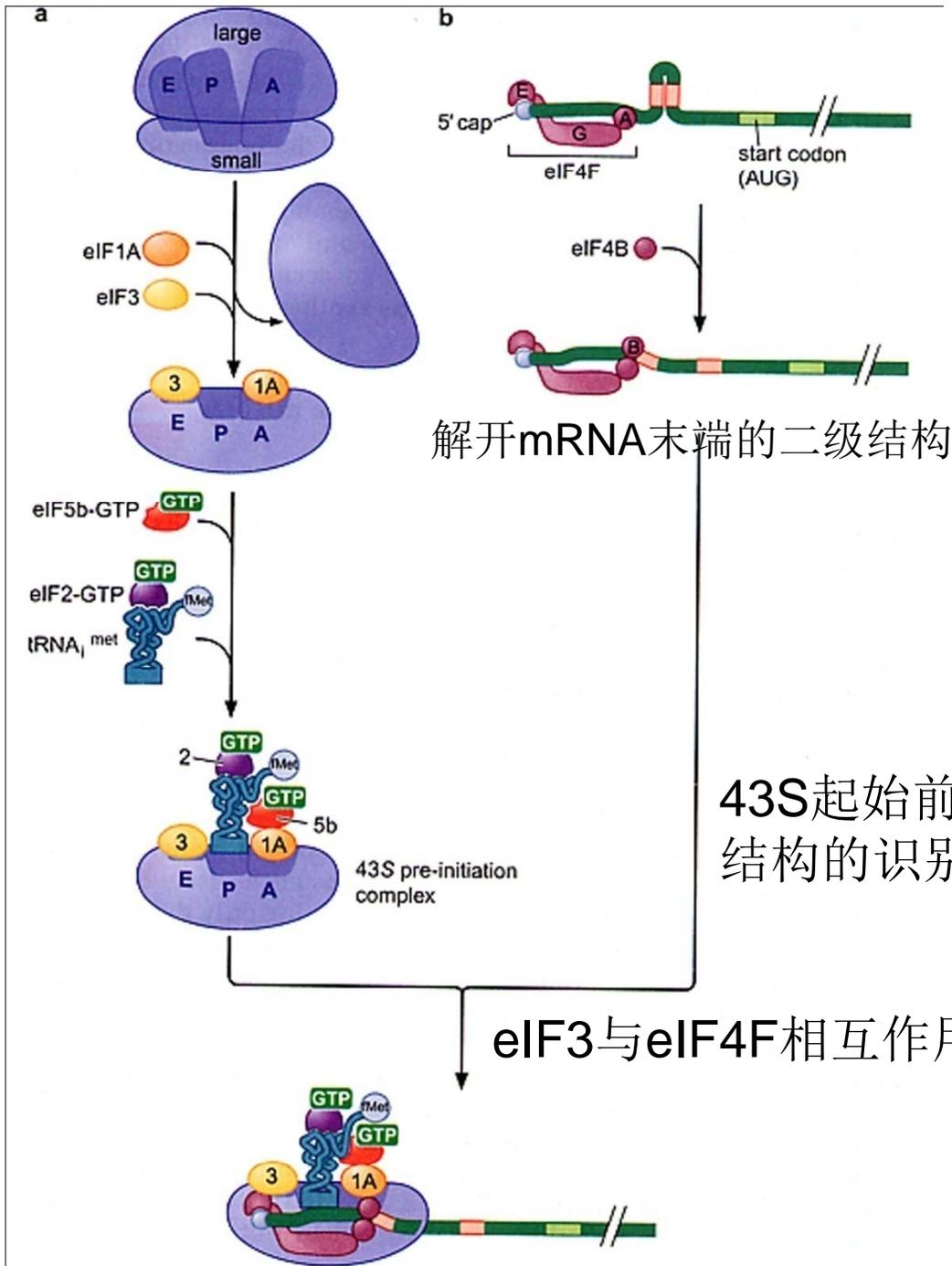
真核生物蛋白质生物合成的起始有其特点：

- 核糖体较大，
- 有较多的起始因子，
- mRNA具有m⁷GpppNp帽子结构，
- mRNA分子5'端的“帽子”和3'端的多聚A都参与形成翻译起始复合物，
- Met-tRNA^{Met}不甲酰化，
- 40S亚基对mRNA起始密码子的识别经过扫描(Scanning)。

The 5' end of eukaryotic mRNA is capped



- 真核mRNA通过帽子结构recruit核糖体(eIF-4E能专一地识别帽子结构), 起始反应.
- 帽子在mRNA与40 S小亚基结合过程中起稳定作用.
- 带帽子的mRNA 5'端与18 S rRNA的3'端序列之间存在不同于SD序列的碱基配对型相互作用.



真核细胞内蛋白质合成的起始需要起始因子及一个特殊的起始tRNA

43S起始前复合体对mRNA的识别是从对5'帽结构的识别开始的。该过程由eIF4F介导。

eIF3与eIF4F相互作用募集43S起始前复合体到mRNA上

mRNA has two features recognized by ribosomes



1 Small subunit binds to methylated cap



2 Small subunit migrates to binding site



3 If leader is long, subunits may form queue



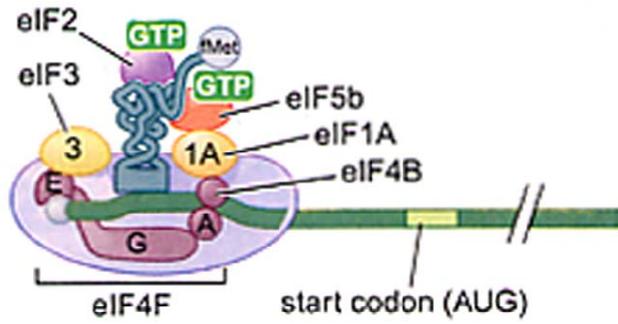
©virtualtext www.ergito.com

Kozak的“扫描模型”

真核生物核糖体从 mRNA 的 5' 端（帽子）向包括 AUG 起始密码子的核糖体结合位点滑动。依赖于 ATP。

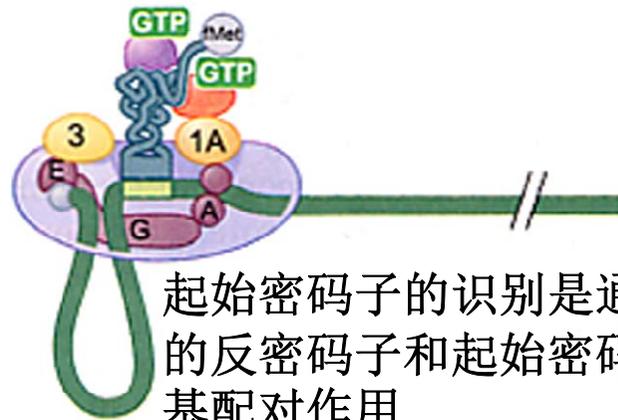
G(A)及 **AUG** 后面的 **G** 可十倍地影响翻译效率

真核细胞小亚基对起始AUG的识别

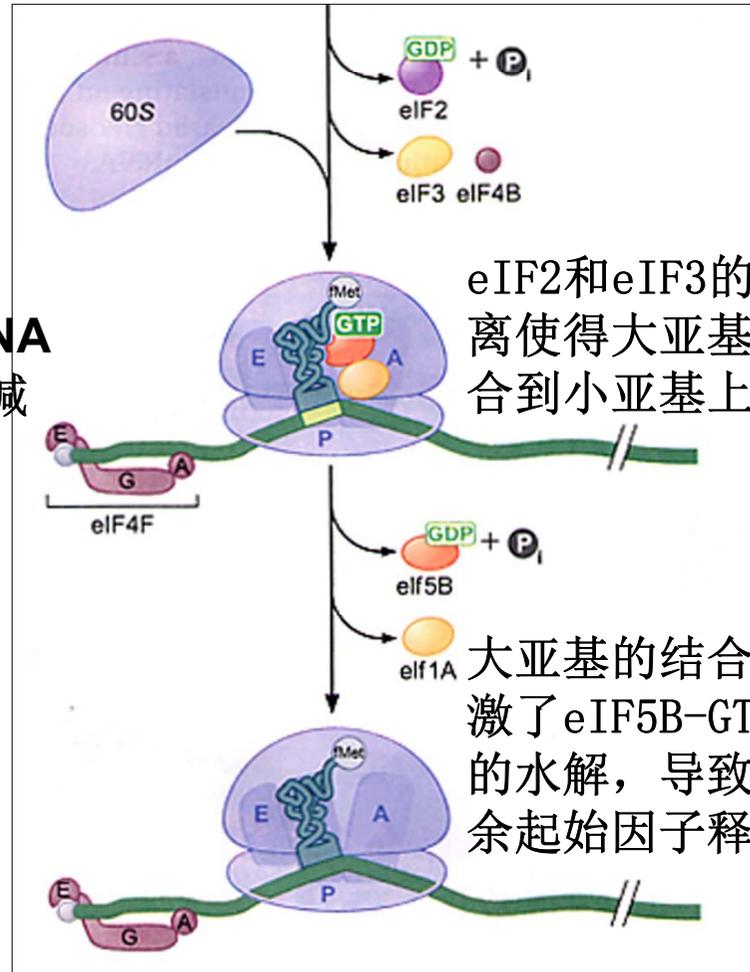


由eIF4F的RNA解旋酶所驱动

scanning $\text{ADP} + \text{P}_i$



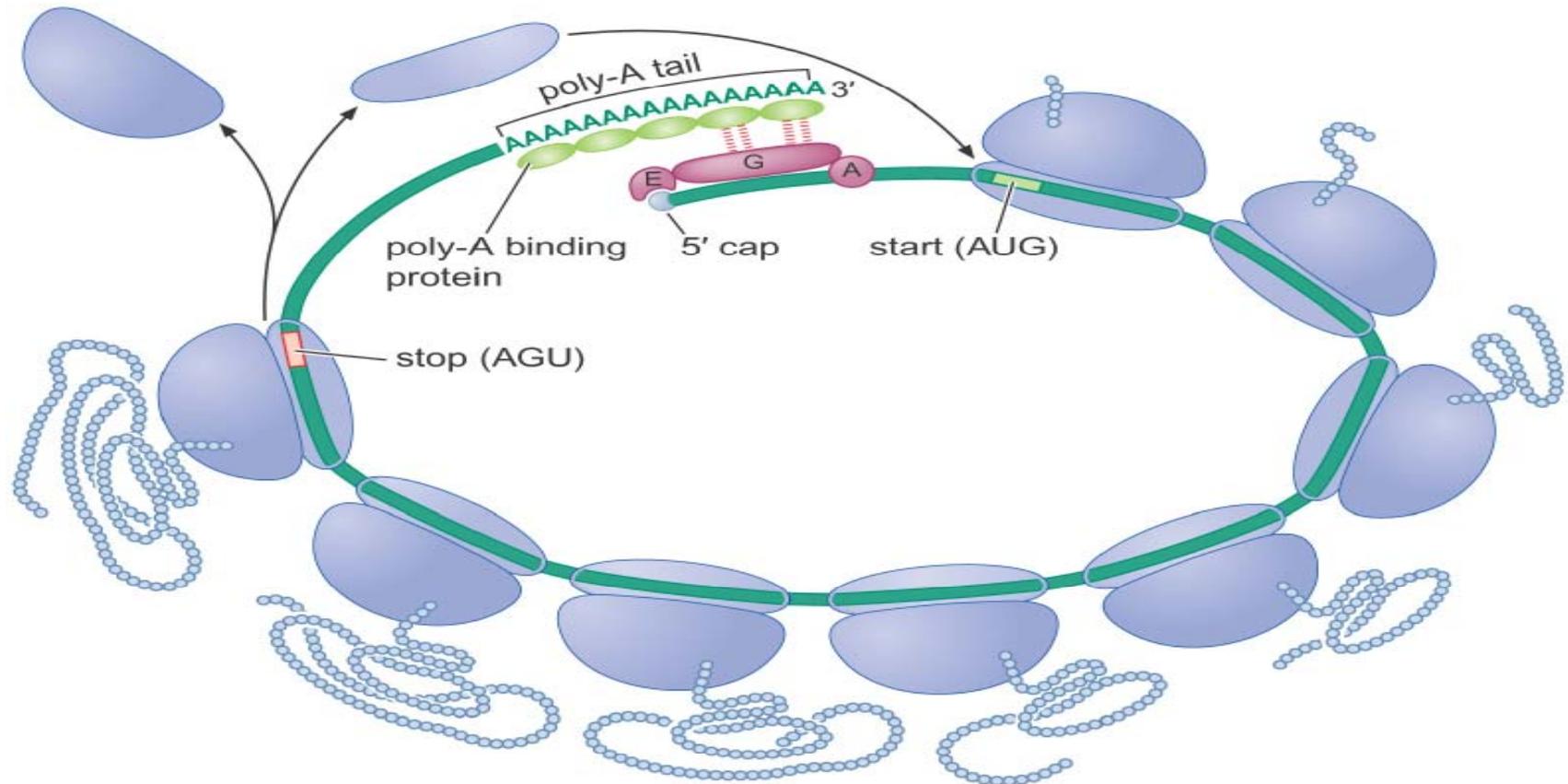
起始密码子的识别是通过起始tRNA的反密码子和起始密码子之间的碱基配对作用



eIF2和eIF3的脱离使得大亚基结合到小亚基上

大亚基的结合刺激了eIF5B-GTP的水解，导致剩余起始因子释放

Translation initiation factors hold eukaryotic mRNAs in circles



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

一旦核糖体完成了通过**poly-A**尾而环化的**mRNA**的翻译，新释放的核糖体被理想地置于同一**mRNA**的起始翻译位点上，提高**mRNA**的翻译效率。

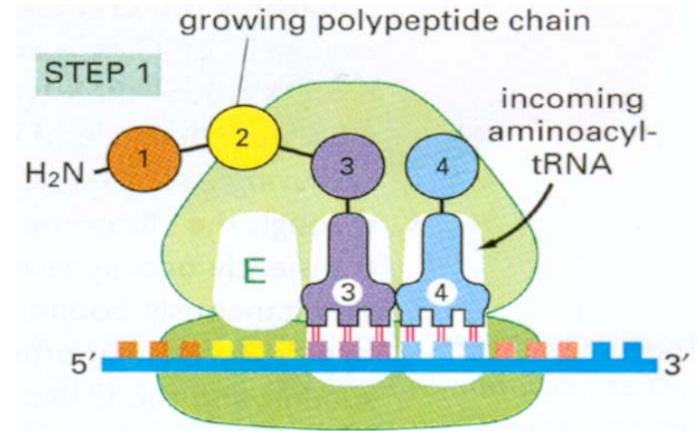
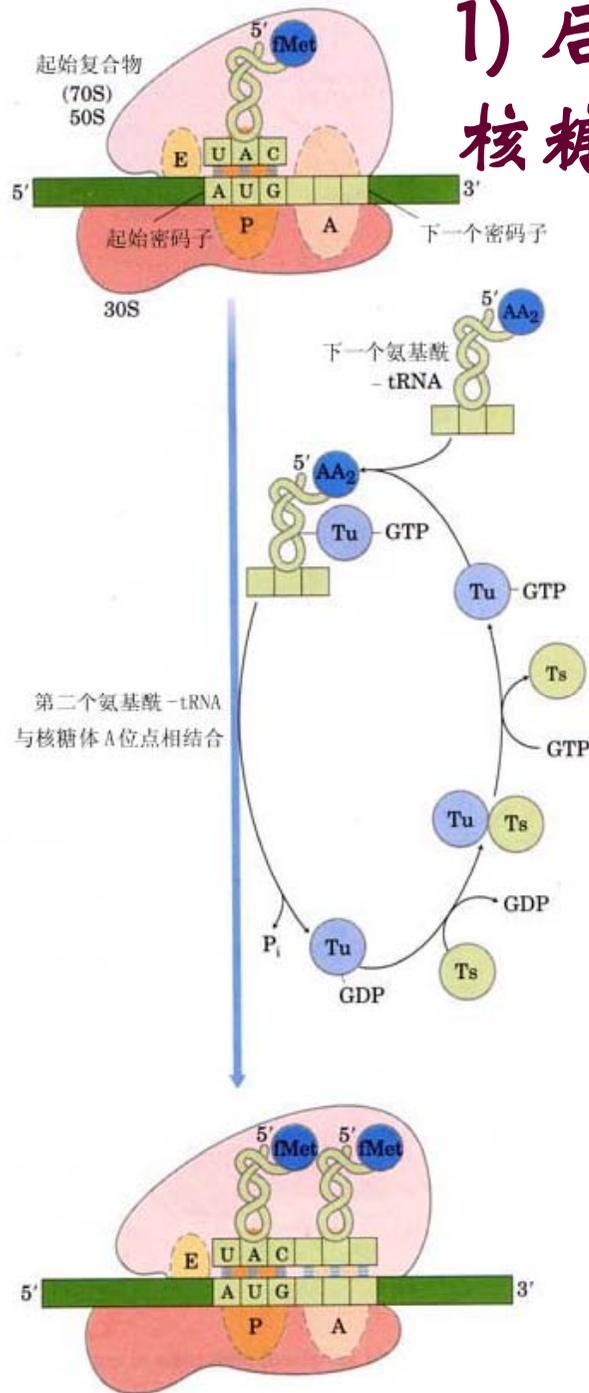
3. 肽链的延伸

- 生成起始复合物，第一个氨基酸（**fMet/Met-tRNA**）与核糖体结合以后，肽链开始伸长。
- 按照**mRNA**模板密码子的排列，氨基酸通过新生肽键的方式被有序地结合上去。
- 肽链延伸中的每个循环都包括：
 - AA-tRNA与核糖体结合；**
 - 肽键的生成；**
 - 移位。**

肽链的延伸需要

- 功能核糖体（起始复合物）
- **AA-tRNA**
- 伸长因子
- **GTP, Mg²⁺**
- **肽基转移酶**

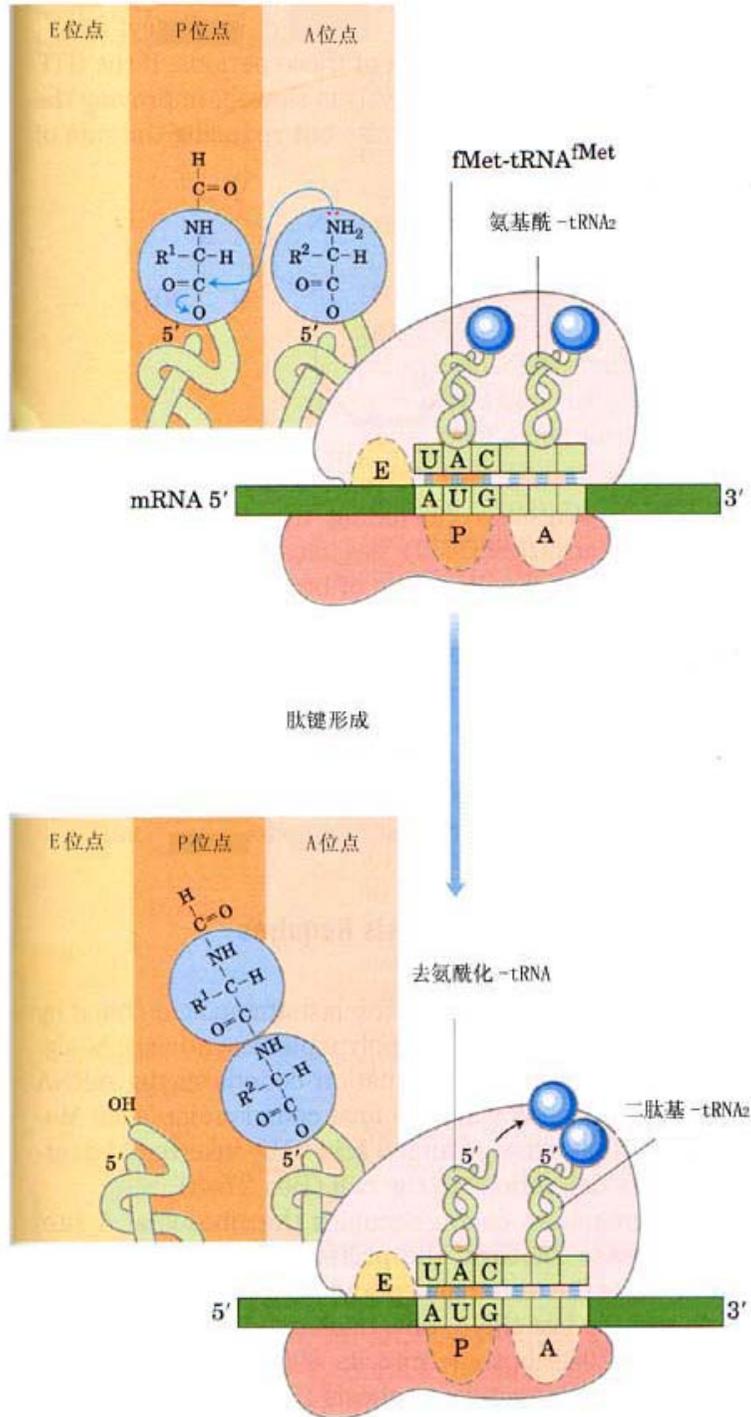
1) 后续AA-tRNA与核糖体结合



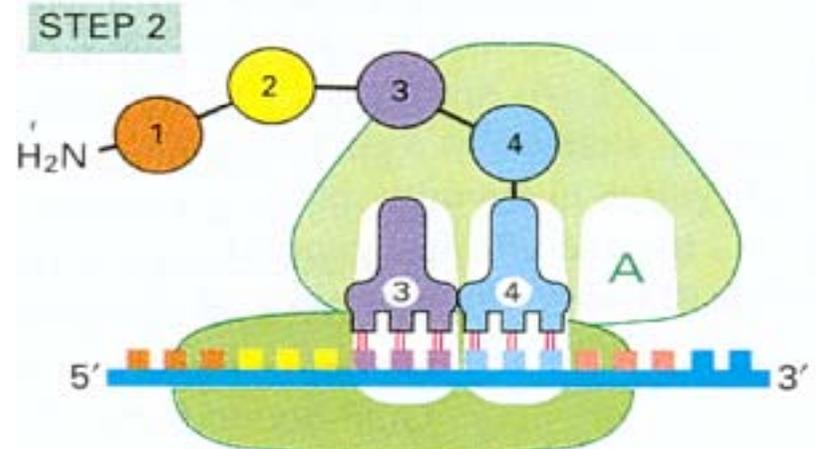
细菌中肽链延伸的第一步反应：
新的氨酰-tRNA结合到A位。
该氨酰-tRNA首先与 **EF-Tu · GTP** 形成复合物，进入核糖体的 **A** 位，水解产生 **GDP** 并在 **EF-Ts** 的作用下释放 **GDP** 并使 **EF-Tu** 结合另一分子 **GTP**，进入新一轮循环。

- 由于EF-Tu只能与fMet-tRNA以外的其他AA-tRNA起反应，所以起始tRNA不会被结合到A位上，
- mRNA内部的AUG不会被起始tRNA读出，肽链中间不会出现甲酰甲硫氨酸。

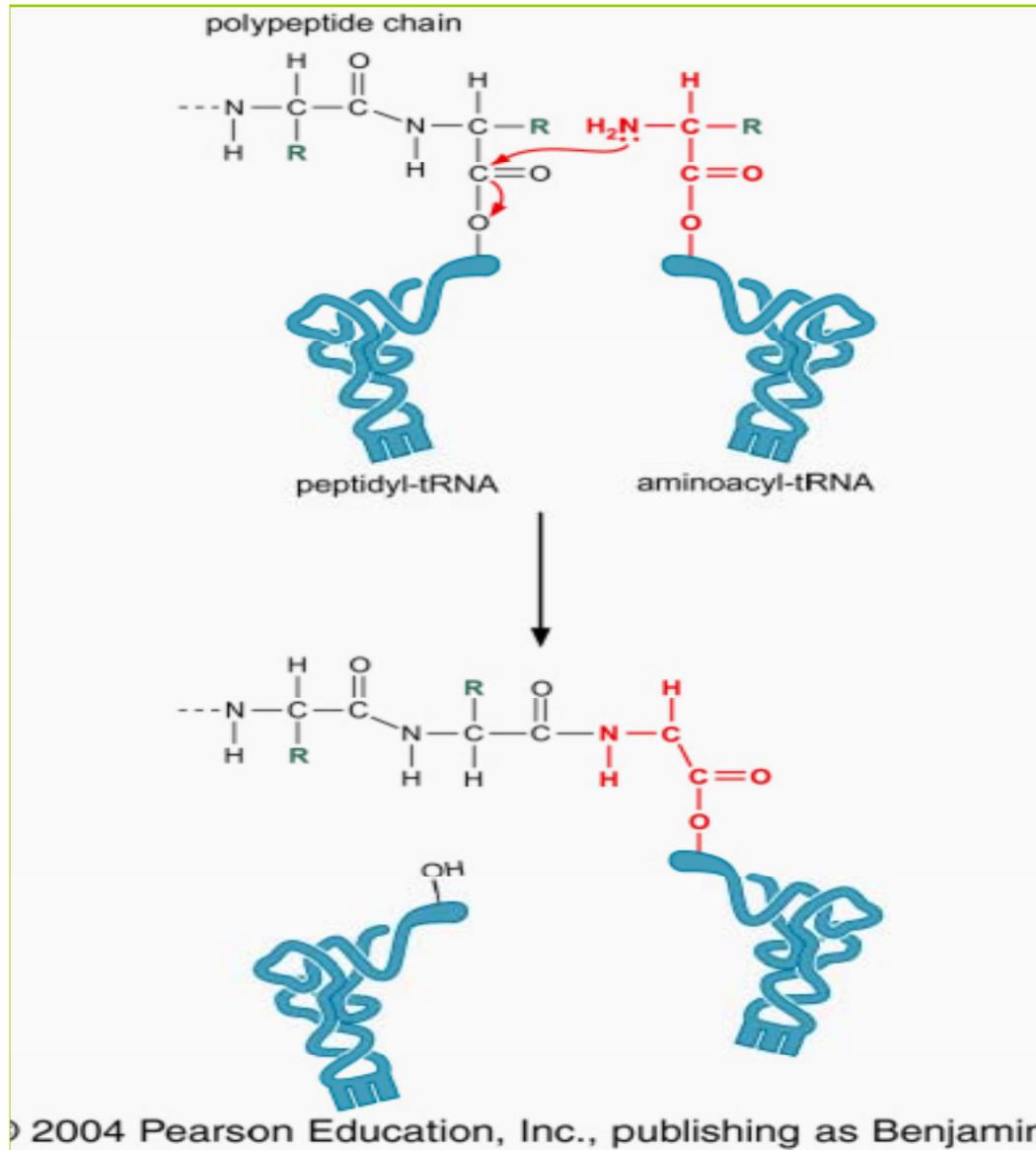
2) 肽键的生成



- 在核糖体·mRNA·AA-tRNA复合物中，AA-tRNA占据A位， $fMet-tRNA^{fMet}$ 占据P位。
- 生长肽链的C端与P位的tRNA分离，与新的氨基酸之间形成肽键。
- 构象的变化导致大亚基的移动，使两个tRNA的N端移到大亚基的E和P位，而在小亚基中它们仍位于P和A位。



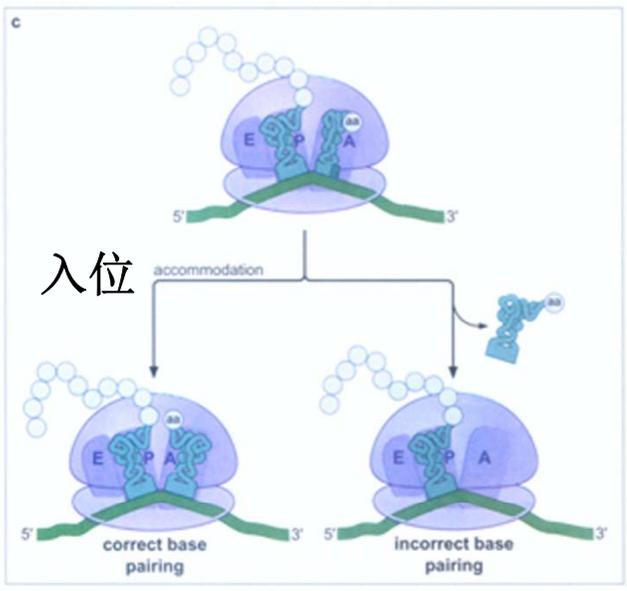
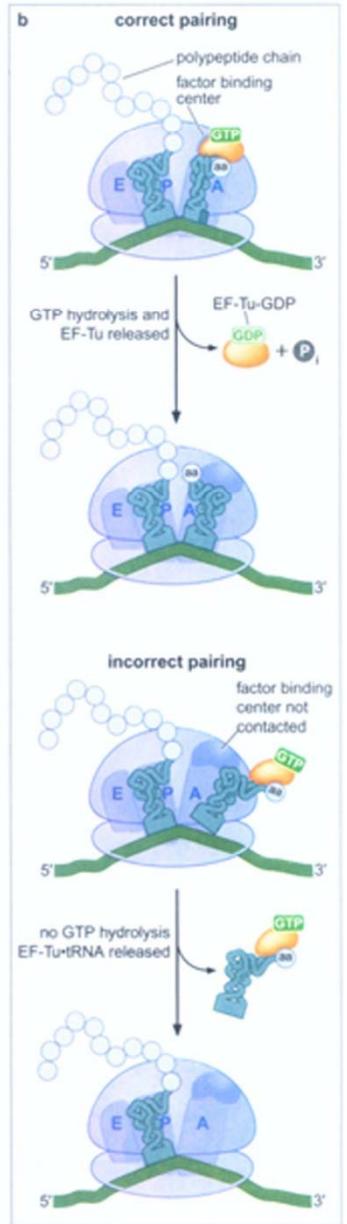
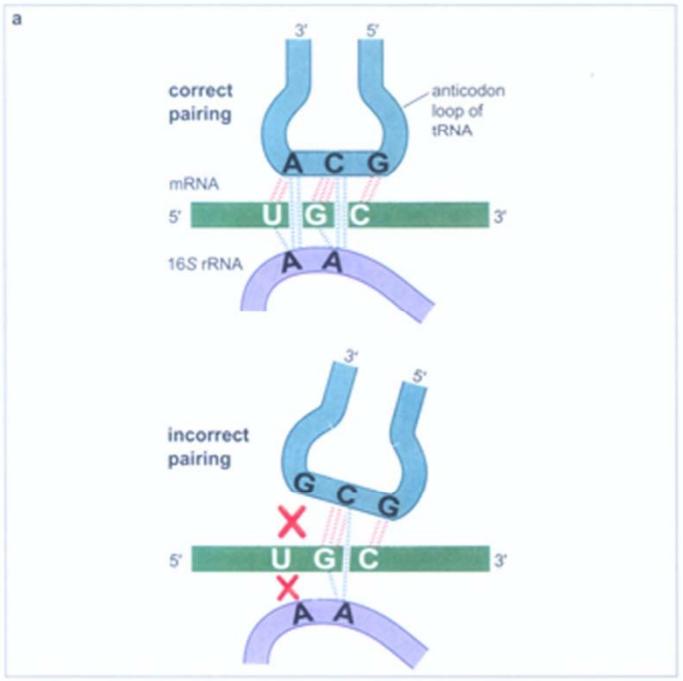
多肽链上肽键的形成——缩合反应



Protein is synthesized in a N- to C- terminal direction

Peptide bonds are formed by transfer of the growing peptide chain from peptidyl-tRNA to aminoacyl-tRNA.

核糖体利用多种机制选择排除错误的氨基酰tRNA

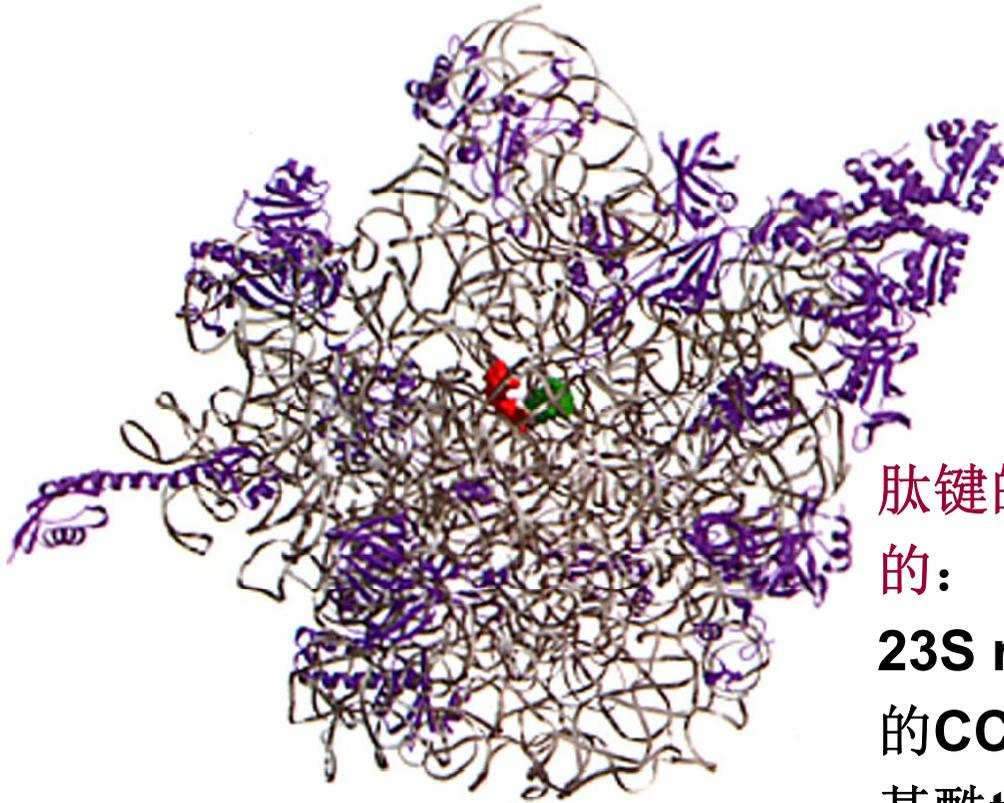


a. 只有当密码子和反密码子正确配对时，**16S rRNA**的两个腺嘌呤残基与配对碱基对的小沟间形成额外的氢键。

b. 正确的碱基配对使得结合氨基酰tRNA的**EF-Tu**与因子结合中心相互作用，诱发**GTP**的水解和**EF-Tu**的释放。

c. 只有碱基配正确的氨基酰tRNA在肽键形成过程中旋转进入正确位置，才能保持与核糖体的结合。

核糖体是核酶



14-33

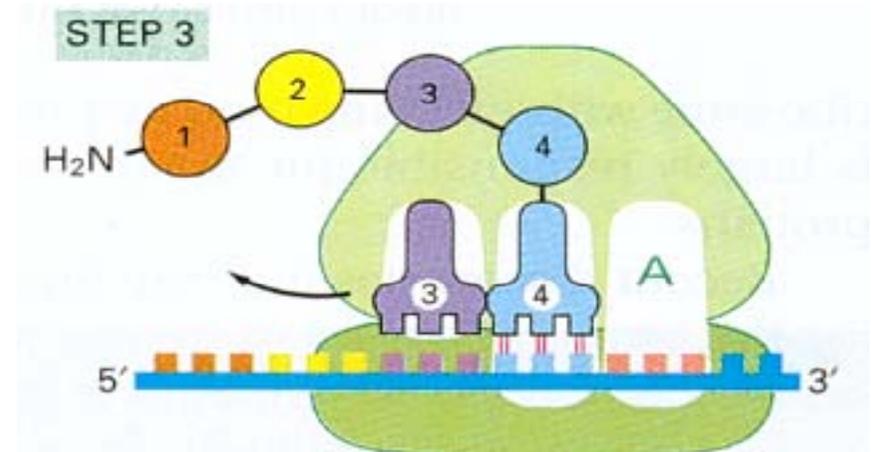
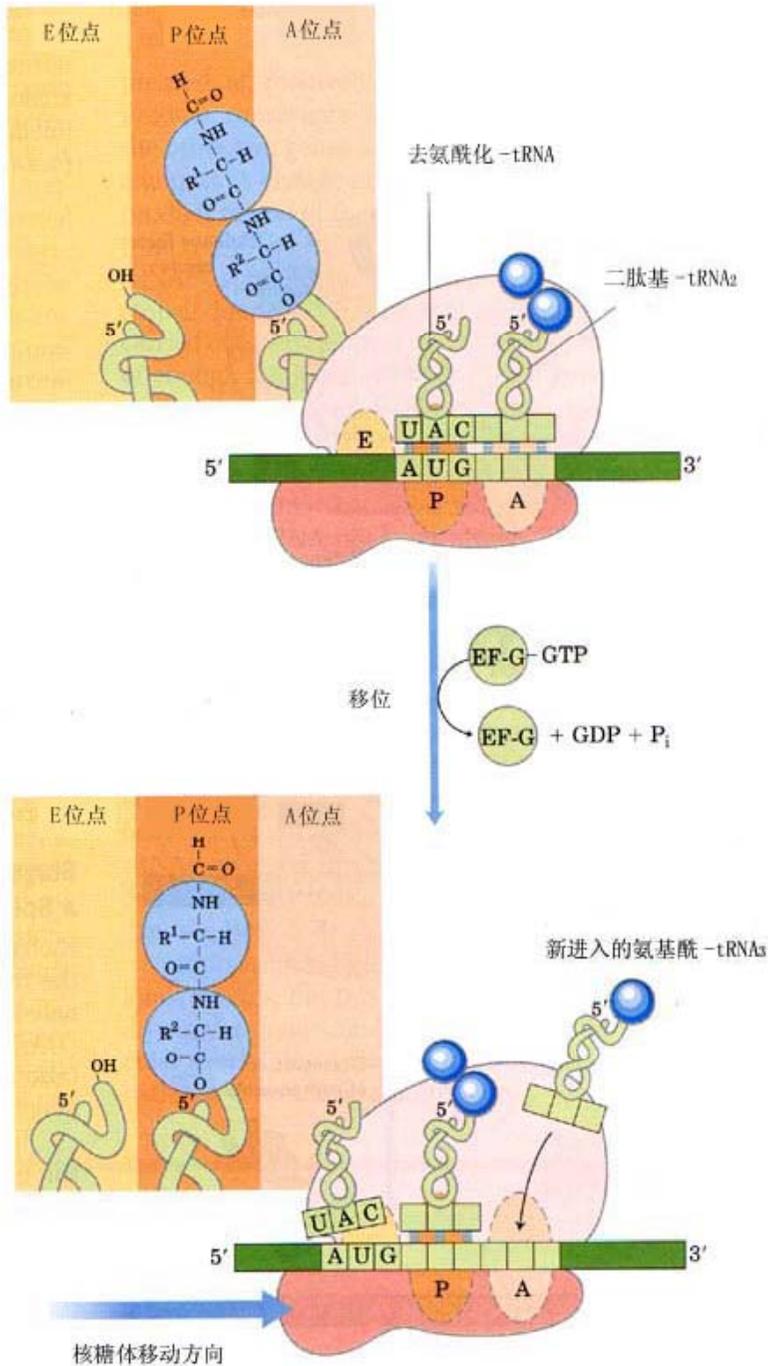
肽键的形成是由**23S rRNA**组分催化的：

23S rRNA与处于**A**和**P**位点的**tRNA**的**CCA**末端之间的碱基配对，帮助氨基酰**tRNA**的 α 氨基基团攻击结合于肽酰-**tRNA**的多肽的碳基团。

RNA环绕着大亚基的肽转移酶中心

3). 移位

核糖体通过**EF-G**介导的**GTP**水解所提供的能量向**mRNA**模板**3'**末端移动一个密码子，使两个**tRNA**完全进入**E**位和**P**位(去氨酰-tRNA被挤入**E**位；肽基-tRNA进入**P**位)，**mRNA**上的第三位密码子对应于**A**位准备开始新一轮肽链延伸。



用嘌呤霉素(AA-tRNA的结构类似物)作为抑制剂做实验表明,核糖体沿mRNA移动与肽基-tRNA的移位这两个过程是耦联的。

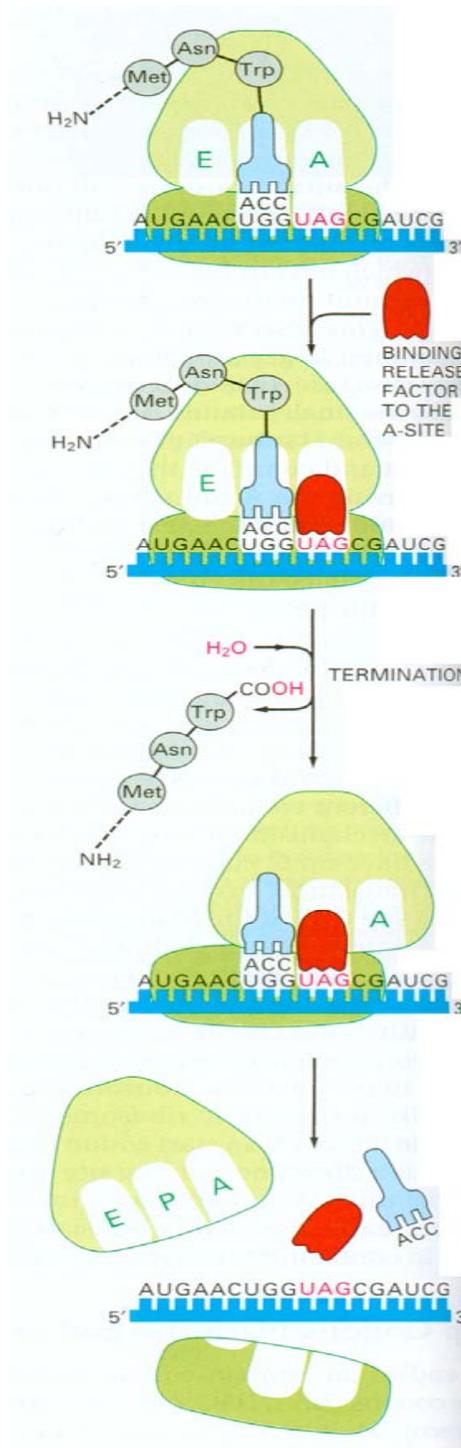
肽链延伸是由许多个这样的反应组成的:

- 原核生物中每次反应共需3个延伸因子, EF-Tu、EF-Ts及EF-G,
- 真核生物细胞需EF-1及EF-2, 消耗2个GTP, 向生长中的肽链加上一个氨基酸。

4. 肽链的终止需要

- **GTP**
- mRNA上的终止密码子
- 释放因子

4. 肽链的终止



- 当终止密码子**UAA**、**UAG**或**UGA**出现在核糖体的**A**位时，没有相应的**AA-tRNA**能与之结合。

- 释放因子能识别这些密码子并与之结合，水解**P**位上多肽链与**tRNA**之间的二酯键，释放新生的肽链和**tRNA**。

- 核糖体大、小亚基解体，蛋白质合成结束。

- 释放因子**RF**具有**GTP**酶活性，它催化**GTP**水解，使肽链与核糖体解离。

释放因子(终止因子)

I类释放因子:

- 识别终止密码子,
- 能催化新合成的多肽链从**P**位点的**tRNA**中水解释放出来;

II类释放因子:

- 在多肽链释放后刺激**I**类释放因子从核糖体中解离出来。

细菌细胞:

- **RF1 (I类)** 能识别**UAG**和**UAA**,
- **RF2 (I类)**识别**UGA**和**UAA**。

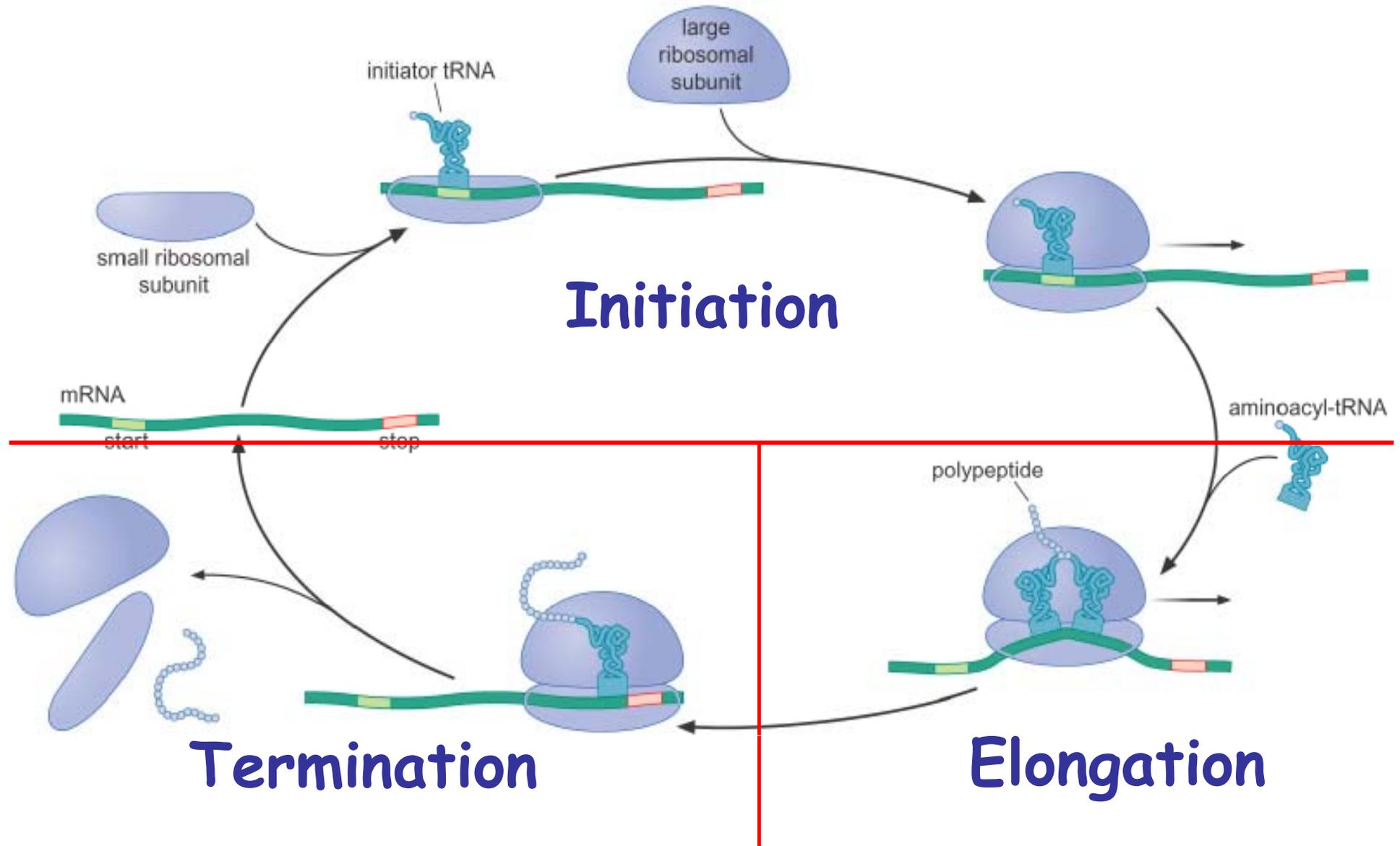
一旦**RF**与终止密码相结合, 它们就能诱导肽基转移酶把一个水分子而不是氨基酸加到延伸中的肽链上。

- **RF3 (II类)**与核糖体的解体有关。

真核细胞:

- **eRF1 (I类)** 能识别三个终止密码子,
- **eRF3 (II类)**

Overview of the events of translation



Differences between bacteria and eukaryotes

• Bacteria

- Ribosome: 30S+50S -> 70S
- Few initiation factors:
 - IF-1(eIF1A), IF-2(eIF5B), IF-3 (?)
- Elongation factors
 - EF1A (EF-Tu), EF1B (EF-Ts), EF2 (EF-G)
- Release factors
 - RF-1, RF2, RF3
- mRNA is not capped
- Direct binding of 30S particle next to initiation codon (AUG) at Shine-Dalgarno sequence, 5'-AGGAGGU-3'
- Translation coupled to transcription

Eukaryotes

- Ribosome: 40S+60S-> 80S
- Many initiation factors
 - eIF1, eIF1A, eIF2, eIF2B, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4F, eIF4G, eIF4H, eIF5, eIF5B, eIF6
- Elongation factors
 - eEF1, eEF2
- Release factors
 - eRF1, eRF3
- Most mRNA is capped at 5' end and polyadenylated at 3' end
- 40S particle is recruited to 5' cap structure or poly(A) tail or an internal ribosome entry site (IRES)
- Translation is always (?) in cytoplasm apart from transcription

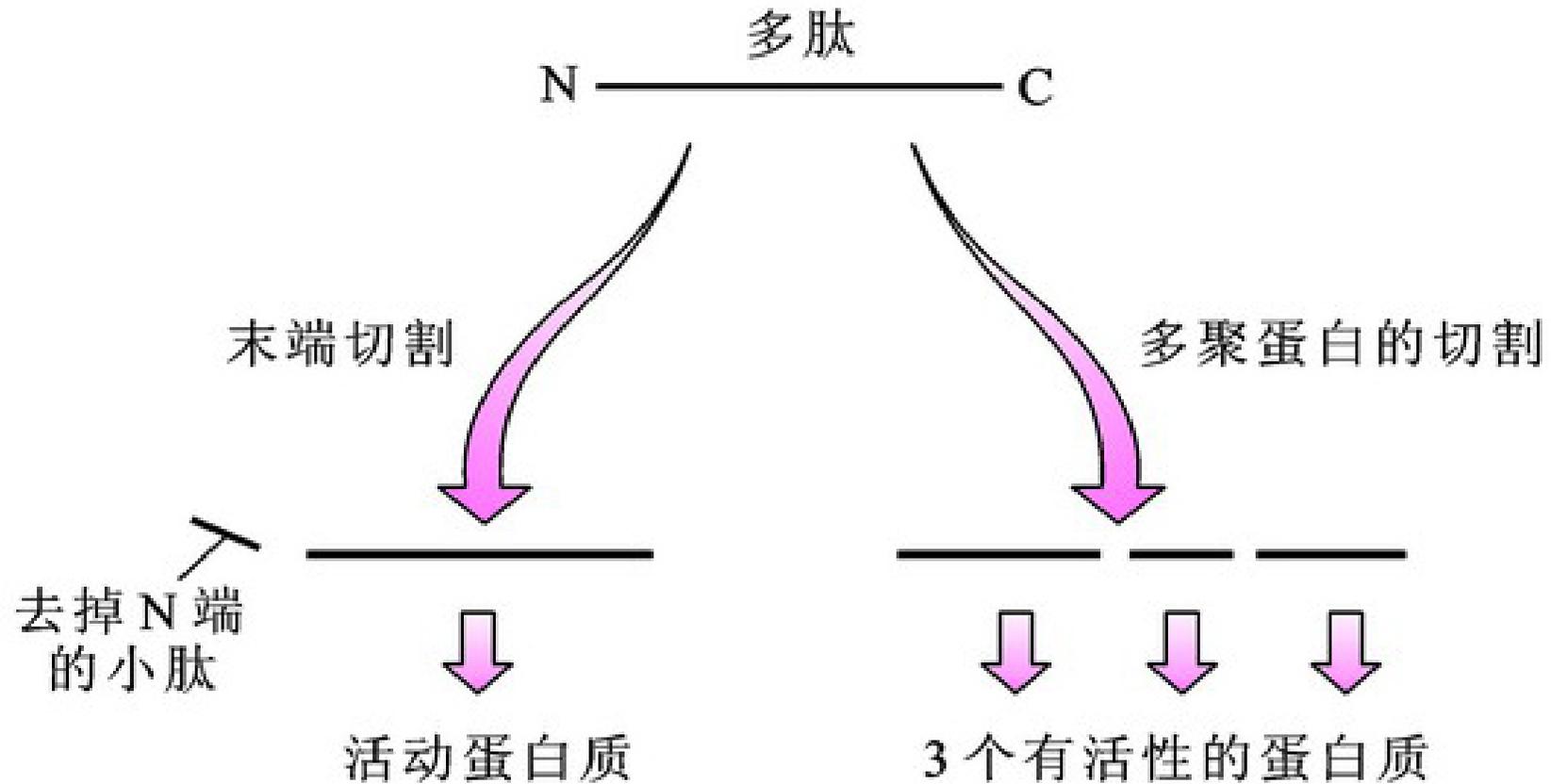
蛋白质前体的加工

新生的多肽链大多数没有功能，必须经过**加工修饰**才能转变为活性蛋白质。

蛋白质的前体加工包括：

- **N端fMet或Met**的切除
- 二硫键的形成
- 特定氨基酸的修饰
- 切除新生肽链中的非功能片段

新生蛋白质经蛋白酶切割后变成有功能的成熟蛋白质



左:新生蛋白质在去掉**N**端一部分残基后变成有功能的蛋白质

右:某些病毒或细菌可合成无活性的多聚蛋白质，经蛋白酶切割后成为有功能成熟蛋白。

蛋白质前体的加工

1、N端fMet或Met的切除

无论原核生物还是真核生物，N端的甲硫氨酸往往在多肽链合成完毕前就被一种氨肽酶切除。

蛋白质前体的加工

2、二硫键的形成

- 蛋白质的二硫键是蛋白质合成后通过两个半胱氨酸的氧化作用生成的。
- 二硫键的正确形成对稳定蛋白质的天然构象具有重要的作用。

蛋白质前体的加工

3、特定氨基酸的修饰

氨基酸侧链的修饰作用包括：

磷酸化（如核糖体蛋白质）

糖基化（如各种糖蛋白）

甲基化（如组蛋白）

乙酰化（如组蛋白）

泛素化

类泛素化

羟基化（如胶原蛋白）

羧基化等.....

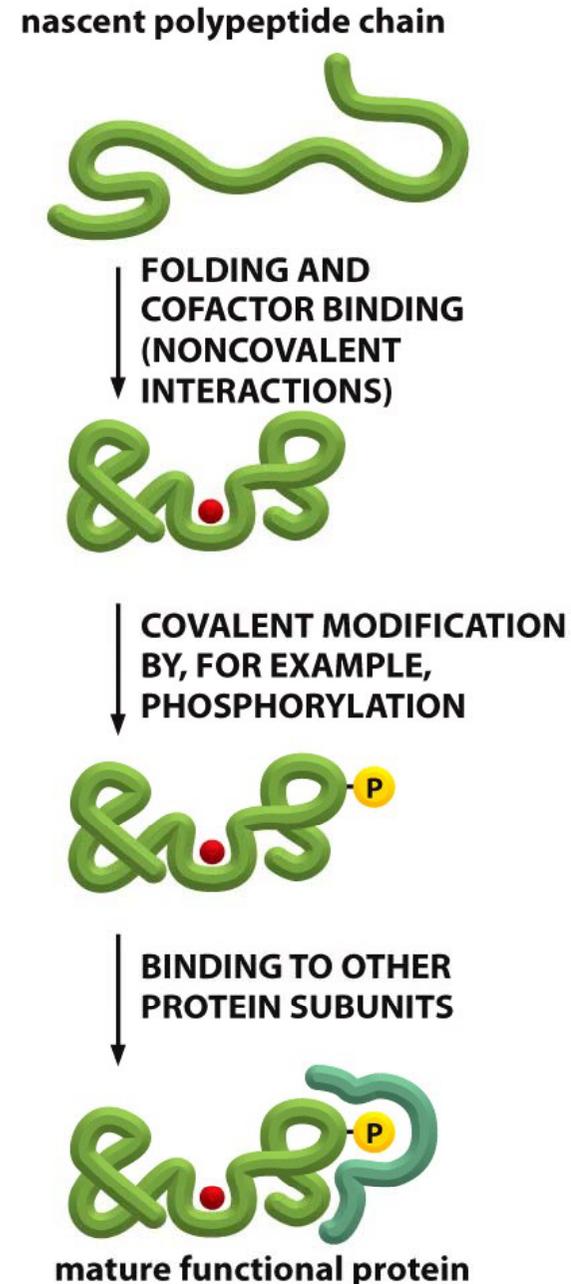


Figure 7-41 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

磷酸化(Phosphorylation)

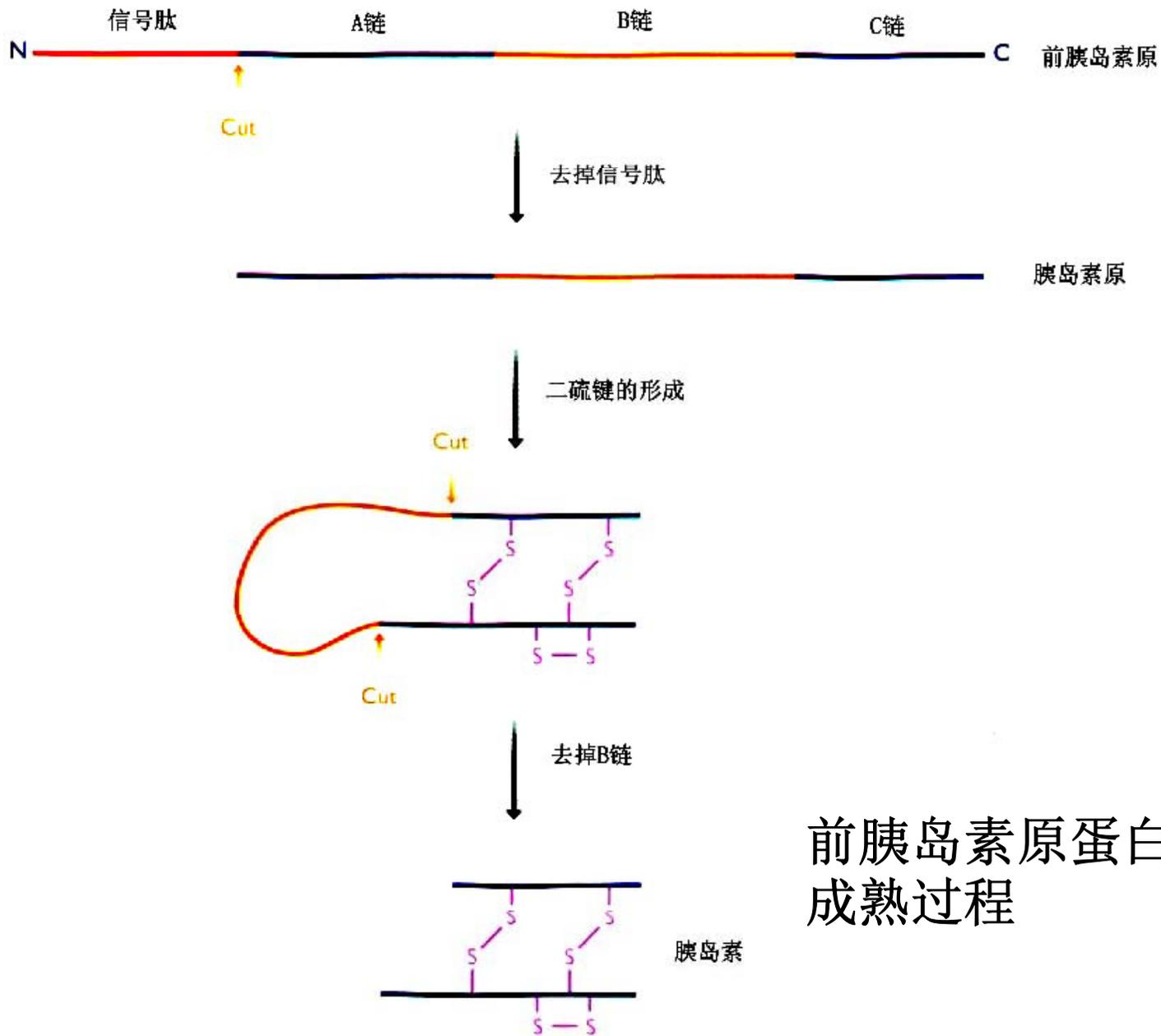
- 主要由多种蛋白激酶催化，
- 发生在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸等三种氨基酸的侧链。

PKs (protein kinases) and PPs (protein phosphatases) mediate phosphorylation and dephosphorylation of proteins respectively.

糖基化

- **糖蛋白**主要是蛋白质侧链上的**天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸**残基加上糖基形成的；
- **内质网**可能是蛋白质**N-糖基化**的主要场所。
- 所有的分泌蛋白和膜蛋白几乎都是糖基化蛋白质。

4、切除新生肽链中非功能片段



前胰岛素原蛋白翻译后成熟过程

胰岛素

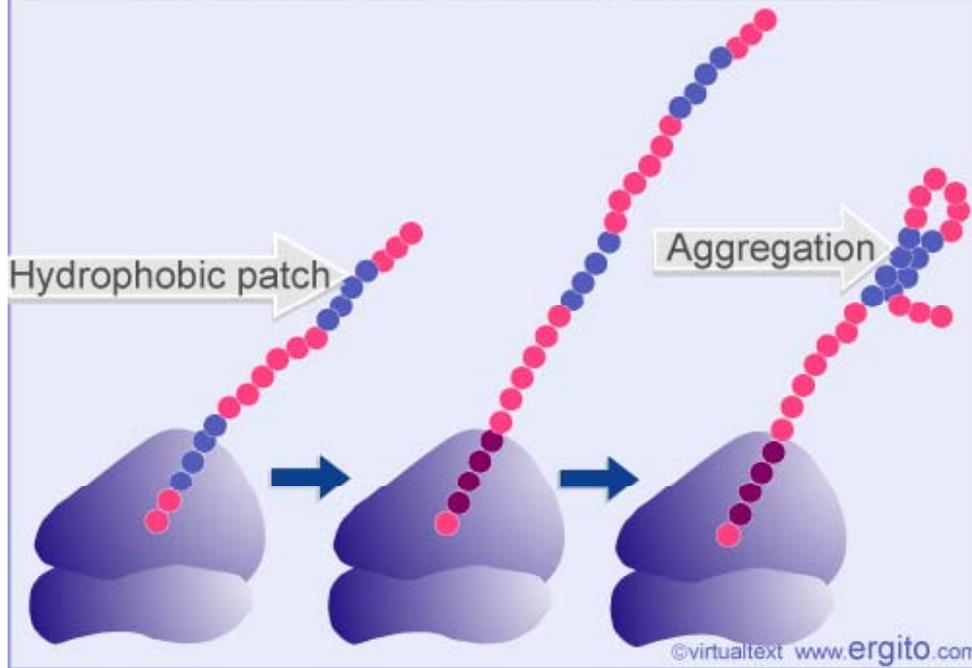
蛋白质的折叠

- 蛋白质折叠是翻译后形成功能蛋白质的必经阶段。
- 是一个复杂的过程：
首先折叠成二级结构，然后再进一步折叠盘绕成三级结构。
对于单链多肽蛋白质，三级结构就已具有蛋白质的功能；
对于寡聚蛋白质，仍需进一步组装成更为复杂的四级结构，才能表现出天然蛋白的活性或功能。

分子伴侣 (molecular chaperone)

分子伴侣是一类序列上没有相关性但有**共同功能**的保守性蛋白质，它们在细胞内能帮助其它多肽进行正确的折叠、组装、运转和降解。

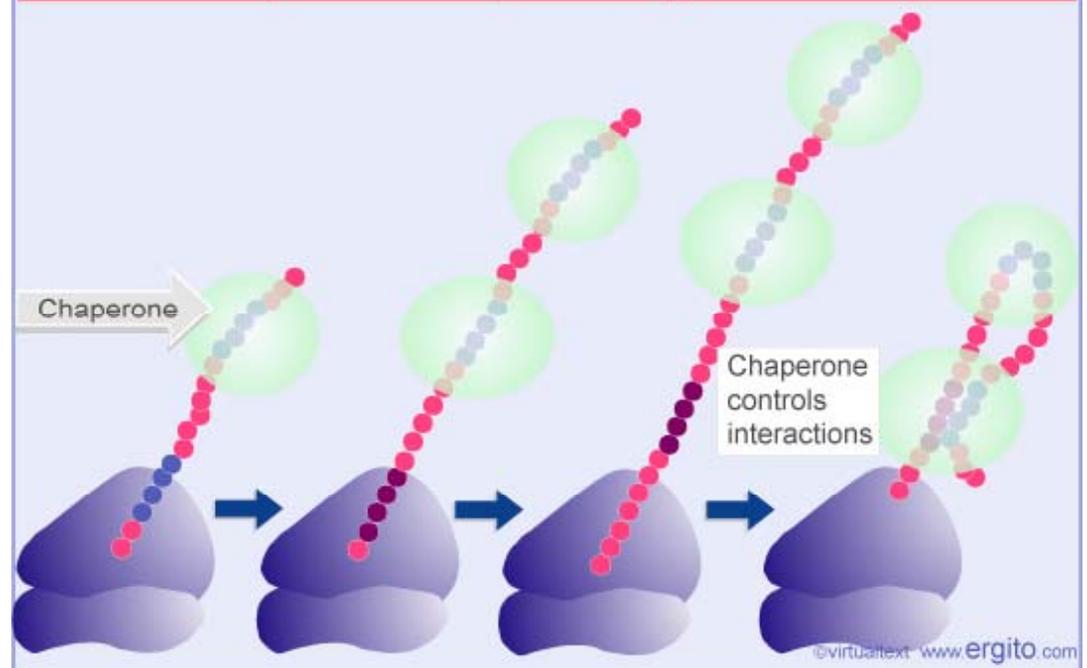
Exposed hydrophobic regions interact



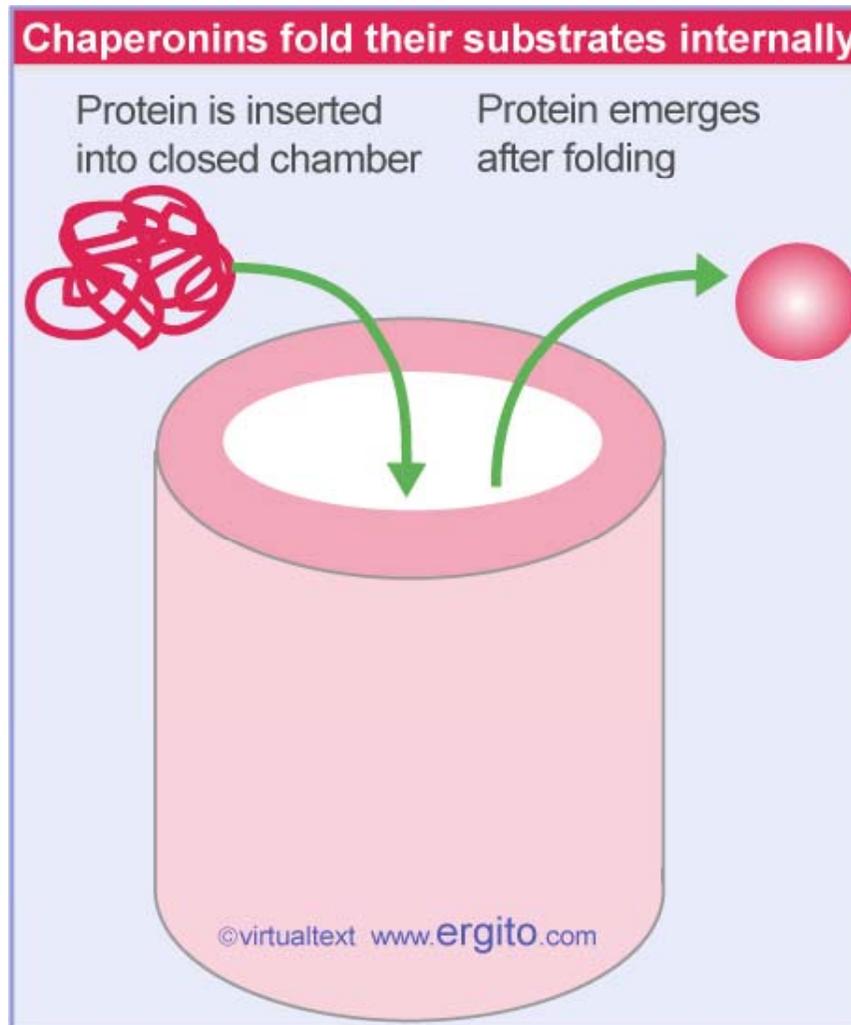
蛋白质暴露的疏水区域能相互作用

分子伴侣控制蛋白质折叠时的相互作用

Chaperones control protein folding interactions



伴侣蛋白在其内部对底物蛋白质进行折叠



分子伴侣的分类

(1) 热休克蛋白 (heat shock protein)

它是一类应激反应性蛋白，包括**HSP70**、**HSP40**和**GrpE**三族，广泛存在于原核及真核细胞中。三者协同作用，促使某些能自发折叠的蛋白质正确折叠形成天然空间构象。

(2) 伴侣素 (chaperonin)

包括**HSP60**和**HSP10**（原核细胞中的同源物分别为**GroEL**和**GroES**），它主要是为非自发性折叠蛋白提供能折叠形成天然结构的微环境。

分子伴侣的作用

伴侣分子在新生肽链折叠中的作用：

- 防止或消除肽链的错误折叠，
- 增加功能性蛋白质折叠产率来发挥作用，而非加快折叠反应速度，
- 分子伴侣本身并不参与最终产物的形成。

蛋白质合成抑制剂

蛋白质生物合成的抑制剂主要是一些**抗生素**，如嘌呤霉素、链霉素、四环素、氯霉素、红霉素等。

此外，**5-甲基色氨酸**、**环己亚胺**、**白喉毒素**、**蓖麻蛋白**和其他核糖体灭活蛋白都能抑制蛋白质的合成。

蛋白质生物合成的抑制剂的作⽤原理

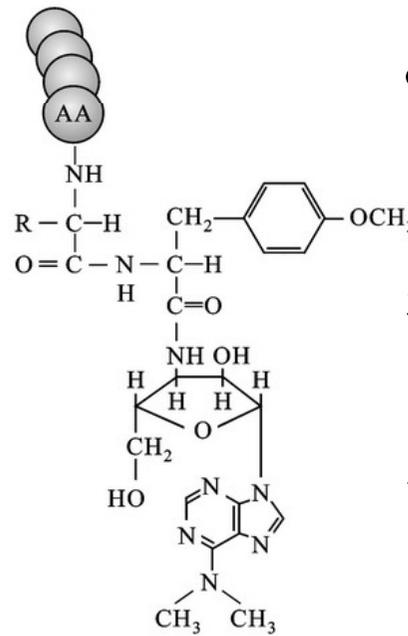
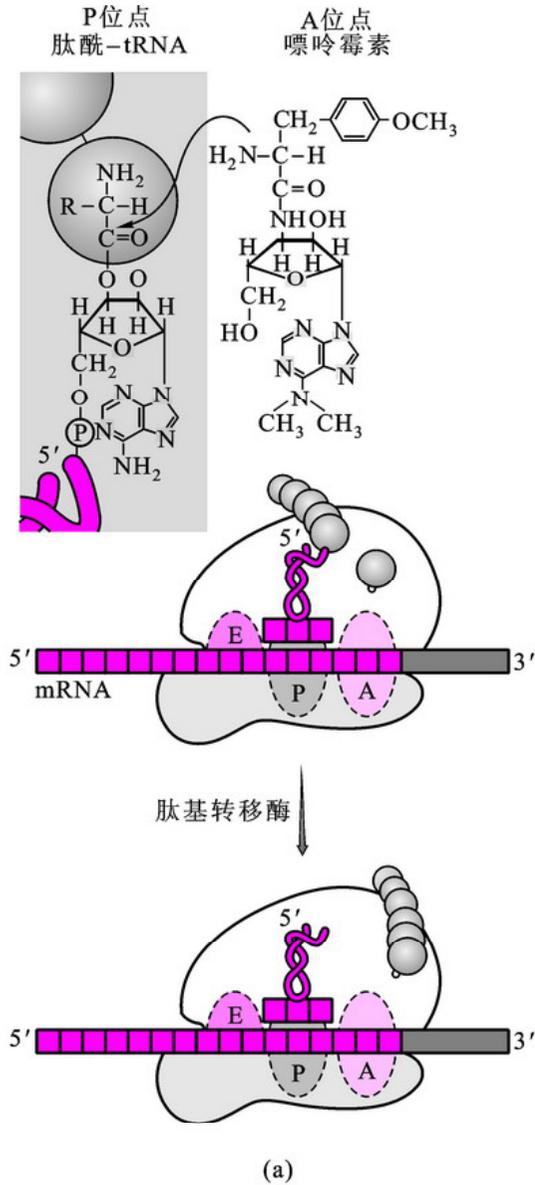
- 阻止**mRNA**与核糖体的结合；
- 阻止**AA-tRNA**与核糖体的结合；
- 阻止肽酰转移酶作⽤于核糖体；
- 干扰**AA-tRNA**与核糖体结合⽽产⽣错读；
- 阻止核糖体的移动；
- 作为竞争性抑制剂抑制蛋白质的合成。

链霉素

链霉素是一种碱性三糖,可以多种方式抑制原核生物核糖体：

- 能干扰**fMet-tRNA**与核糖体的结合，从而**阻止**蛋白质合成的正确起始，
- 也会导致**mRNA**的错读。若以多聚**(U)**作模板，则除苯丙氨酸（**UUU**）外，异亮氨酸（**AUU**）也会被掺入。
- 链霉素的作用位点在**30 S**亚基上。

嘌呤霉素是AA-tRNA的结构类似物



- 不需要延伸因子就可以结合在核糖体的A位上，抑制AA-tRNA的进入。

- 它所带的氨基也能与生长中的肽链上的羧基反应生成肽键，反应的产物是一条3'羧基端挂了一个嘌呤霉素残基的小肽，肽酰嘌呤霉素随后从核糖体上解离出来。

通过提前释放肽链来抑制蛋白质合成的

抗生素：目标和后果

抗生素/毒素	目标细胞	分子目标	后果
氯霉素	原核细胞	50S亚基的肽基转移酶中心	阻断A位点的氨基酰tRNA为进行肽基转移反应的正确定位
四环素	原核细胞	30S亚基A位点	抑制氨基酰tRNA结合到A位点
潮霉素	原核和真核细胞	小亚基A位点附近	阻挠A位点tRNA到P位点的移位
嘌呤霉素	原核和真核细胞	大亚基的肽基转移酶中心	链终止子；模仿A位点的氨基酰tRNA的端，作为新的多肽链的接受者
红霉素	原核细胞	50S亚基的多肽出口通道	阻断成长中的多肽链从核糖体的出口，阻遏翻译
青霉素	原核细胞	作用于肽葡聚糖转肽酶	抑制细菌细胞壁的合成
链霉素	原核细胞	作用于30S亚基	干扰氨基酰tRNA与核糖体的结合；导致mRNA的错读
卡那霉素	原核细胞	作用于30S核糖体亚基	干扰氨基酰tRNA与核糖体的结合，使细菌蛋白质合成发生错误。
白喉毒素	真核细胞	化学修饰EF-Tu	抑制EF-Tu的功能
放线菌酮	真核细胞	60S亚基的肽基转移酶中心	抑制肽基转移酶活性
蓖麻毒素	真核细胞	60S亚基的肽基转移酶中心	阻挠翻译因子GTP酶的活化

蛋白质运转机制

由于细胞各部分都有特定的蛋白质组分，因此合成的蛋白质必须准确无误地定向运送才能保证生命活动的正常进行。

蛋白质在两种场所内合成

- 大部分蛋白质是由细胞质中的核糖体合成的
- 小部分蛋白质是由某些器官，如线粒体、叶绿体中的核糖体合成的

在细胞质中合成的蛋白质根据其位置又分为：

- 1、与膜结合的；
- 2、不与膜结合的。

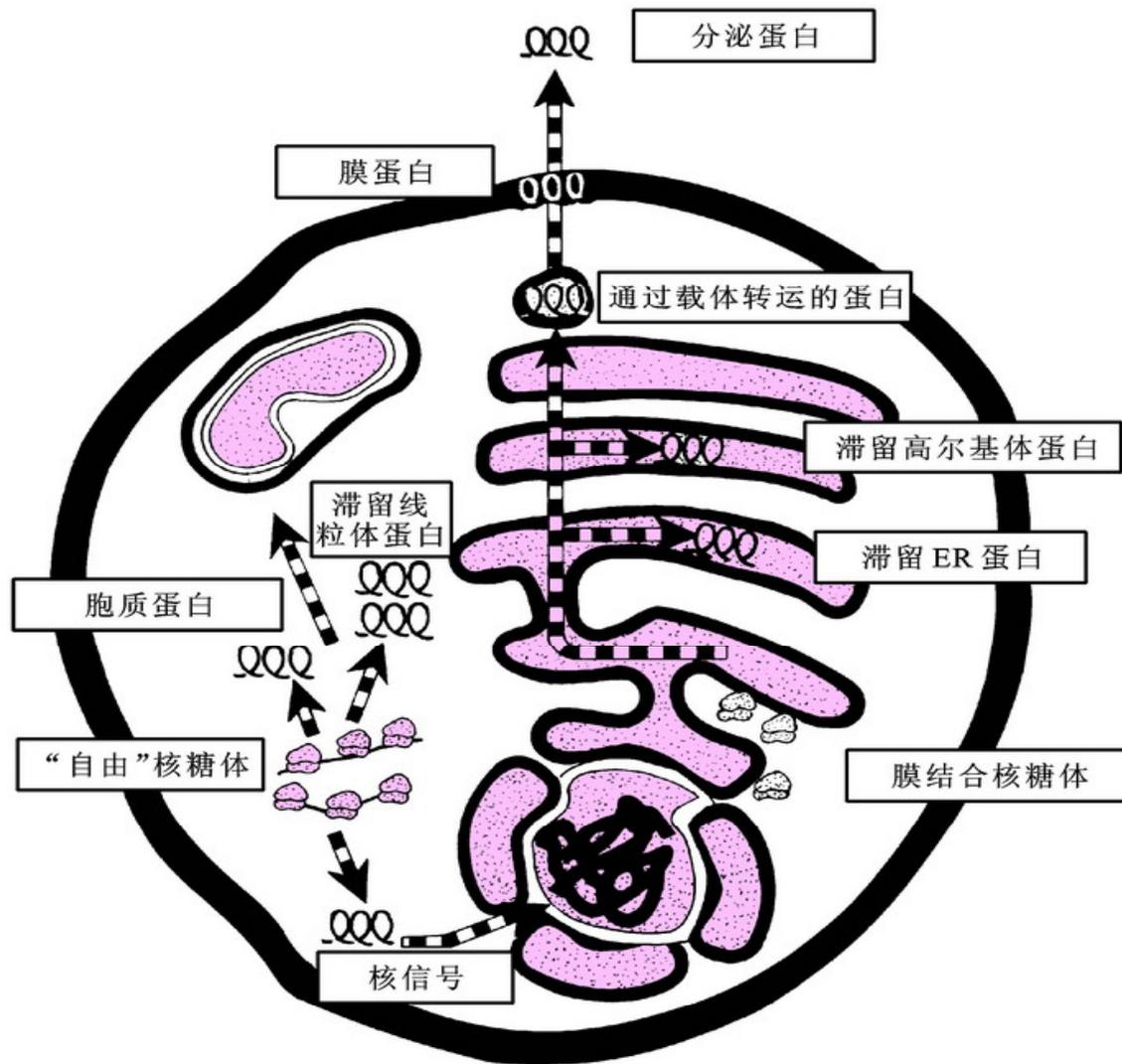
- 蛋白质怎样从合成的部位运送至功能部位的？
- 它们又是如何跨膜运送的？
- 跨膜之后又是依靠什么信息到达各自“岗位”？

两种运转机制:

- **翻译运转同步机制(co-translational)**
某个蛋白质的合成和运转是同时发生的
- **翻译后运转机制(post-translational)**
蛋白质从核糖体上释放后才发生的运转

这两种运转方式都涉及到蛋白质分子内特定区域与细胞膜结构的相互关系。

蛋白质合成和运转示意图



进行翻译时运转的蛋白质:

- 在合成过程中与内质网膜结合:核糖体是“膜结合”的。
- 合成后,蛋白质进入内质网,经高尔基体后穿出细胞质膜。
- 如果这些蛋白质具有某种信号:则可能驻留在运输途径中的某一环节,也可直接定位于其它细胞器(溶酶体等)。

进行翻译后运转的蛋白质:

- 在细胞质中游离核糖体上合成之后释放入细胞质,
- 其中一些具有线粒体定位信号或核定位信号。

几类主要蛋白质的运转机制

蛋白质性质	运转机制	主要类型
分泌	蛋白质在结合核糖体上合成，以翻译运转同步机制运输	细胞因子、生长因子、免疫球蛋白、卵蛋白、水解酶、激素等
细胞器发育	蛋白质在游离核糖体上合成，以翻译后运转机制运输	核、叶绿体、线粒体、乙醛酸循环体、过氧化物酶体等细胞器中的蛋白质
膜的形成	两种机制兼有	质膜、内质网、类囊体中的蛋白质

翻译-运转同步机制

蛋白质定位信息存在于自身结构中，并通过与膜上特殊受体的相互作用得以表达，即蛋白质通过其信号序列与膜或其它任何结构结合---信号肽假说的基础。



蛋白质跨膜运转信号也是由**mRNA**编码的。

信号序列启动蛋白的运转

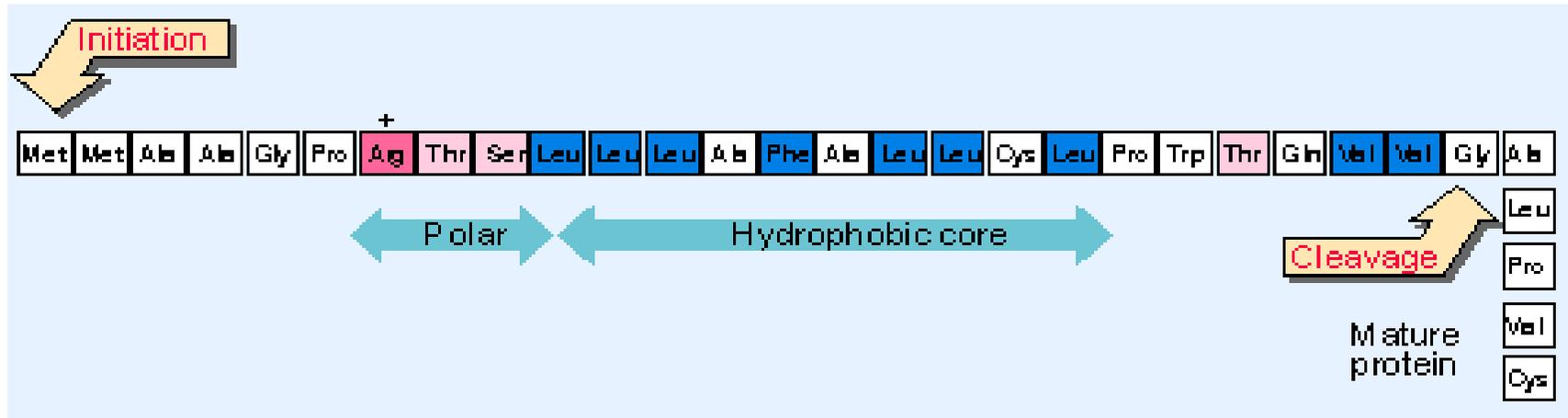
信号序列：在起始密码子后，有一段编码疏水性氨基酸序列的**RNA**区域，这个氨基酸序列就被称为信号序列。

信号序列在结合核糖体上合成后便与膜上特定受体相互作用，产生通道，允许这段多肽在延长的同时穿过膜结构。



边翻译边跨膜运转

蛋白质通过其N-端的信号肽在内质网中运转到不同的细胞器



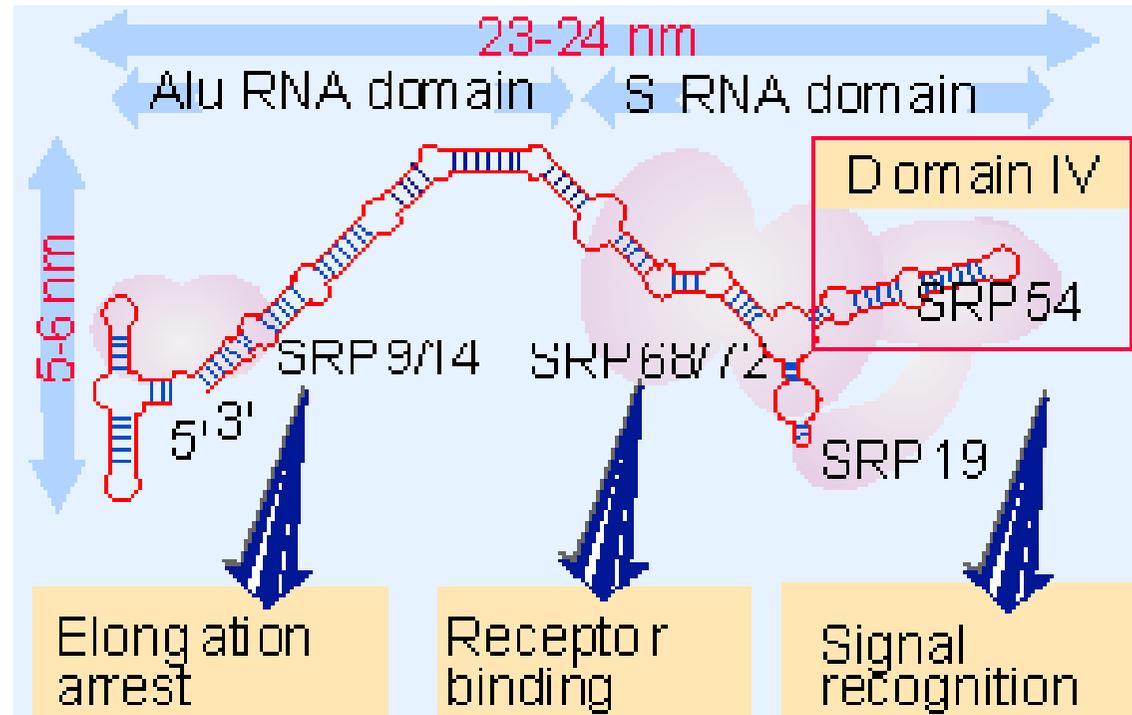
绝大部分被运入内质网内腔的蛋白质都带有一个**信号肽(signal peptide)**，位于蛋白质的氨基末端（**13-36**个残基）：

- (1) 一般带有**10-15**个**疏水氨基酸**；
- (2) 在靠近该序列**N-端**常常有**1**个或数个带正电荷的氨基酸；
- (3) 在其**C-末端**靠近蛋白酶切割位点处常常带有数个**极性氨基酸**，离切割位点最近的那个氨基酸往往带有很短的侧链（丙氨酸或甘氨酸）。

- 信号肽能够形成包括两个 α -螺旋的发夹结构。
- 这一结构在信号识别颗粒(signal recognition particle, 简称SRP)的帮助下插入到粗面内质网的膜中。

signal recognition particle (SRP)

- **SRP**是一个小的**RNA-蛋白质复合体**,由约**300**个核苷酸的**7S RNA**和**6**种紧密结合的蛋白质(分子量从**9~72KDa**)所组成。
- 在翻译过程中它能够识别信号序列, 指导核糖体到转运通道。



SRP可以分为两个结构域:

(1) **信号识别结构域**:由**7S RNA**的大约第**100**至第**25**个核苷酸部分与**19KDa**、**54KDa**、**68KDa**和**72KDa**蛋白质所构成。

(2) **延伸作用制动结构域**: **7S RNA**的其余部分(相当于**Alu**序列)与**9KDa**和**14KDa**蛋白质所构成,其功能是**使肽链的延伸暂停**。

SRP和DP蛋白介导了蛋白质的跨膜运转过程

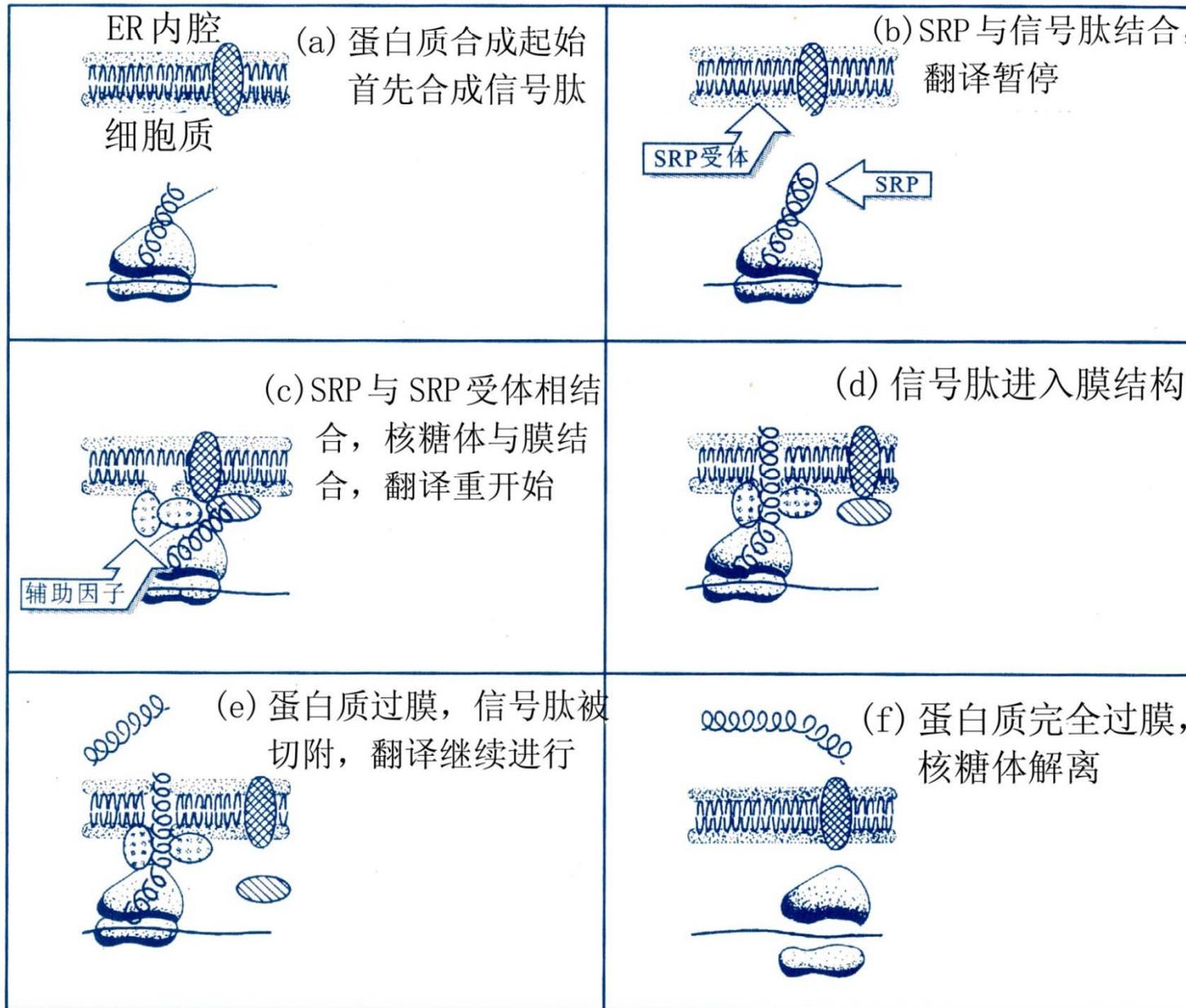
SRP（信号识别蛋白）能同时识别需要通过内质网膜进行运转的新生肽和自由核糖体，并导致该多肽合成的暂时终止（此时新生肽一般长约**70**个残基左右）。

SRP-信号肽-多核糖体复合物即被引向内质网膜并与**SRP**的受体——**Docking Protein**（停靠蛋白，又称**SRP**受体蛋白）相结合。

SRP和DP蛋白介导了蛋白质的跨膜运转过程

- 只有当**SRP**与**DP**相结合时，多肽合成才恢复进行，信号肽部分通过膜上的核糖体受体及蛋白运转复合物跨膜进入内质网内腔，新生肽链重新开始延伸。
- **SRP**与**DP**的结合很可能导致受体聚集而形成膜孔道，使信号肽及与其相连的新生肽得以通过。

蛋白质跨膜运转的信号肽假说及其运输过程

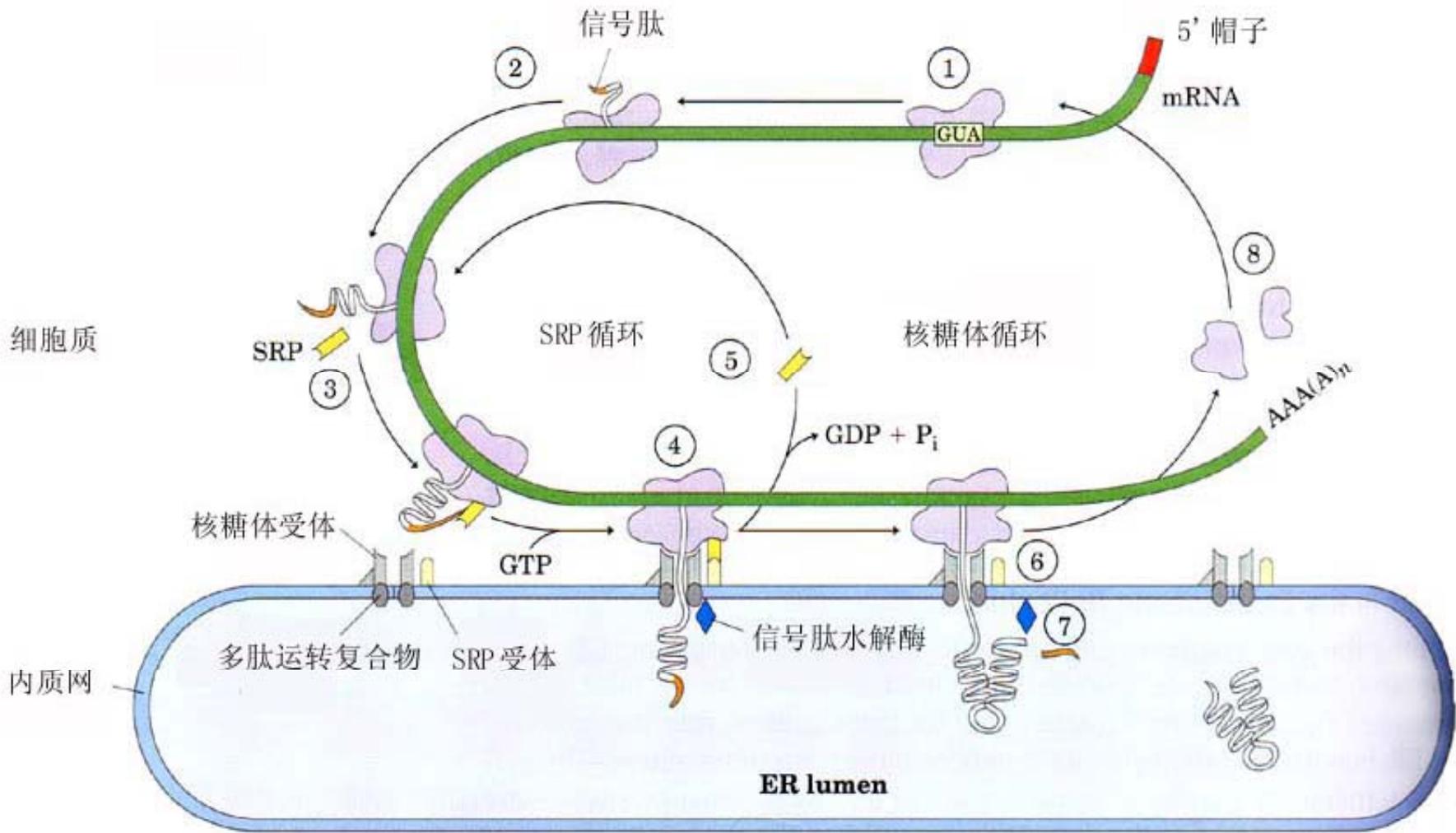


信号肽在蛋白质运输过程中的作用

- 完整的信号肽是保证蛋白质运转的必要条件。
- 仅有信号肽还不足以保证蛋白质运转的发生。还要求运转蛋白质在信号序列以外的部分有相应的结构变化。
- 信号序列的切除并不是运转所必需的。
- 并非所有的运转蛋白质都有可降解的信号肽。

“信号肽”：

能启动蛋白质运转的任何一段多肽

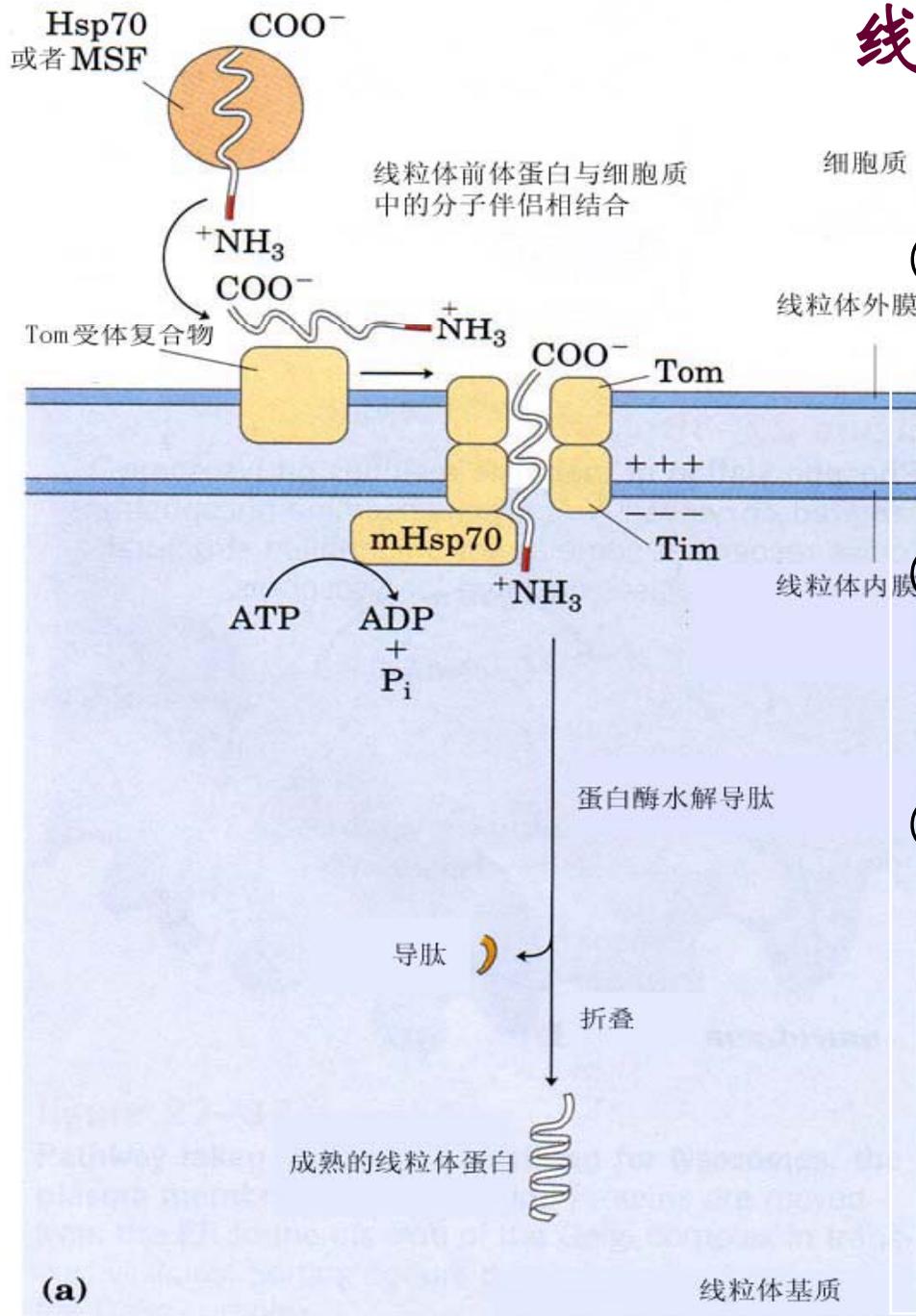


新生蛋白质通过同步转运途径进入内质网内腔的主要过程。

翻译后运转机制

- 1、线粒体蛋白质跨膜运转
- 2、前导肽的作用和性质
- 3、叶绿体蛋白质的跨膜运转

线粒体蛋白质的跨膜运转



①被运转蛋白质大多数以前体形式存在：

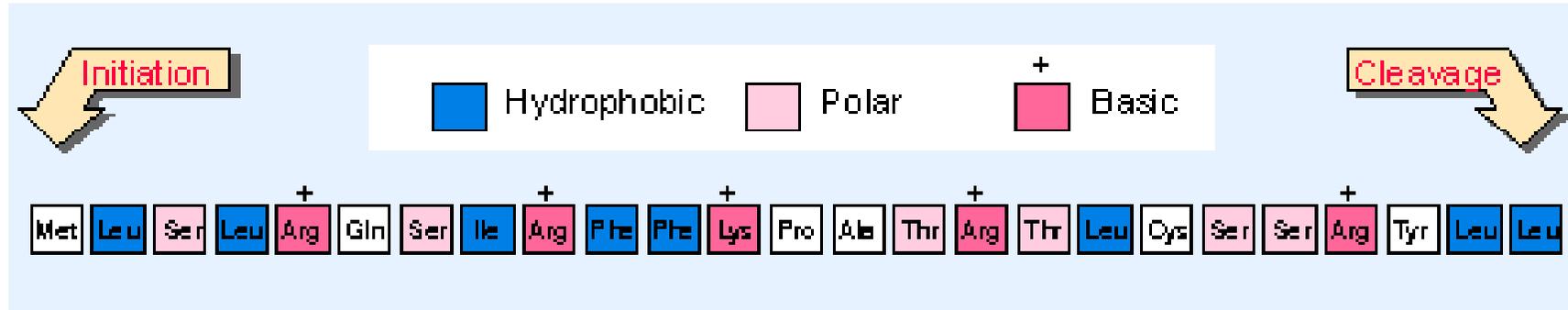
由成熟蛋白质和位于N端的前导肽（**leader peptide**）组成

②是一种需能过程；

来自线粒体Hsp70引发的ATP水解和膜电位差

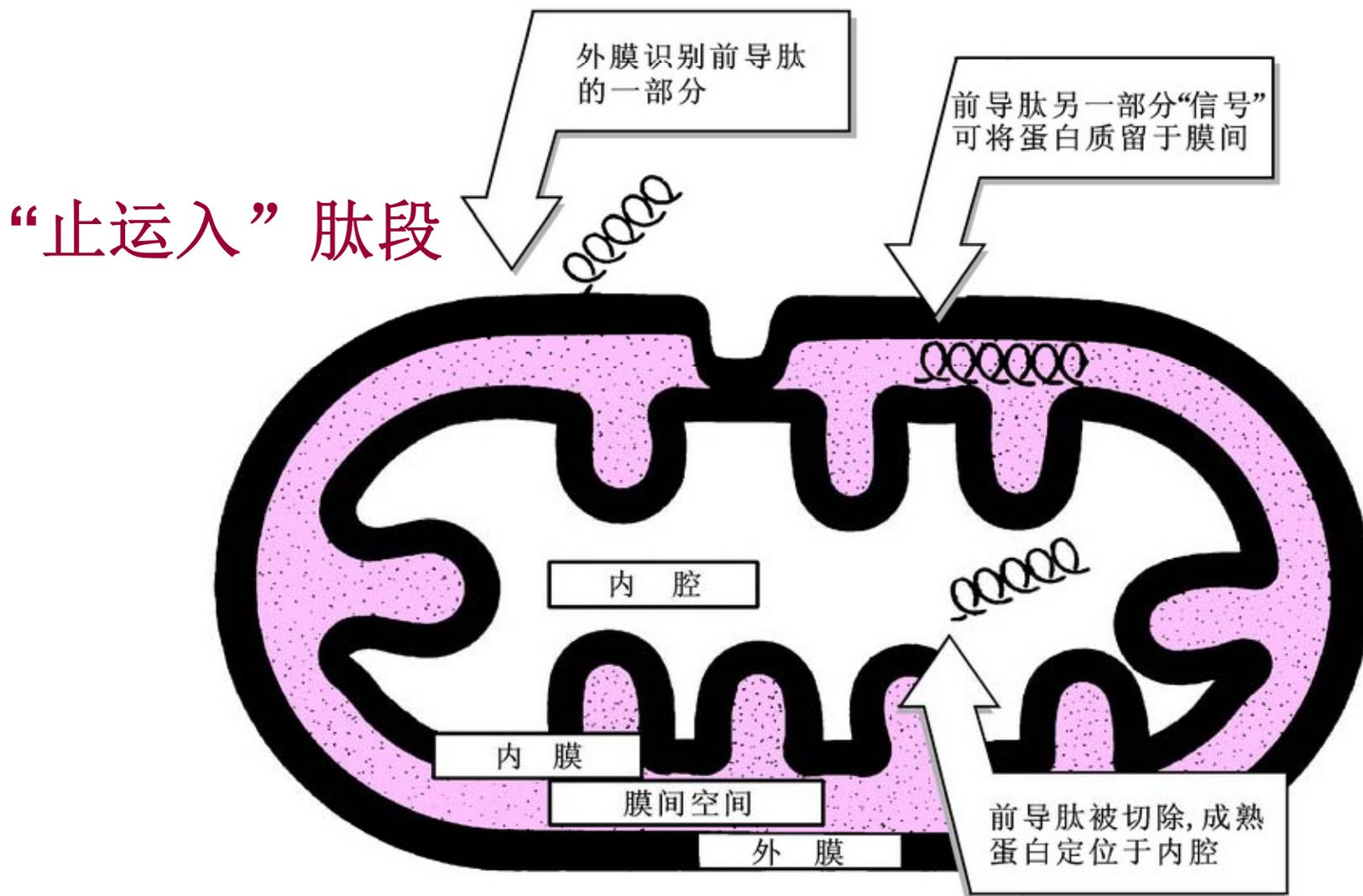
③运转时，首先由外膜上的Tom受体复合蛋白识别与Hsp70或MSF等分子伴侣相结合为待运转多肽，通过Tom和Tim组成的膜通道进入线粒体内腔。

前导肽的作用与性质



- 带正电荷的碱性氨基酸（特别是精氨酸）含量较为丰富，分散于不带电荷的氨基酸序列之间；
- 缺少带负电荷的酸性氨基酸；
- 羟基氨基酸(Ser等)含量较高；
- 有形成两亲(既有亲水又有疏水部分) α -螺旋结构的能力。

前导肽的不同区域可能在蛋白质跨膜运转过程中起不同的作用

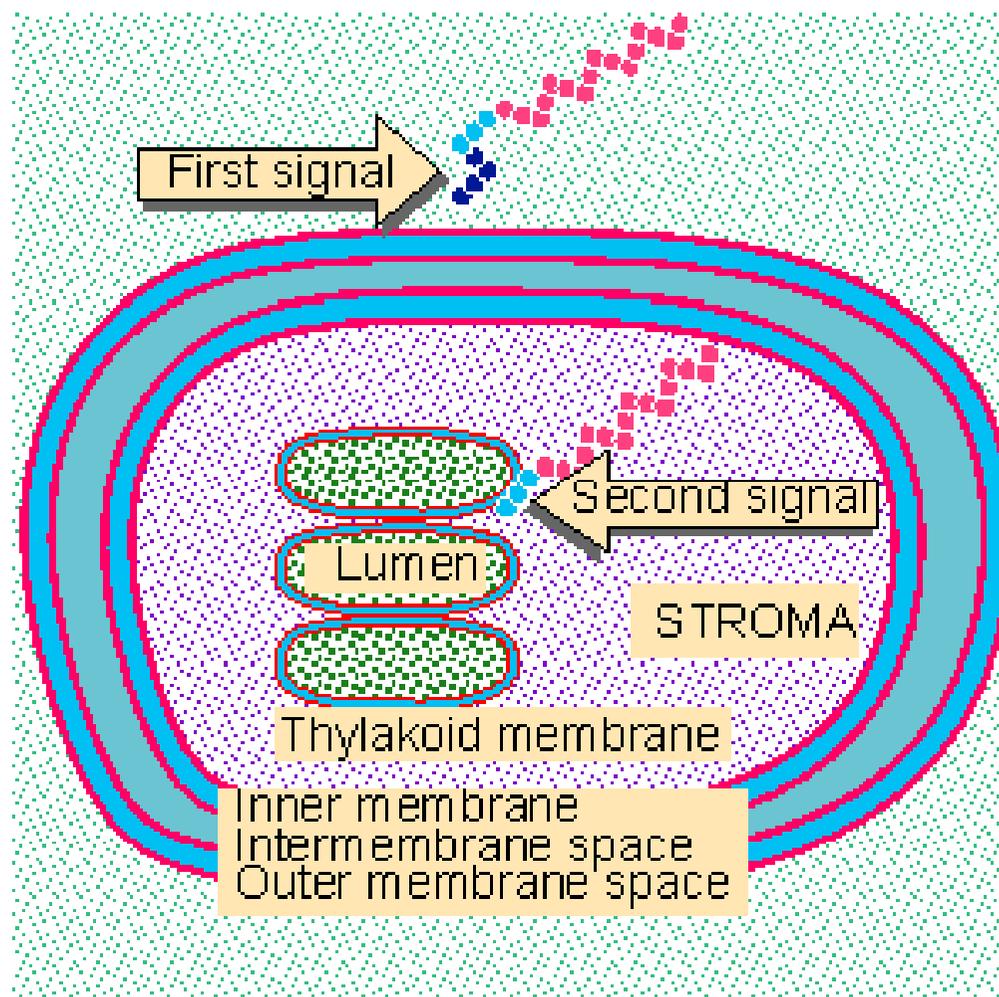


叶绿体蛋白质的跨膜运转

- 叶绿体多肽在胞质中的游离核糖体上合成后脱离核糖体并折叠成具有三级结构的蛋白质分子，
- 多肽上某些特定位点结合于只有叶绿体膜上才有的特异受体位点。

叶绿体定位信号肽一般有两个部分：

- 第一部分决定该蛋白质能否进入叶绿体基质，
- 第二部分决定该蛋白能否进入类囊体。



叶绿体蛋白质跨膜运转

可溶性的活性蛋白水解酶位于叶绿体基质内，这是鉴别翻译后运转的指标之一。

叶绿体膜上有识别叶绿体蛋白的特异性受体，能够特异地与叶绿体蛋白的前体结合。

叶绿体蛋白质前体内可降解序列因植物和蛋白质种类不同而表现出差异。



核定位蛋白的运转机制

在细胞质中合成的蛋白质



核孔

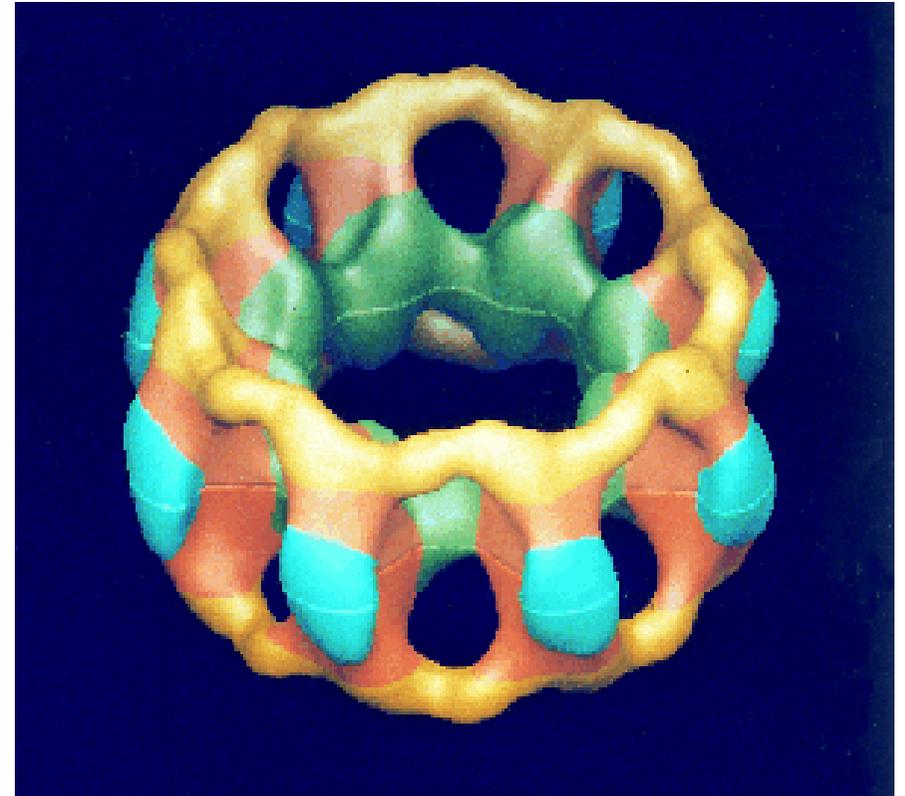
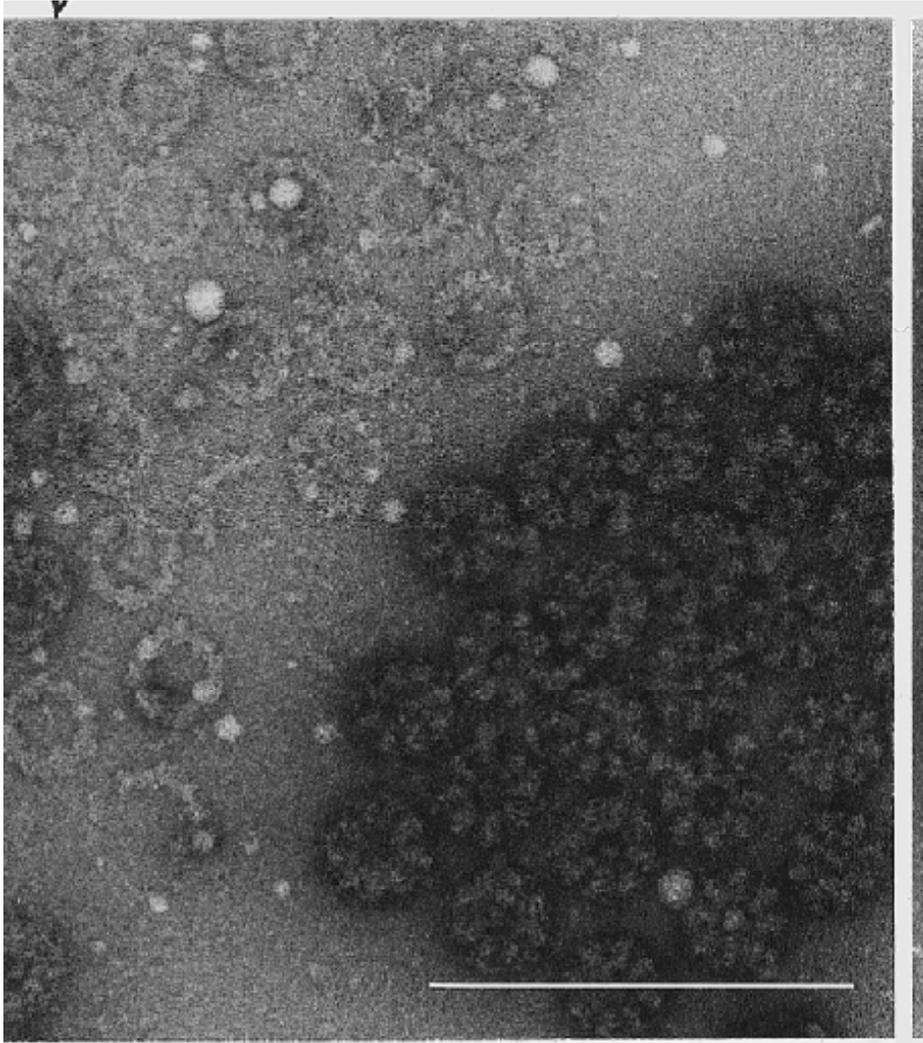


细胞核

Nuclear pores are used for import and export

Direction	Substrate	Passages /pore/min
Import	Histones	100
	Nonhistone proteins	100
	Ribosomal proteins	150
Export	Ribosomal subunits	~5
	mRNA	<1

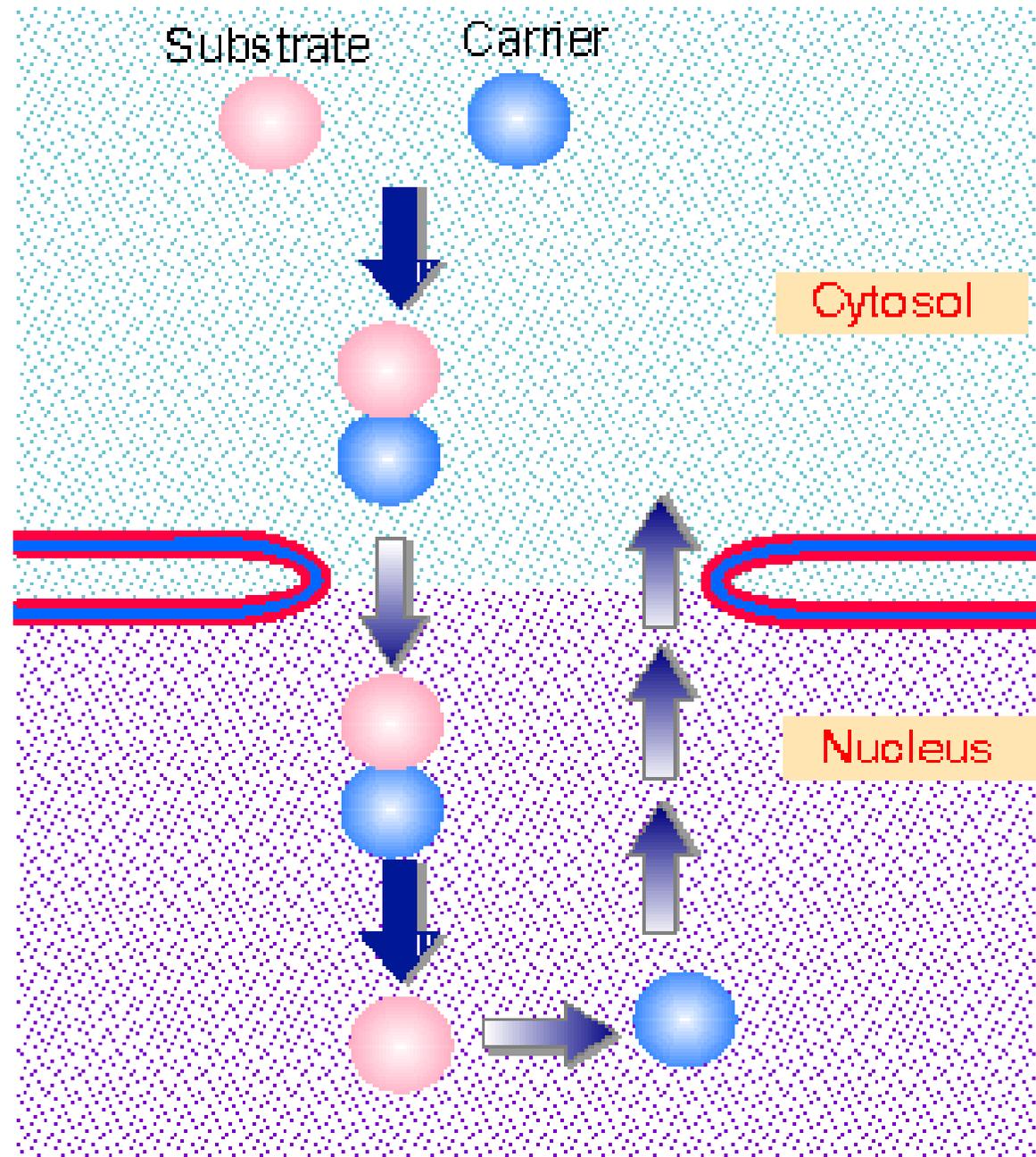
Nuclear pores are large symmetrical structures



Nuclear pores appear as annular structures (环状八重对称结构)

Transport receptors carry cargo proteins through the pore

A carrier protein binds to a substrate, moves with it through the nuclear pore, is released on the other side, and must be returned for reuse.



出核信号序列NES (nuclear export sequences)

NES: 疏水性氨基酸尤其是亮氨酸和异亮氨酸富集区域

protein	NES consensus
HIV-1 Rev	L - P P L E R L T - L
PKI	L A L K L A G L D - L
I κ B α	M V K E L Q E I R - L
COMMD1	V N Q I L K T L S E V
HSCARG (272-278)	I - - E L - T L R - L

NES consensus $\Phi X_n \Phi X_n \Phi X \Phi$
($\Phi = L, I, V, F, M, X$ is any amino acid)

CRM1依赖型: 被CRM1 (chromosome region maintenance-1)识别并结合, 从而携带蛋白出核。此种出核能被Leptomycine-B (LMB) 抑制。

SHRIKESH SACHDEV, et al., *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 1998, 2524-2534.

核定位序列 (NLS-Nuclear Localization Sequence)

- 为了核蛋白的重复定位，这些蛋白质中的信号肽——被称为核定位序列 (**NLS**)一般都不被切除。
- NLS**可以位于核蛋白的任何部位。
- 蛋白质向核内运输过程需要核运转因子 (**Importin**) α 、 β 和一个低分子量**GTP**酶 (**Ran**) 参与。

核定位信号序列NLS

•经典NLS

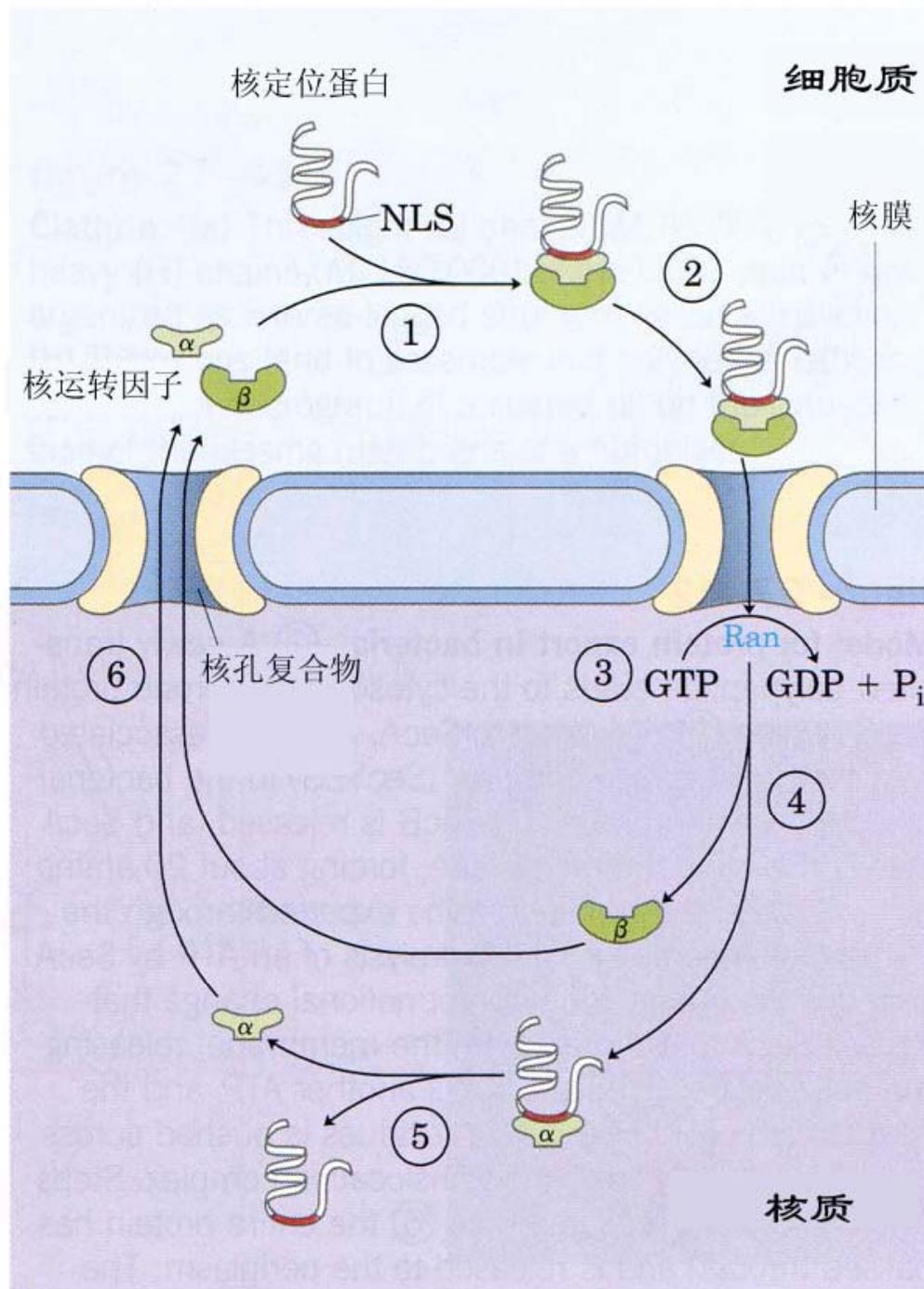
单分型: 由4~8个aa组成的富含碱性氨基酸的短肽, $K(K/R)X(K/R)$, 被入核因子识别并携带入核。如SV40-NLS ($^{126}PKKKRKV^{132}$)。

双分型: 由两簇碱性氨基酸组成, 两簇序列之间被10~12个非保守氨基酸残基间隔, $R/K(X)_{10-12}RRKK$ 。如 Nucleoplasmin: KR-10aa-KKKL¹⁷¹, P53: KR-12aa-KKK³²¹。

•非经典NLS1:

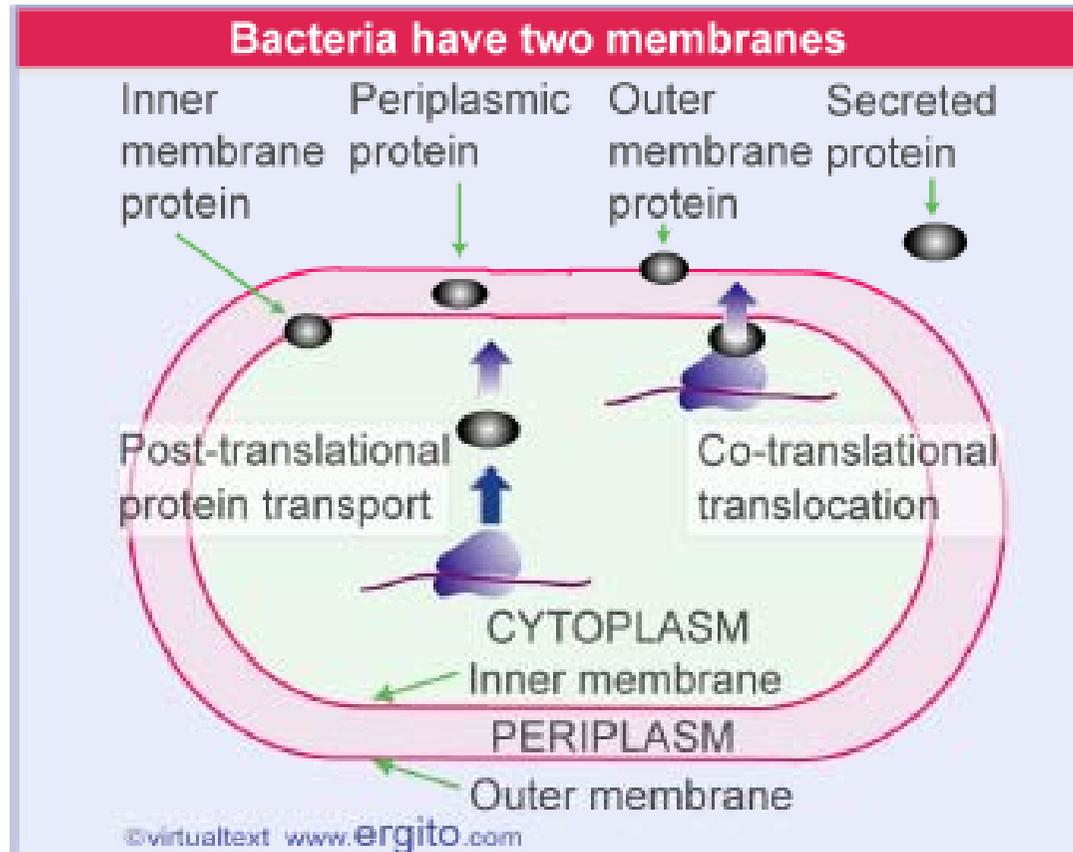
如I κ B α , 包含于第二锚蛋白重复序列上, 疏水性氨基酸。

核定位蛋白跨细胞核膜运转过程示意图



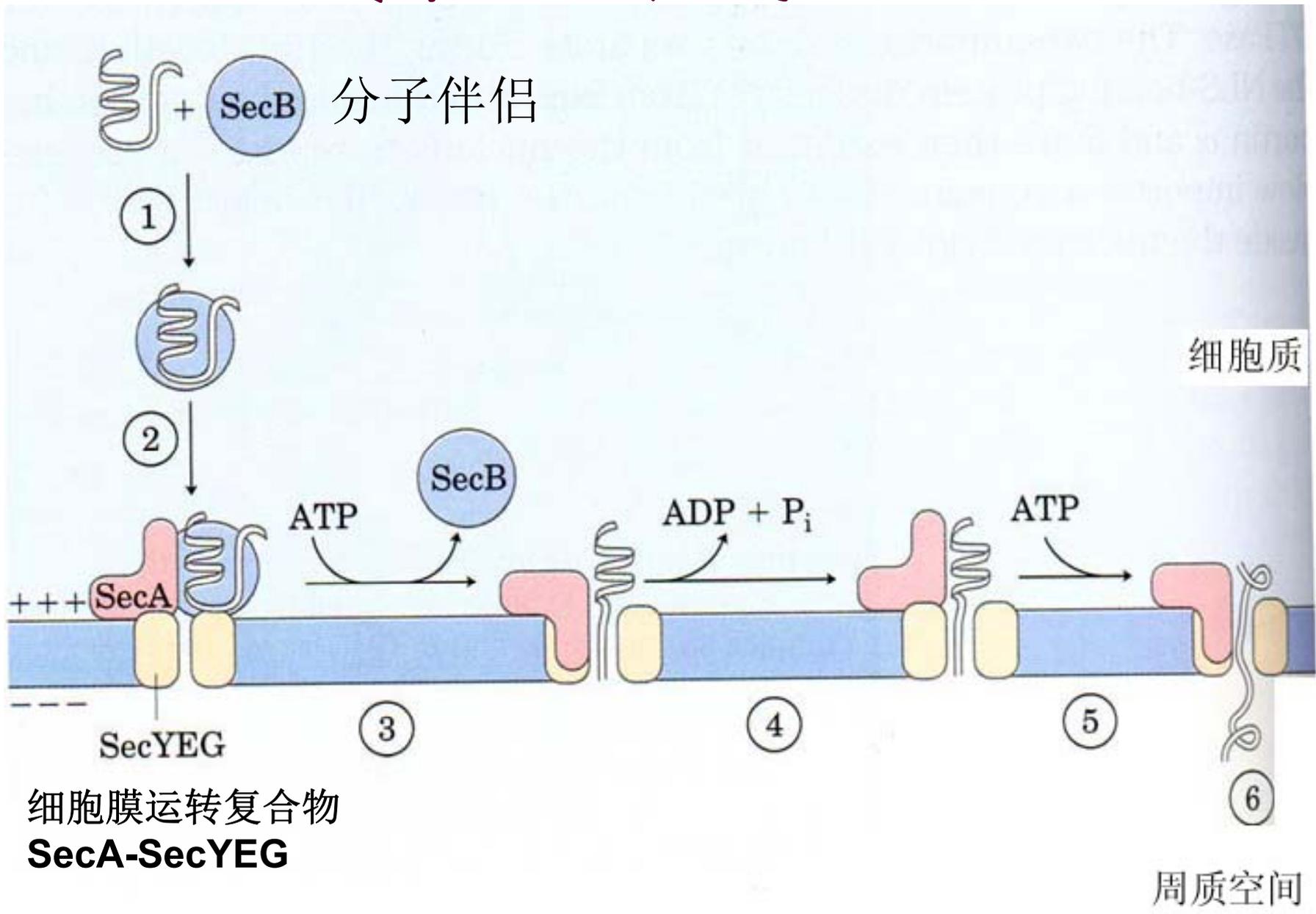
- α 和 β 组成的异源二聚体是核定位蛋白的可溶性受体，与核定位序列相结合的是 α 亚基。
- 这些蛋白组成的复合物停靠在核孔处，依靠Ran GTP酶水解GTP提供的能量进入细胞核。
- α 和 β 亚基解离，核蛋白与 α 亚基解离， α 和 β 分别通过核孔复合体回到细胞质中，起始新一轮蛋白质运转。

Bacteria use both co-translational and post-translational translocation



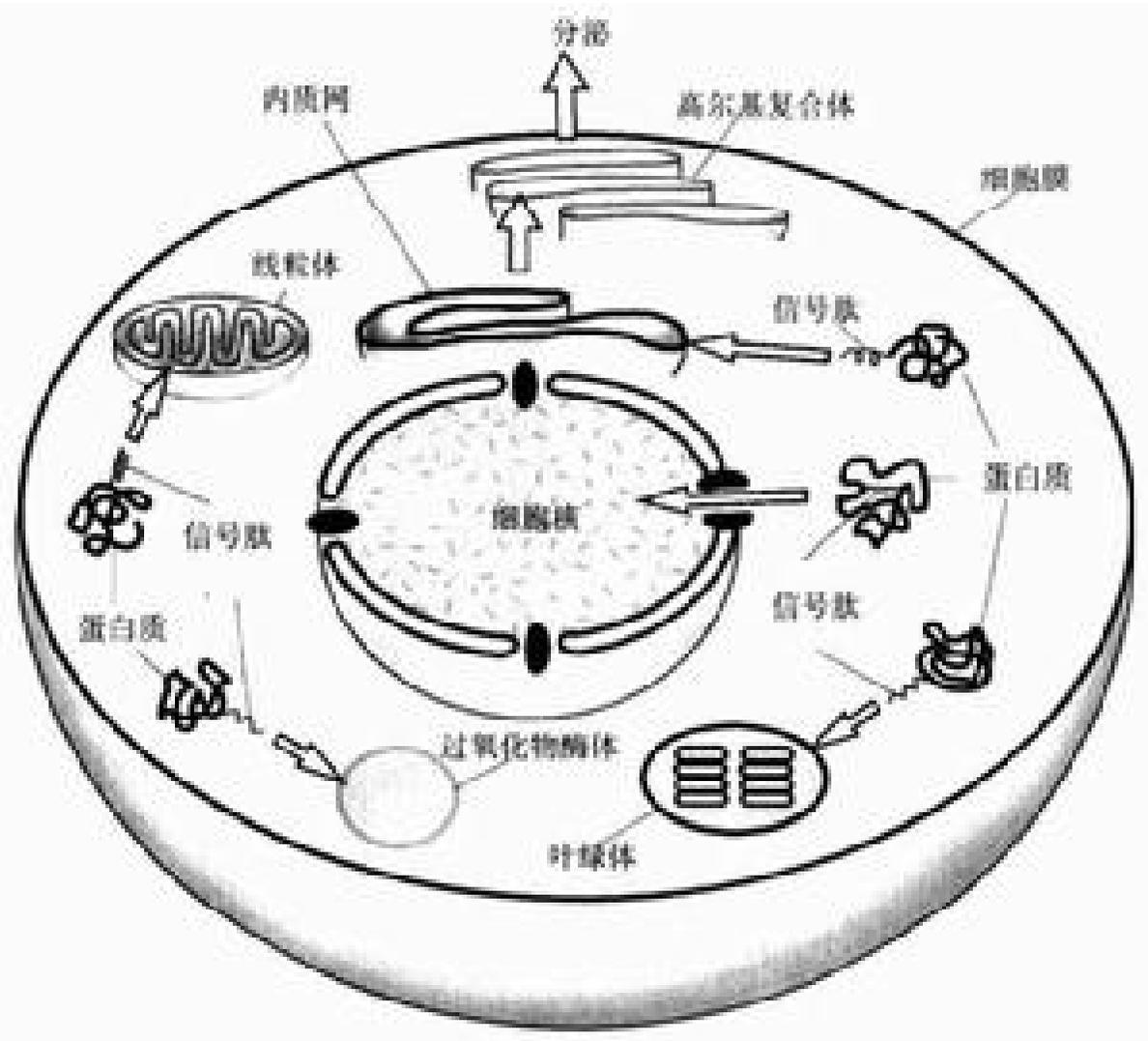
Bacterial proteins may be exported either post-translationally or co-translationally, and may be located within either membrane or the periplasmic space, or may be secreted.

细菌中蛋白质的跨膜运转



细胞膜运转复合物
SecA-SecYEG

信号肽的功能



蛋白质的降解

蛋白质降解是一个有序的过程。

2004年诺贝尔化学奖：

阿龙·切哈诺夫（以色列）

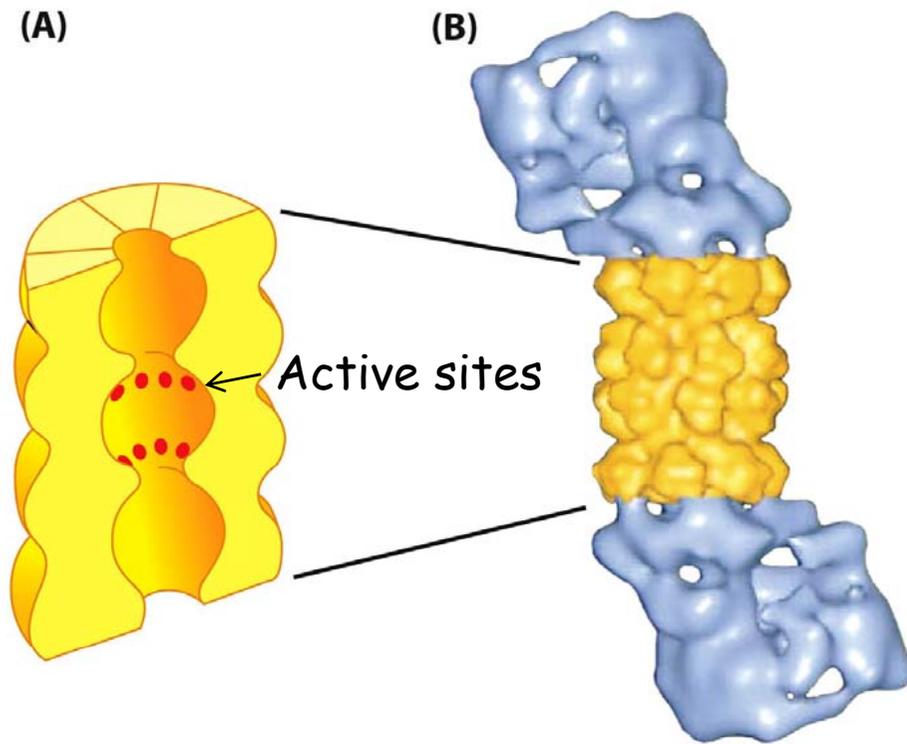
阿夫拉姆·赫尔什科（以色列）

欧文·罗斯（美）

找到了人体细胞控制和调节某种人体蛋白质数量多少的方法。他们发现，人体细胞通过给无用蛋白质“贴标签”的方法，帮助人体将那些被贴上标记的蛋白质进行“废物处理”，使它们自行破裂、自动消亡。

泛素调控的蛋白质降解具有重要的生理意义，它不仅能够清除错误蛋白质，对细胞生长周期、DNA复制以及染色体结构都有重要的调控作用，而且对于理解细胞的许多生理过程和新药的开发具有重要的意义。

精细控制的蛋白质降解协助调控细胞内 每种蛋白质的量



大多数受损蛋白质在细胞质内，
由蛋白酶体所降解。

一个蛋白酶体含有一个中心圆柱，
由活性部位面向内腔的蛋白酶形成。

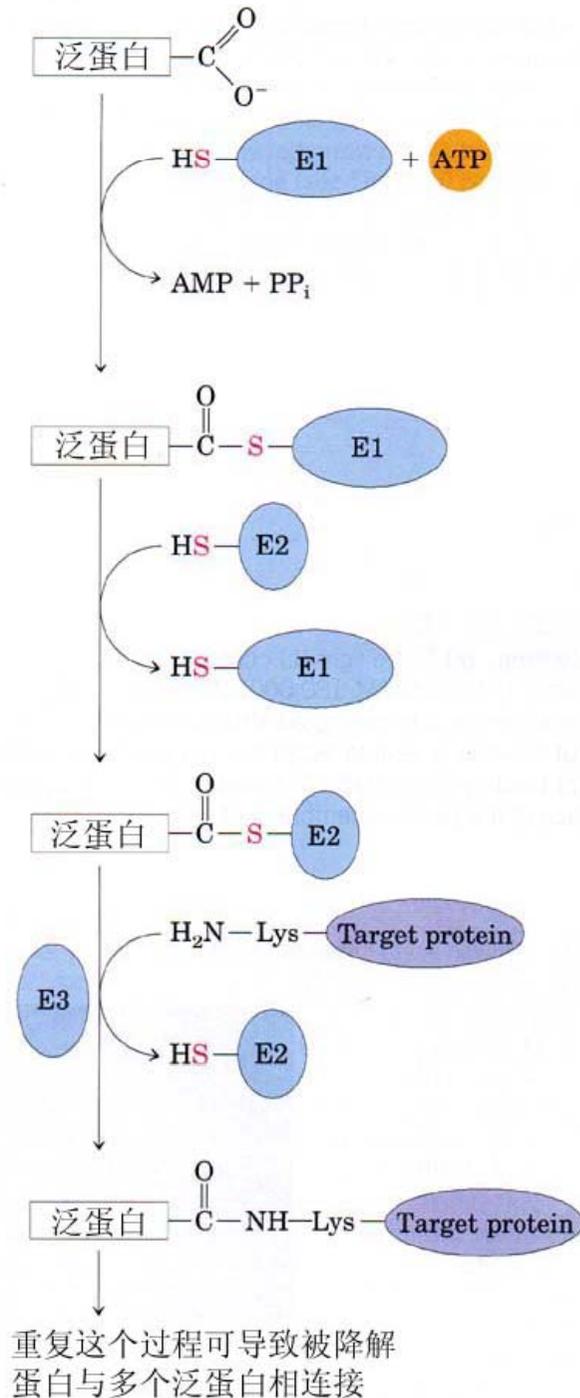
圆柱的两端各由大型蛋白质复合
物塞住。

Figure 7-39 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

蛋白酶体如何选择细胞内的哪些蛋白质应进入圆柱并被降解？

泛素标记被降解的蛋白质

- 将要被去除的蛋白质通过与被称为**泛素**的小蛋白共价结合而被标记，蛋白酶体作用于被标记的蛋白质。
- 在大肠杆菌中，许多蛋白质的降解是通过一个依赖于**ATP**的蛋白酶(称为**Lon**)来实现的。
- 当细胞中存在有错误或半衰期很短的蛋白质时，该蛋白酶就被激活。
- 每切除一个肽键要消耗两个分子**ATP**。



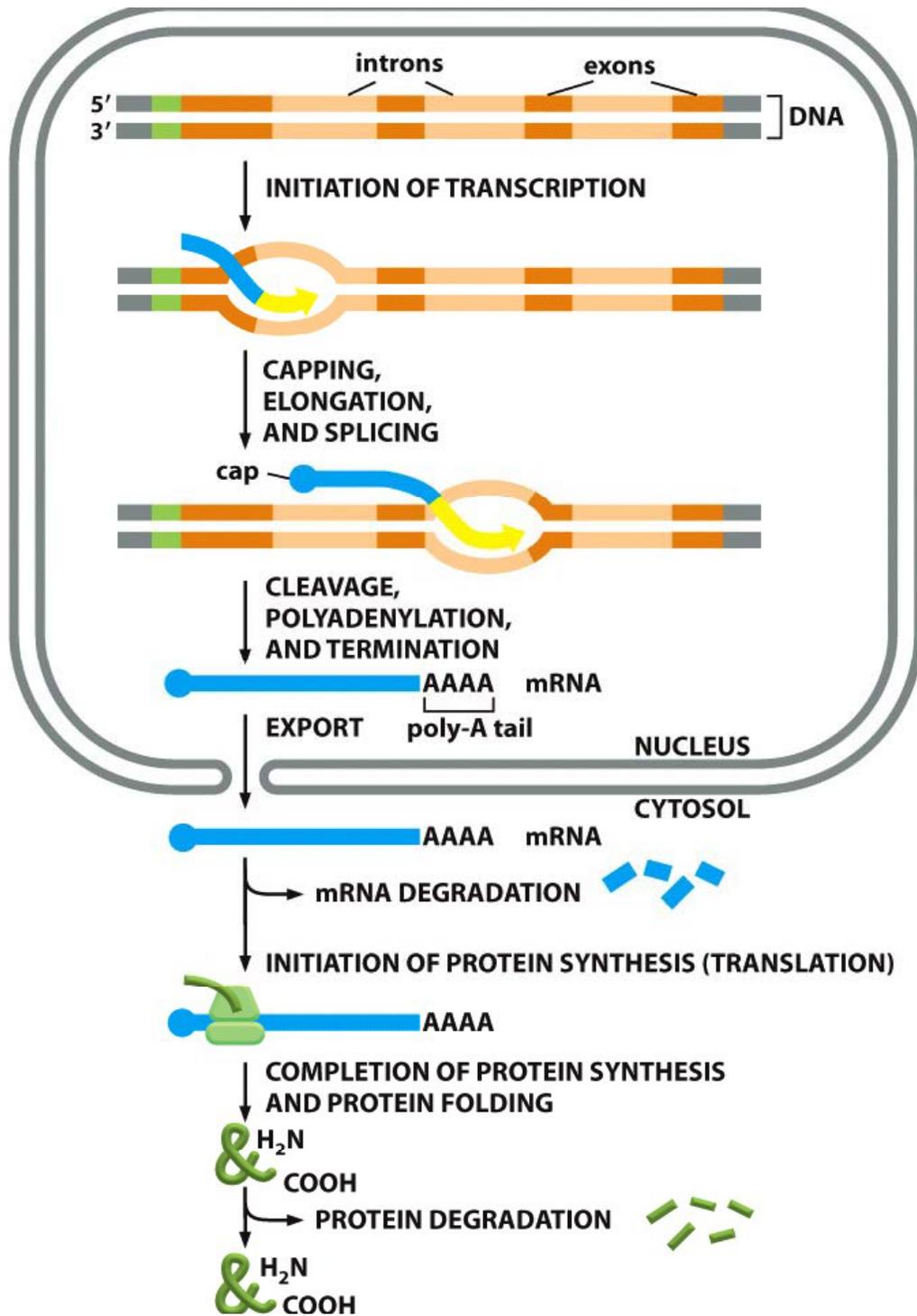
- 真核蛋白的降解依赖于一个只有**76**个氨基酸残基、其序列高度保守的**泛素(Ubiquitin)**。

- 细胞内即将被降解的蛋白首先在**ATP**的作用下与泛素相连（需要**E1(连接泛素)**，**E2(负责将泛素从E1转移到底物)**，**E3(结合底物蛋白)**三个降解因子的参与），并将该复合体运送到特定的蛋白降解体系(**蛋白酶体**)中直到完全降解。

- 成熟蛋白**N-端**的第一个氨基酸（除已被切除的**N**端甲硫氨酸之外，但包括翻译后修饰产物）在蛋白的降解中有着举足轻重的影响。
- 当某个蛋白质的**N**端是甲硫氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和缬氨酸时，表现稳定。
- 其**N**端为赖氨酸、精氨酸时，表现最不稳定，平均**2-3**分钟就被降解了。

蛋白质的半衰期与N-端氨基酸残基的关系

N-端残基	半衰期
稳定型残基	
甲硫氨酸、甘氨酸、丙氨酸、 丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸	>20h
不稳定型残基	
异亮氨酸、谷氨酰胺	~30min
酪氨酸、谷氨酸	~10min
脯氨酸	~7min
亮氨酸、苯丙氨酸、 天门冬酰胺、赖氨酸	~3min
精氨酸	~2min



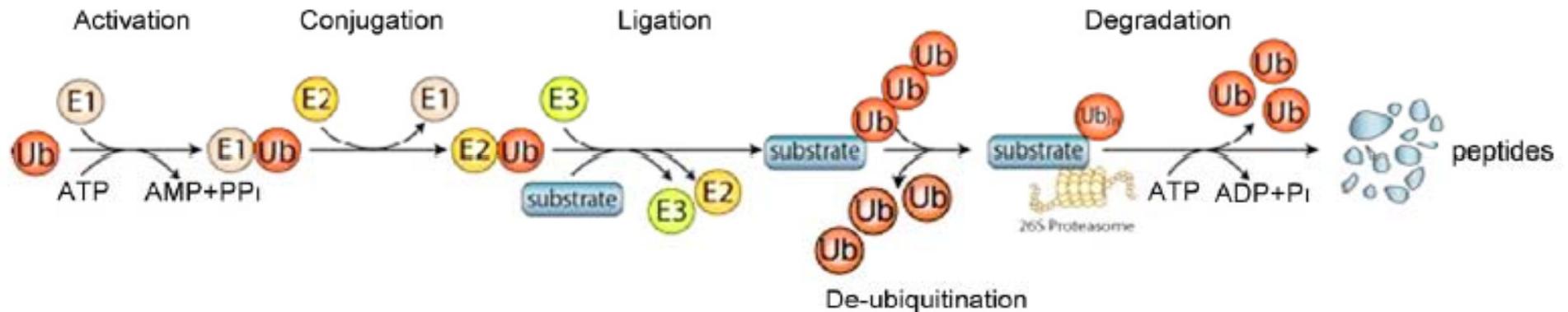
从DNA到蛋白质的产生需要很多步骤

泛素化

Ubiquitylation

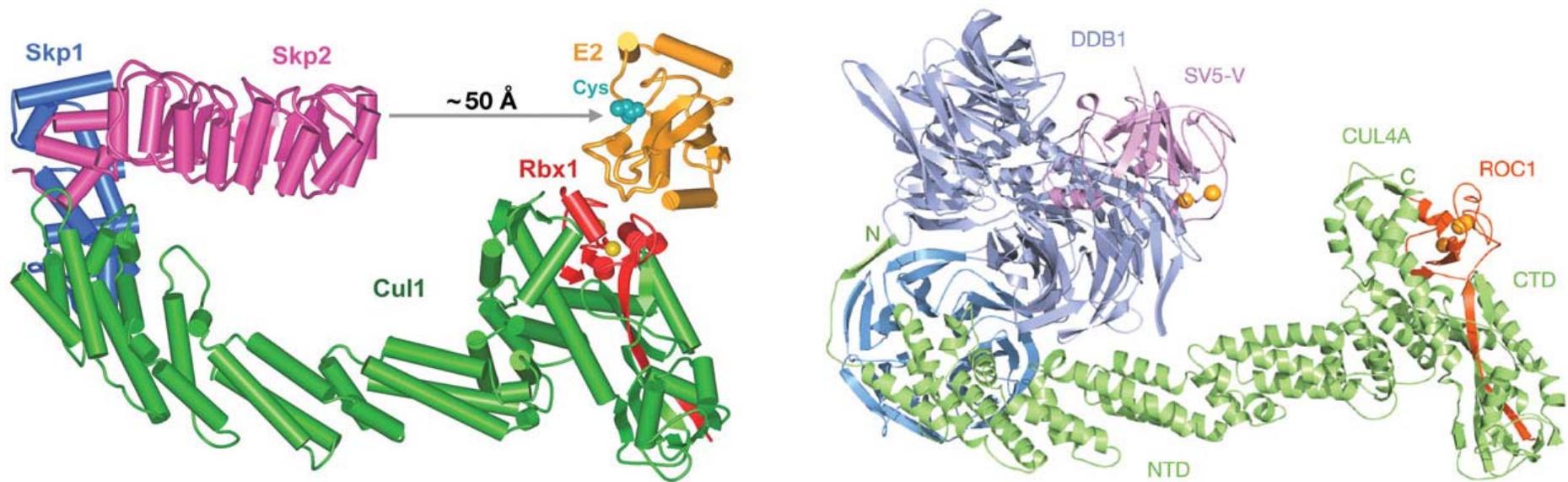
- Ubiquitylation is the covalent attachment of ubiquitin to the ϵ -amino group of **lysines** via isopeptide bonds(异肽键).
- Polymeric ubiquitin chains usually target proteins for proteasomal degradation, whereas monoubiquitylation can control various functions.
- A hierarchical cascade connecting an activating enzyme (E1) with several conjugating enzymes (E2) and protein ligases (E3) mediates ubiquitin transfer to a protein.

Enzymes and reactions of the ubiquitin/proteasome system.



- The E1 catalyzes the formation of a ubiquitin thiol ester(硫醇酯) in an ATP-dependent reaction.
- The thiol-linked ubiquitin can then be transferred to an E2 in the conjugation reaction.
- The ligation reaction is promoted by ubiquitin ligases, or E3 proteins.
- Ubiquitination may be reversed by de-ubiquitinases (DUBs).

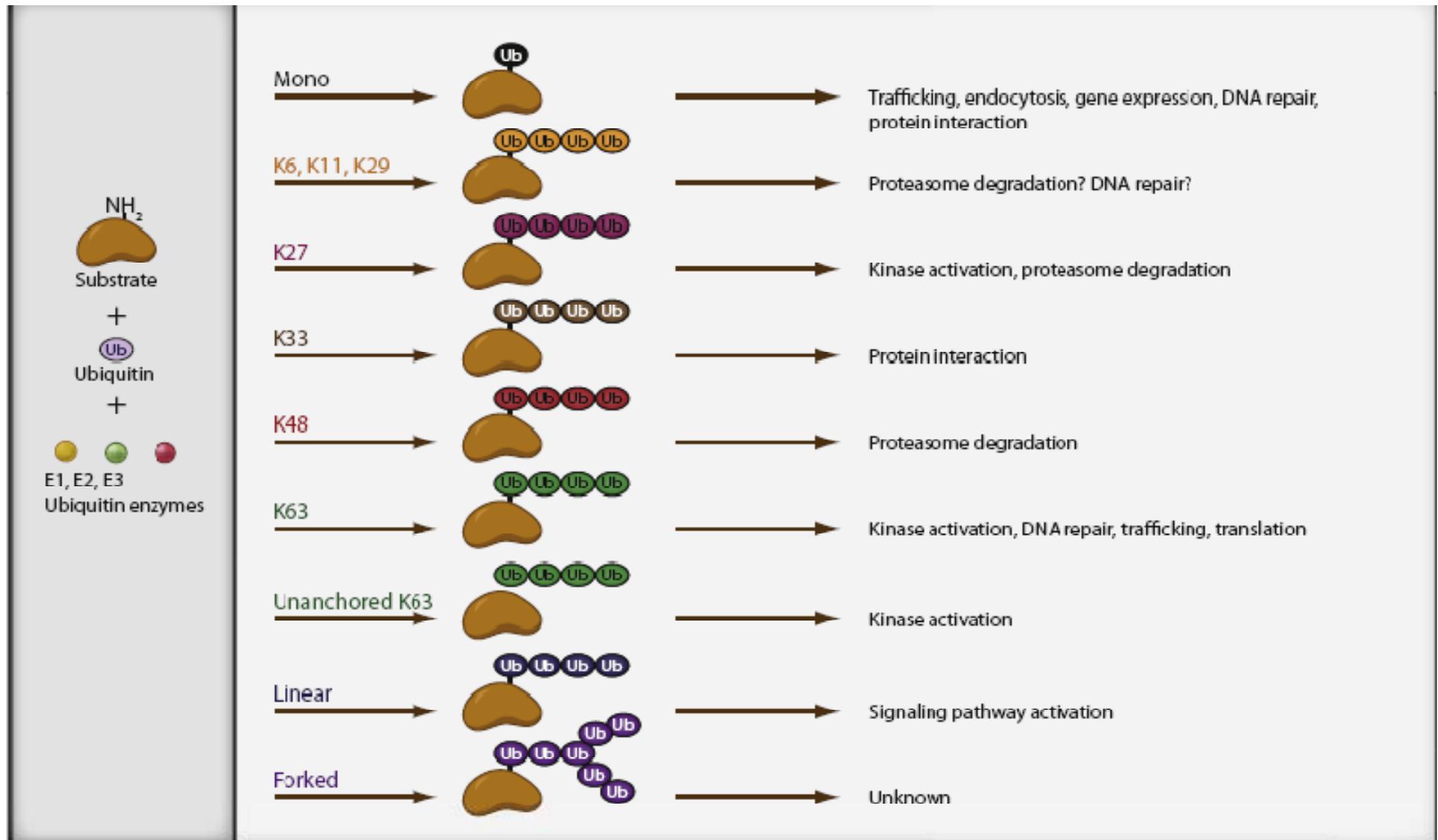
The crystal structures of E3 ligase and the complex of E3 ligase with its substrate



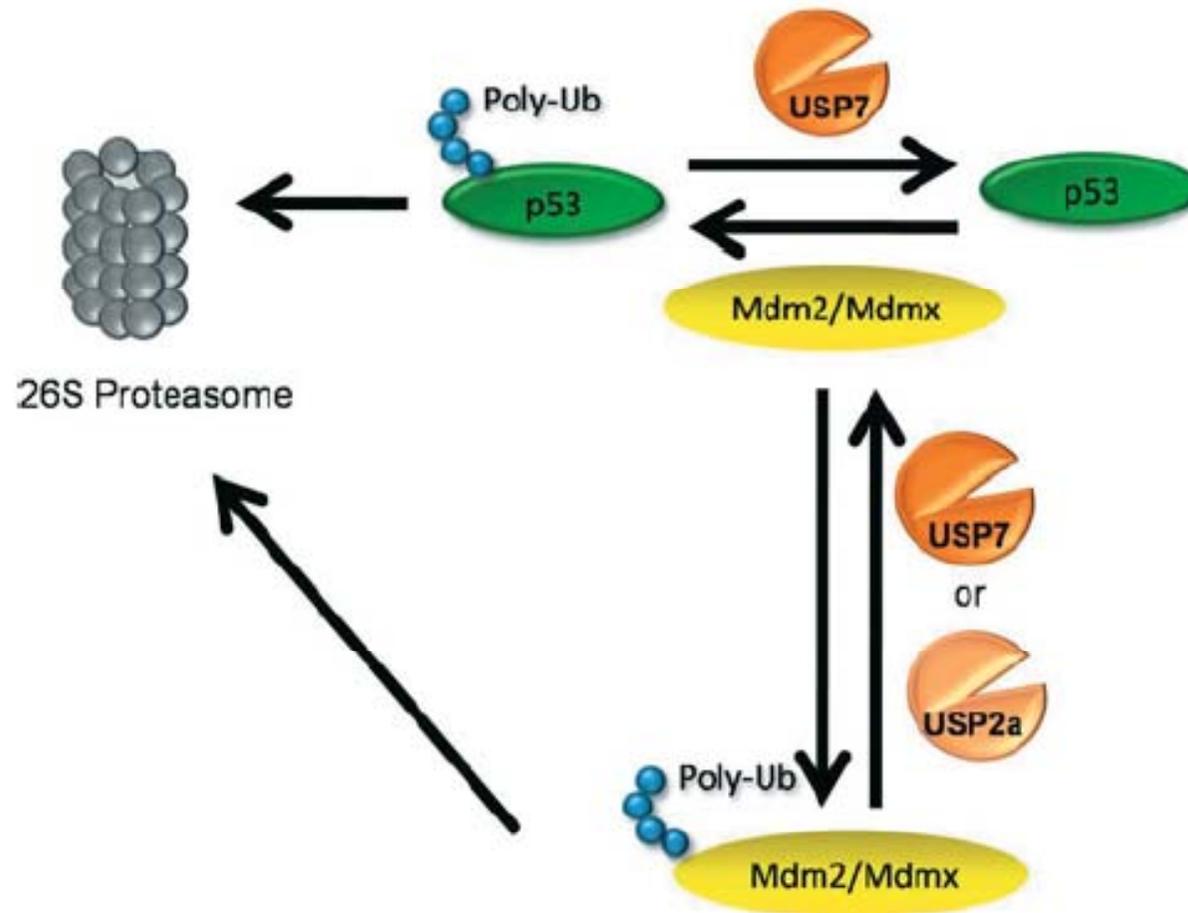
SCFSkp2-E2复合物的结构。
Zheng, *et al.*, *Nature*, 2002,
416:708.)

DDB1-CUL4A-ROC1泛素连接酶与猴病毒
5的V蛋白复合物的晶体结构。
Angers, *et al.*, *Nature*, 2006, 443:590.

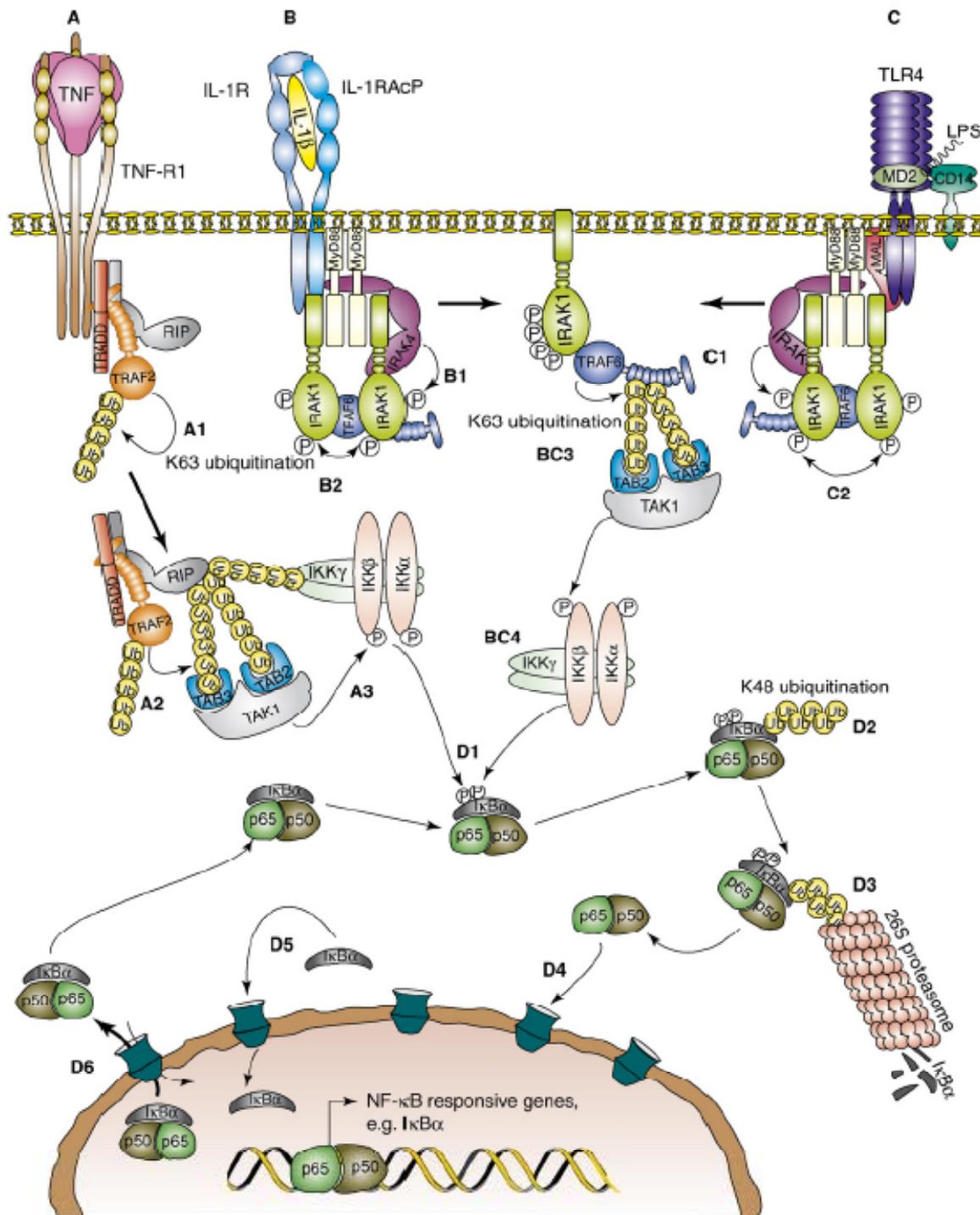
A Diverse Array of Ubiquitin Chain Linkages Can Lead to Different Outcomes for the Substrate Protein and Result in Different Cellular Responses



The regulation of p53 by the ubiquitin system illustrates the complex interplay between DUBs and E3 ligases



By regulating p53 levels through their deubiquitinating activities, USP7 and USP2a may contribute to cancer pathogenesis. Therapeutic strategies that target these p53-specific DUBs are becoming important as cancer treatments.

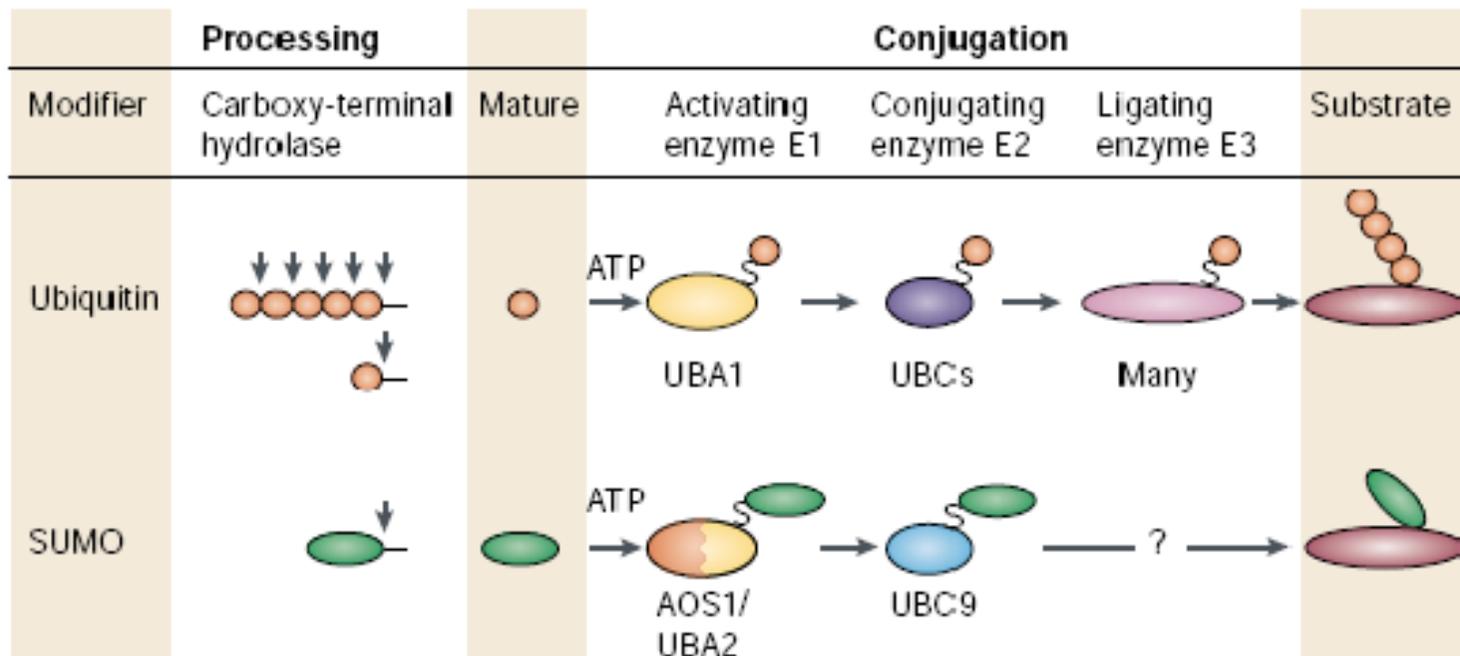


**TNF-receptor-1
and TLR4-IL-1-
receptor-induced
signaling pathways
towards NF-κB
activation**

小泛素相关修饰物修饰-类泛素化修饰 (Sumoylation)

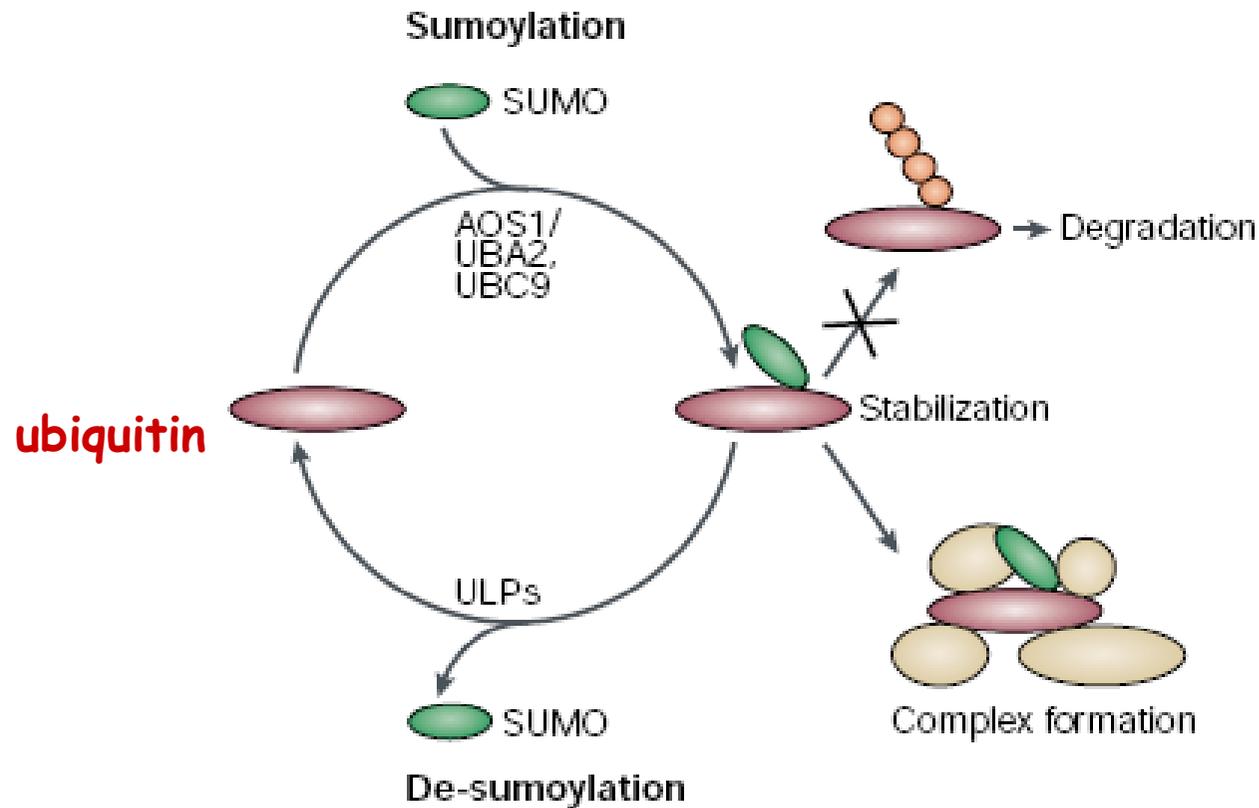
- **SUMO (small ubiquitin-like modifier)** modification is the covalent attachment of SUMO to lysine residues usually located within or near the consensus sequence ψ -K-x-E (where ψ , hydrophobic; x, any amino acid residue; K, lysine; E, glutamic acid).
- Although analogous to ubiquitin in biochemistry, the molecular role of SUMO conjugation is usually **not the induction of protein degradation**.
- Sumoylation rather **alters protein interactions, protein localization and transport**.
- **Four different SUMO proteins** have been discovered to date which are referred to as SUMO1-4. A hierarchical cascade connects the E1 activating enzyme AOS1-UBA2 with the E2 SUMO conjugase Ubc9, which catalyses the transfer of SUMO to a protein. E3 ligases enhance sumoylation in a more or less substrate-specific manner.

小泛素相关修饰物修饰 (Sumoylation)



Ubiquitin and SUMO are synthesized as precursors and processed carboxy-terminally by hydrolases (vertical arrows) and are subsequently conjugated to proteins involving activating (E1) and conjugating (E2) enzymes that form thioesters (S) with the modifiers.

Reversible modification of proteins by SUMO and its consequences



- Sumoylation either prevents ubiquitylation followed by degradation or results in the formation of protein complexes.
- Sumoylation requires AOS1/UBA2 and UBC9 enzymes;
- de-sumoylation is catalyzed by members of the ULP family.

SUMO化修饰的生物学功能

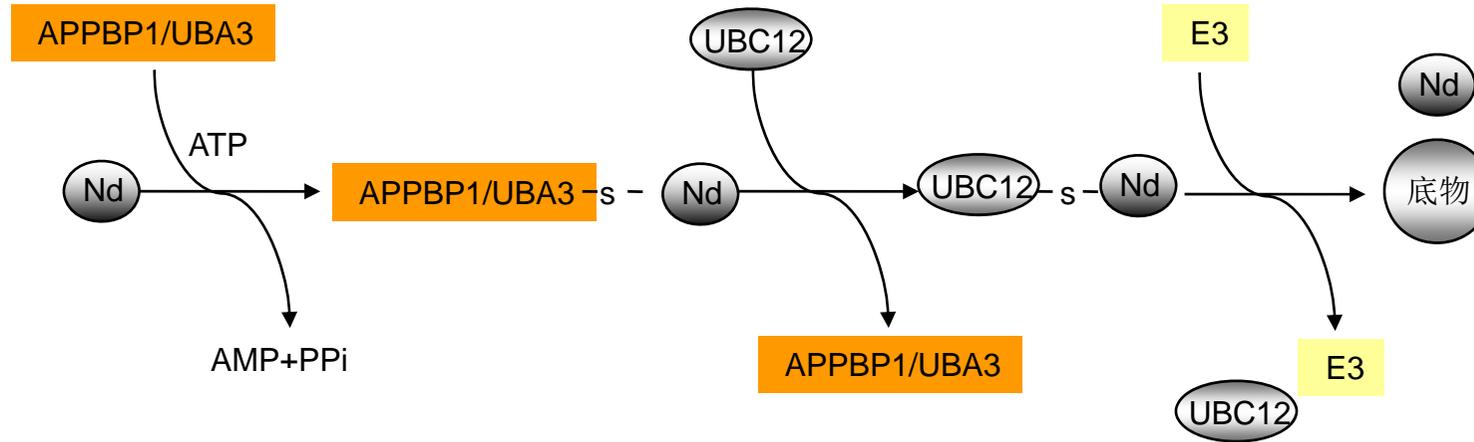
修饰许多在基因表达调控中其重要作用的蛋白：转录因子，转录辅助因子和调控染色质结构的因子。

(1) 影响蛋白的亚细胞定位

(2) 参与细胞内多条代谢途径

蛋白质与蛋白质相互作用、**DNA**结合、信号转导、核质运输、转录因子激活等

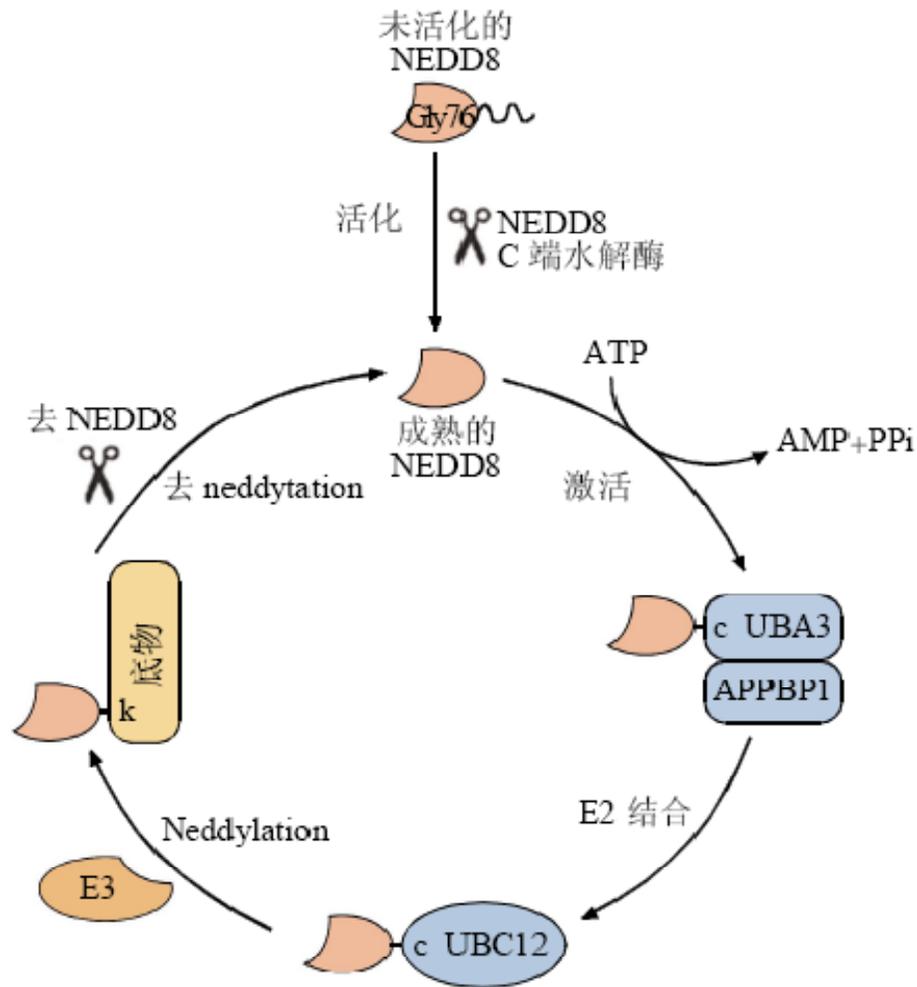
类泛素化修饰 Neddylation



•NEDD8 (neural precursor cell-expressed developmentally downregulated 8) 分子是一类结构上与泛素相似的分子，有81aa，参与蛋白质翻译后修饰，这一过程被称为**Neddylation**.

•**Neddylation** 的发生机制与泛素化相似，需要**E1、E2、E3** 介导的一系列酶促反应.

类泛素化修饰 Neddylation



Neddylation 的通路

• **Neddylation** 是一个可逆的修饰过程，分别在类泛素化 E3 连接酶和去 Neddylation 美的作用下完成。

Progress in Biochemistry and Biophysics
2009, 36(9): 1089~1094

Proteins reported to be neddylated

Neddylation 底物	Neddylation 位点	Neddylation 连接酶	Deneddylation 酶	Neddylation 的生物学效应	参考文献
Cullins 和其相关蛋白 Parc 和 Cul7(内源)	C 端保守的 Lys	Rbx1, Dcn1	COP9 signalosome (CSN)(内源)	促进构象改变, 抑制 Cullin 与它的抑制因子 CAND1 的相互作用, 激 活泛素 E3 的活性	[28, 29, 31, 37]
p53(内源)	Lys370, Lys372, Lys373	Mdm2 和 SCF ^{FBXO11}	NEDP1(内源或 体外过表达)	抑制 p53 的转录因子活性	[33]
p73(内源)		Mdm2	NEDP1(内源或 体外过表达)	抑制 p73 的转录因子活性	[32]
Mdm2(内源)		Mdm2			[33]
pVHL(内源)	Lys159			抑制 pVHL 与 CUL2 复合 体相互作用	[38, 39]
BCA3(内源)	多个 Lys		NEDP1(内源)	促进 BCA3 与 SIRT1 的 相互作用, 抑制 NF- κ B 的 转录活性	[35]
EGFR(内源)	多个 Lys	C-cbl		激活 EGFR 的泛素化, 下 调 EGFR 蛋白水平	[40]
AICD(体外过表达)	多个 Lys			抑制 AICD 与转录因子 Fe65 的相互作用, 以及复 合物的转录活性	[36]
L11 和其他核糖体蛋 白(体外过表达)			NEDP1(内源, 外源, 体外过表达)	增强核糖体蛋白的稳定性	[34]

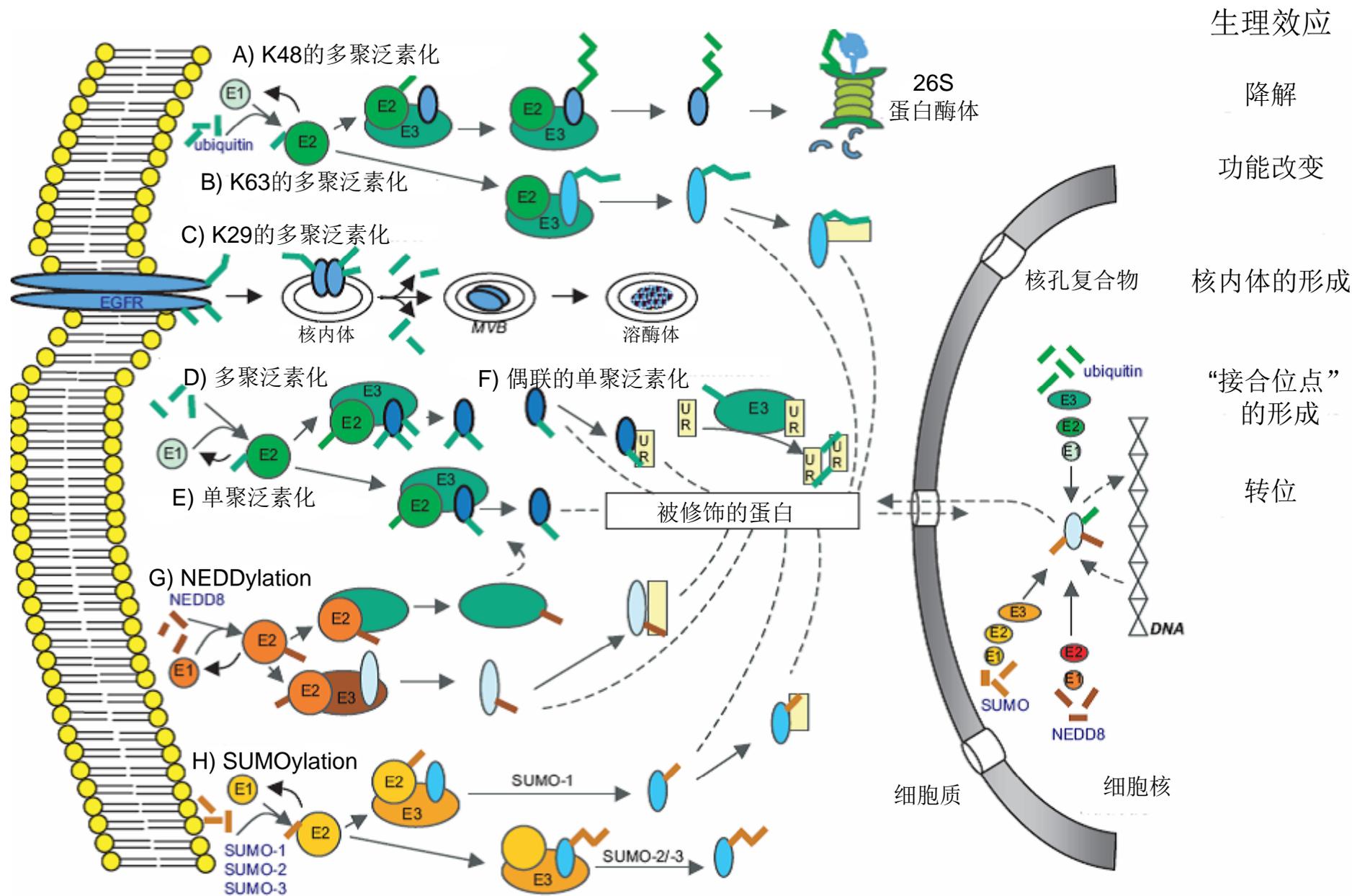
Neddylation的生物学功能

- 与泛素化不同, **Neddylation** 修饰的蛋白质不像泛素化的蛋白质那样能被蛋白质酶体降解影响底物蛋白的稳定性, 而是仅作为一种活化信号.
- **Neddylation** 修饰的功能主要体现在:
 - (1) 调节蛋白质之间的相互作用
 - (2) 调节转录因子的活性 (**Mdm2, p53**等)
 - (3) 拮抗泛素化等.

NEDDylation修饰研究展望

- **Neddylaton** 的**E2** 酶只发现了一种**UBC12**，而泛素化有多种**E2** 酶，**Neddylaton** 是否还有其他的**E2**？
- **NEDD8** 与泛素高度同源，已知的**NEDD8** 的**E3**酶只有几个，并且目前发现的**E3** 只对部分底物蛋白是必需的，已知的能被**NEDD8** 修饰的蛋白质也比被泛素修饰的蛋白质少得多，更多的**Neddylaton** 修饰相关的**E3** 连接酶？
- **NEDD8** 参与的**Neddylaton**的过程关键位点是赖氨酸残基，该残基同时也可以发生乙酰化、甲基化和泛素化，这些翻译后修饰的动态平衡与交互关系？

蛋白质泛素化和类泛素化修饰的生理效应



思考题

1. 遗传密码是怎样被破译的？
2. 遗传密码有那些特性？简述密码的简并性生物体的生物学意义。
3. 有几种终止密码子？它们的序列和别名是什么？
4. **tRNA**在组成和结构上有哪些特点？
5. 简述摆动学说。
6. **tRNA**是如何转运活化的氨基酸质**mRNA**模板上的？
7. 原核与真核的核糖体组成有哪些异同点？
8. 什么是**SD**序列？其功能是什么？
9. 核糖体有哪些活性中心？
10. 真核生物与原核生物在翻译的起始过程中有哪些区别？
11. 链霉素为什么能够抑制蛋白质的合成？
12. 哪些种类抗生素只能特异性地作用于原核生物核糖体？哪些只作用于真核生物核糖体？哪些既能抑制原核生物核糖体，也能抑制真核生物核糖体？
13. 什么是分子伴侣？有哪些重要功能？
14. 什么是信号肽？它在序列组成上有哪些特点？有什么功能？
15. 简述叶绿体蛋白质的跨膜运转机制。
16. 蛋白质有哪些翻译后的加工修饰？其作用机制和生物学功能是什么？
17. 什么是核定位信号序列？其主要功能是什么？
18. 什么是出核信号序列？其序列组成由哪些特点？主要功能是什么？

谢谢!

预祝大家期中取得好成绩!

