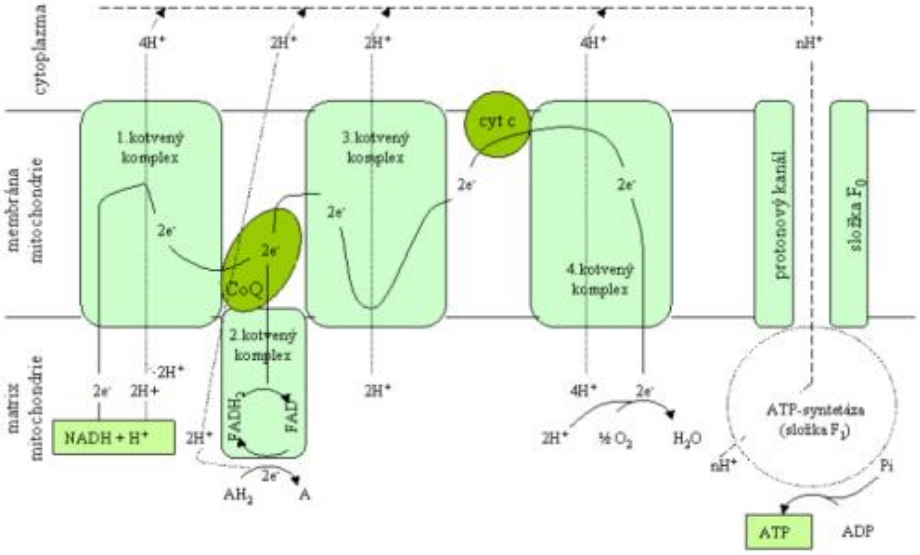
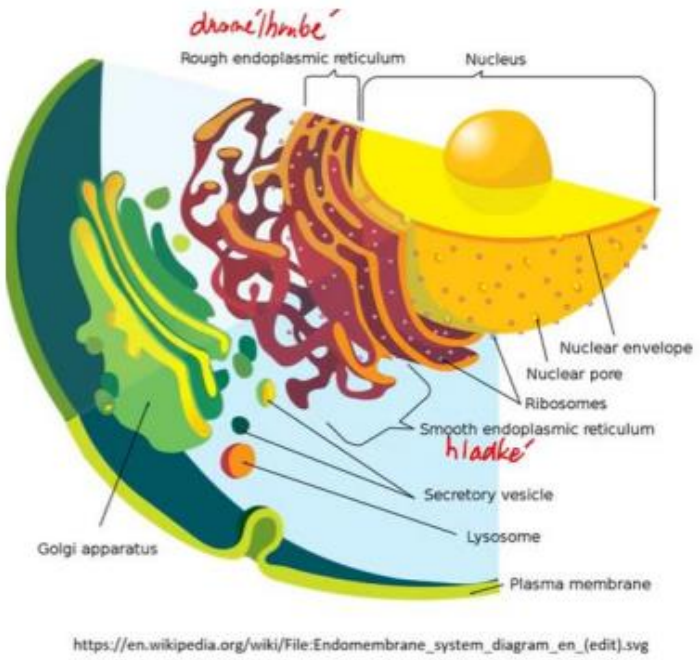
17.10. a 5.12. 2022

# ORGANELY (2.přednáška)



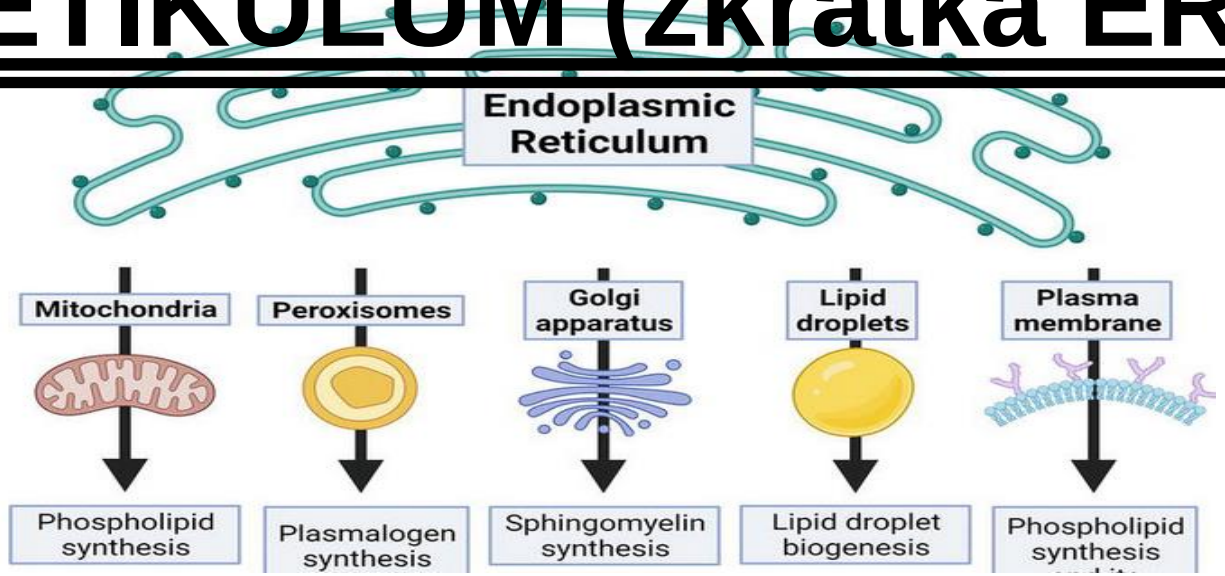

Obr 1. Dýchací řetězec




https://en.wikipedia.org/wiki/File:Endomembrane_system_diagram_en_(edit).svg

Mgr. Josef Skopalík, Ph.D.

# ENDOPLASMATICKÉ RETIKULUM (zkratka ER)




- **Endoplasmatické retikulum má funkci:**

**FUNKCE 1) Syntéze proteinů („tovární jednotky“ ribosomy jsou na povrhu ER, ale mohou být i volně v cytoplazmě)**

**FUNKCE 2) Syntéza lipidů**

**FUNKCE 3) Úprava hormonů, kumulace a signální uvolňování Ca2+ do cytoplasmy**

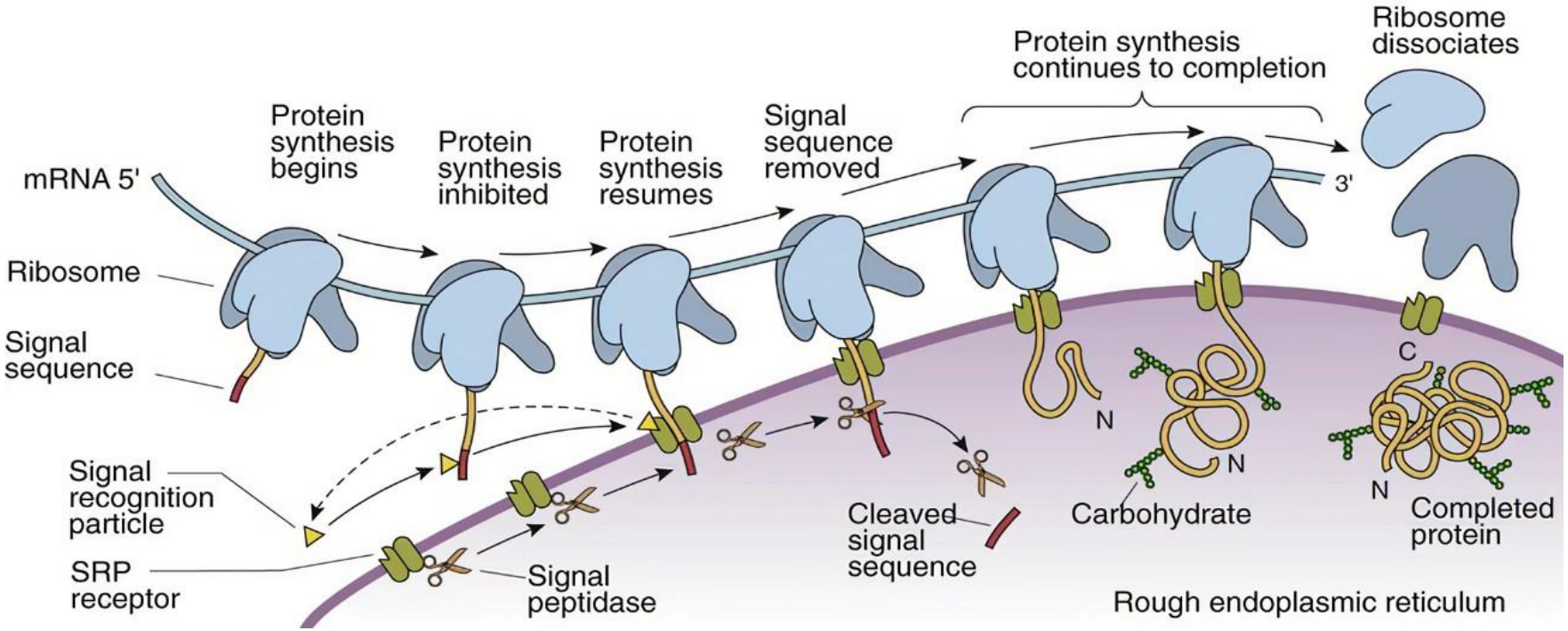
**FUNKCE 4) Obsahují detoxifikační enzymy (specificky hlavně v jaterních buňkách)**

**FUNKCE 5) Participace na odstartování buněčné smrti**

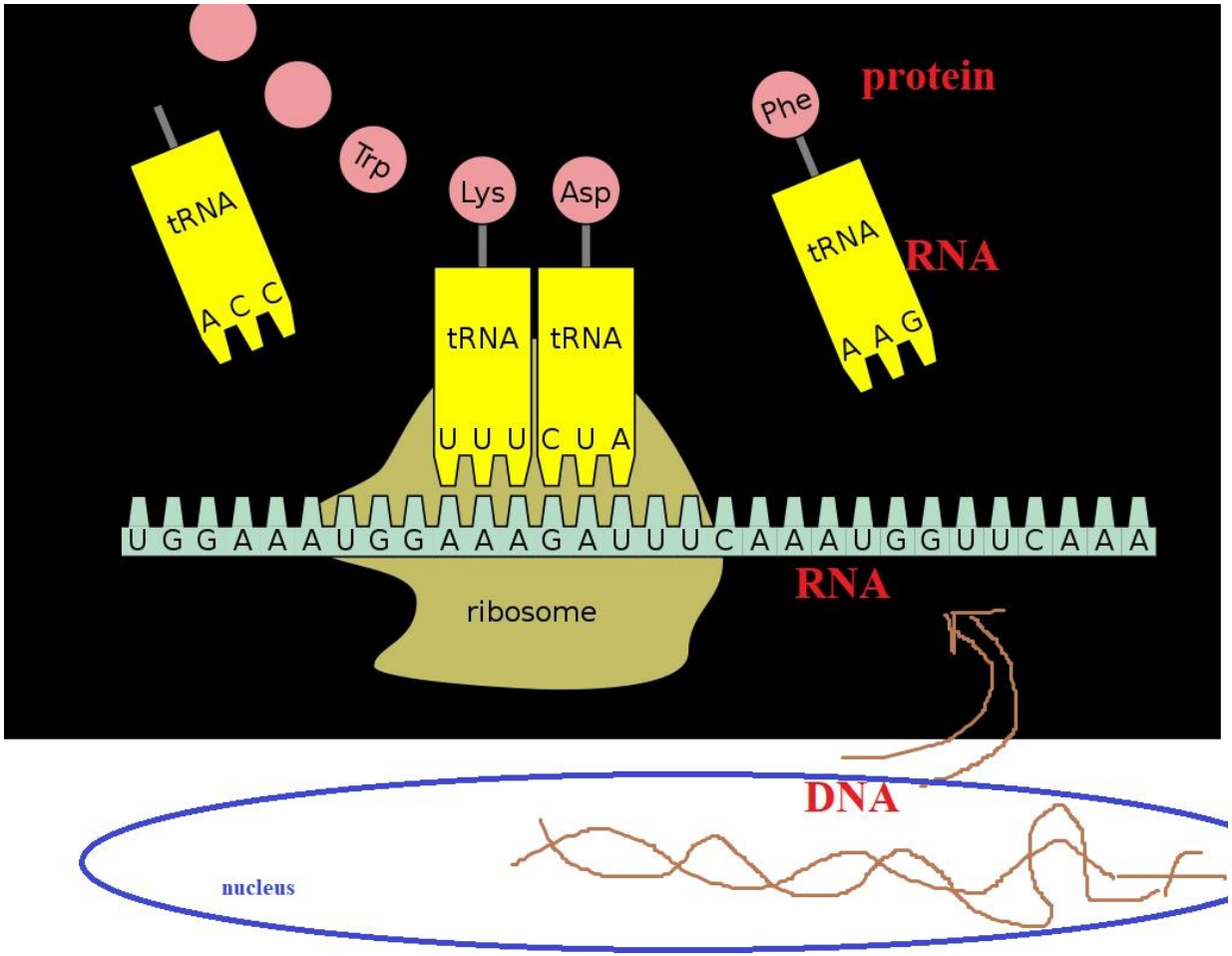
Popis metabolismu a kinetiky ER není stále dokonale známý. Řada odborných prací stále dopřesňuje, jak přesně se syntetizované proteiny i jiné molekuly „KONTROLUJÍ“ a EXPORTUJI ven z ER a jak ER transportuje materiál do ostatních organel a případně ven z buňky.

# FUNKCE 1 – syntéza proteinů

- V drsném ER dochází k výrobě (translaci) mnoha proteinů (bílkovin).
- Konrétně pomoci tzv RIBOZOMů



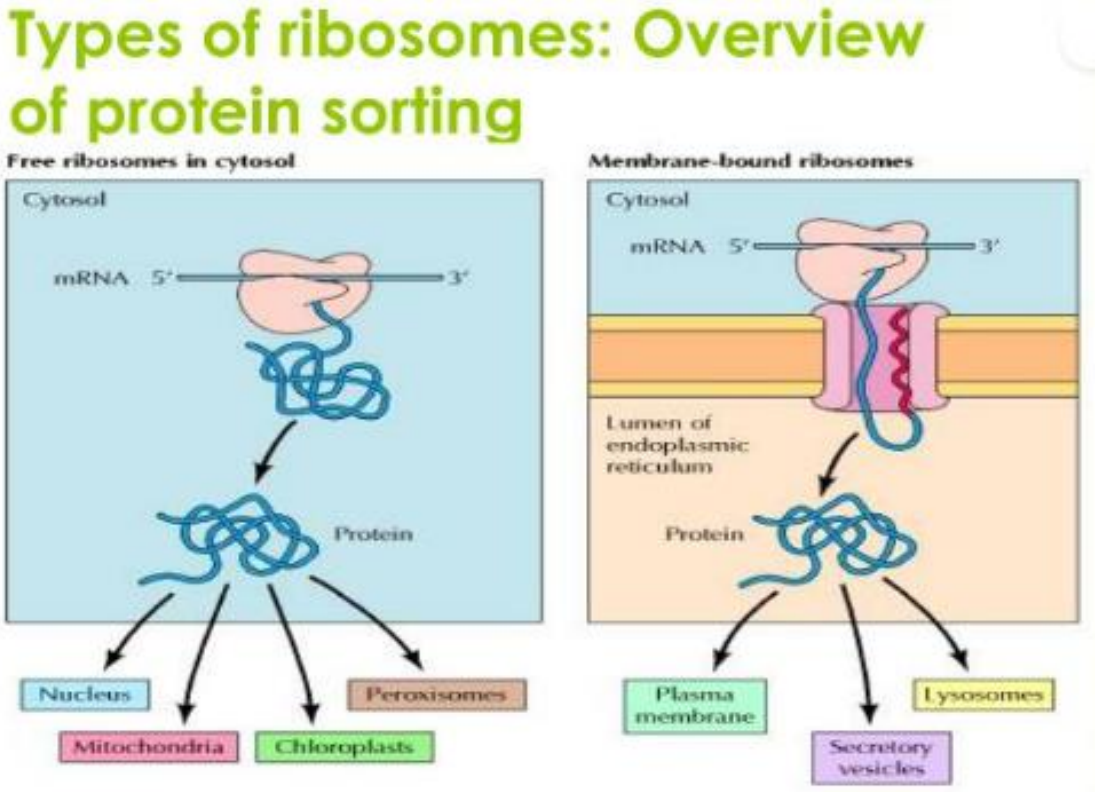
mRNA přinese informaci podle které se sestavuje protein! (na kód ze 3 nukleoových kyseliny vždy připadá určitá aminokyselina tvořící protein)



Ribozomy jsou ale dvojího druhu !

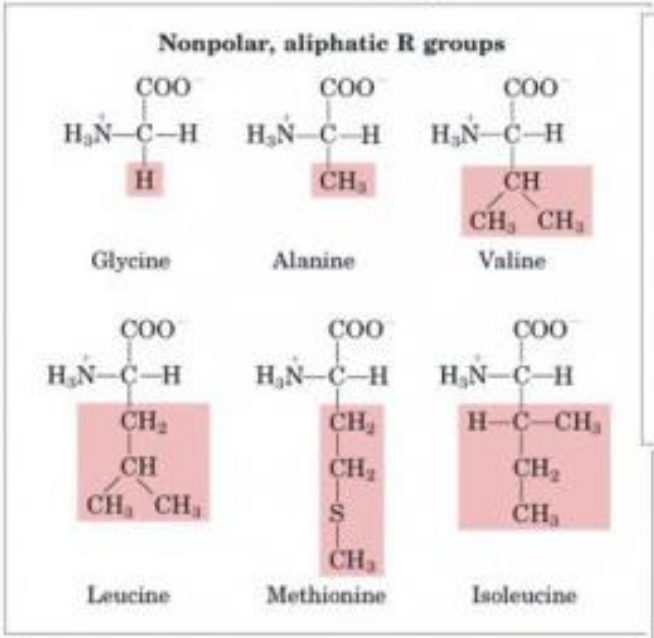
- první upnuté na povrch ER
- Druhé volné mimo ER (v cytoplazmě)

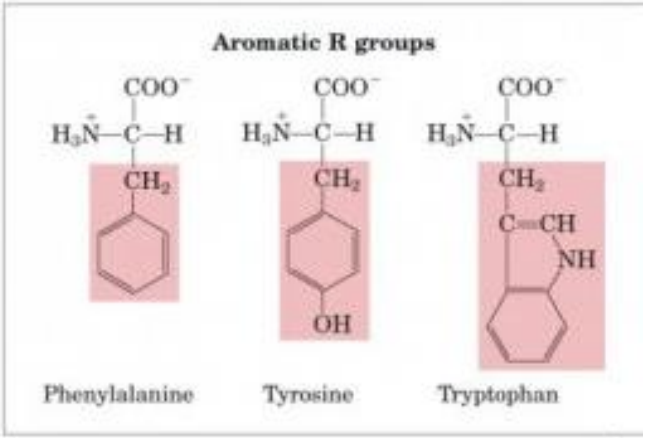
(každý vyrábí protein pro jiné cílové destinace)

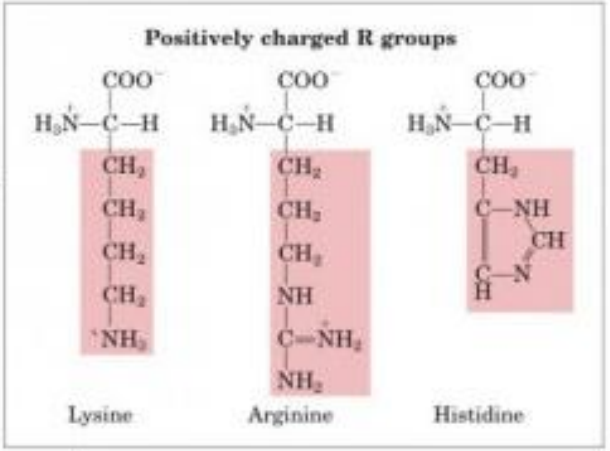


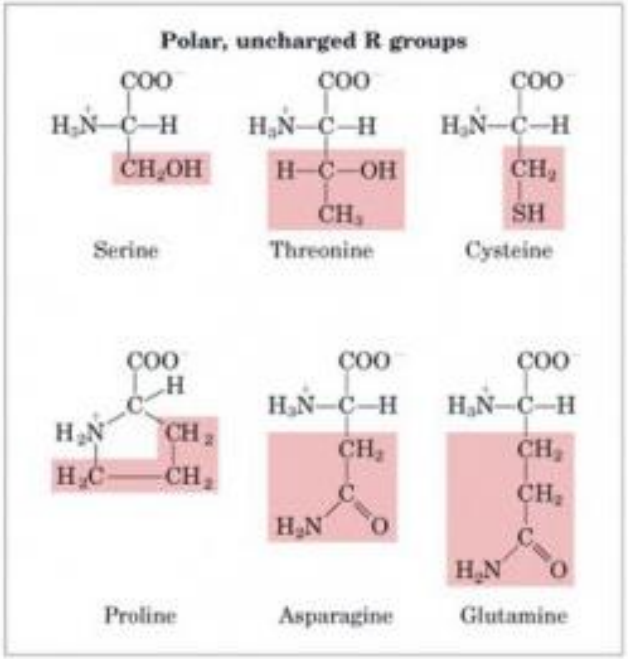
Pozn. bokem (z biochemie) **stavební kameny proteinů jsou aminokyseliny**, 20 standartních, které lze dělit do 5 skupin

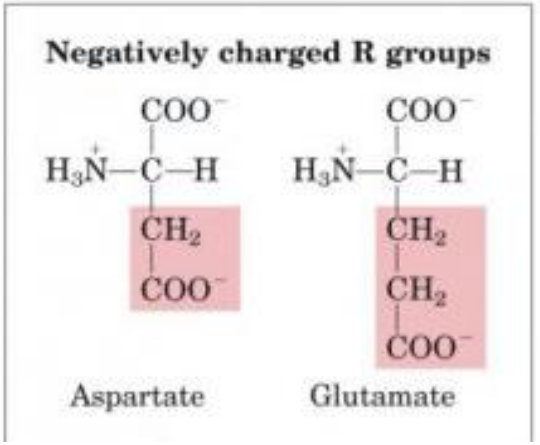
Minimálně znát alespoň dva typické zástupce každé skupiny (názvem i vzorcem). Ideálně všechny, shodne se do budoucna.



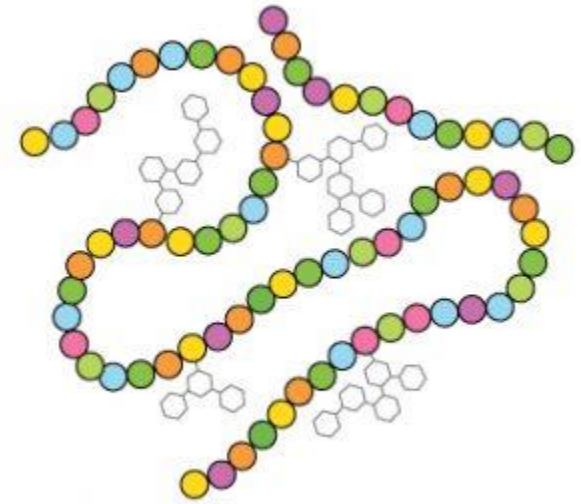



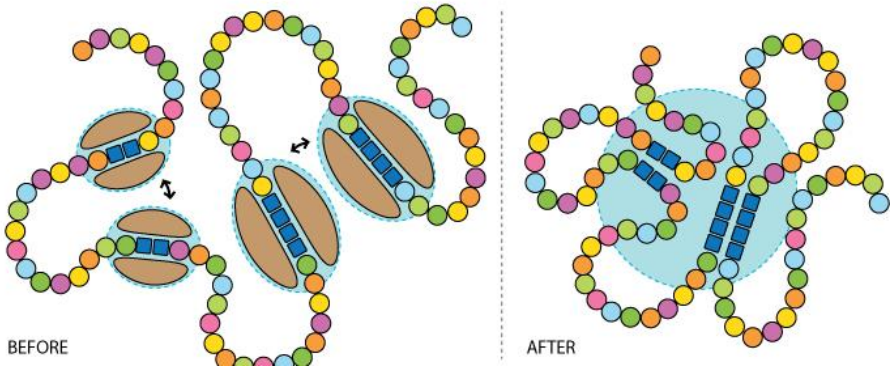
- Synteza proteinů nespočívá jen ve vytvoření lineárního řetězce aminokyselin. Proteiny vytvořené na ribozomech následně podléhají úpravám (v první fázy v ER a Golgiho a parátu hlavně
- (a) glykosilace ….

….čili nalepení cukerných řetězců

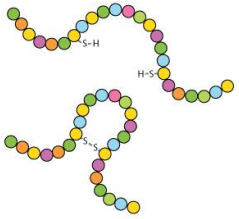


V dalších fázích i další modifikace proteinů (nejen v endoplasmatickém retikulu):

- (b) Zavěšení chaperonů:



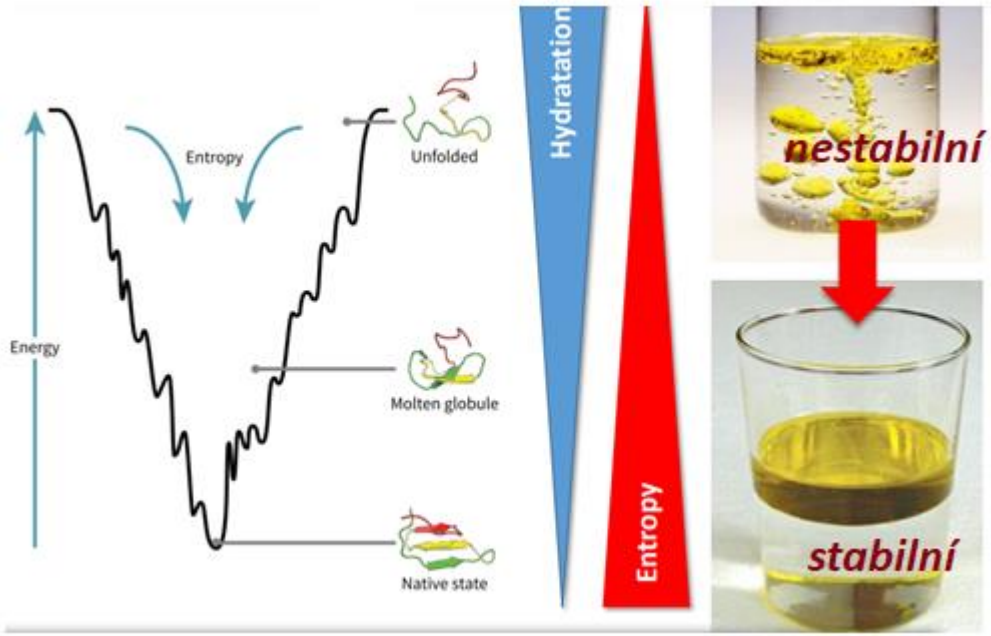

- (c) Další chemické modifikace (dočasné pro transport, nebo trvalé pro správný folding a funkci)



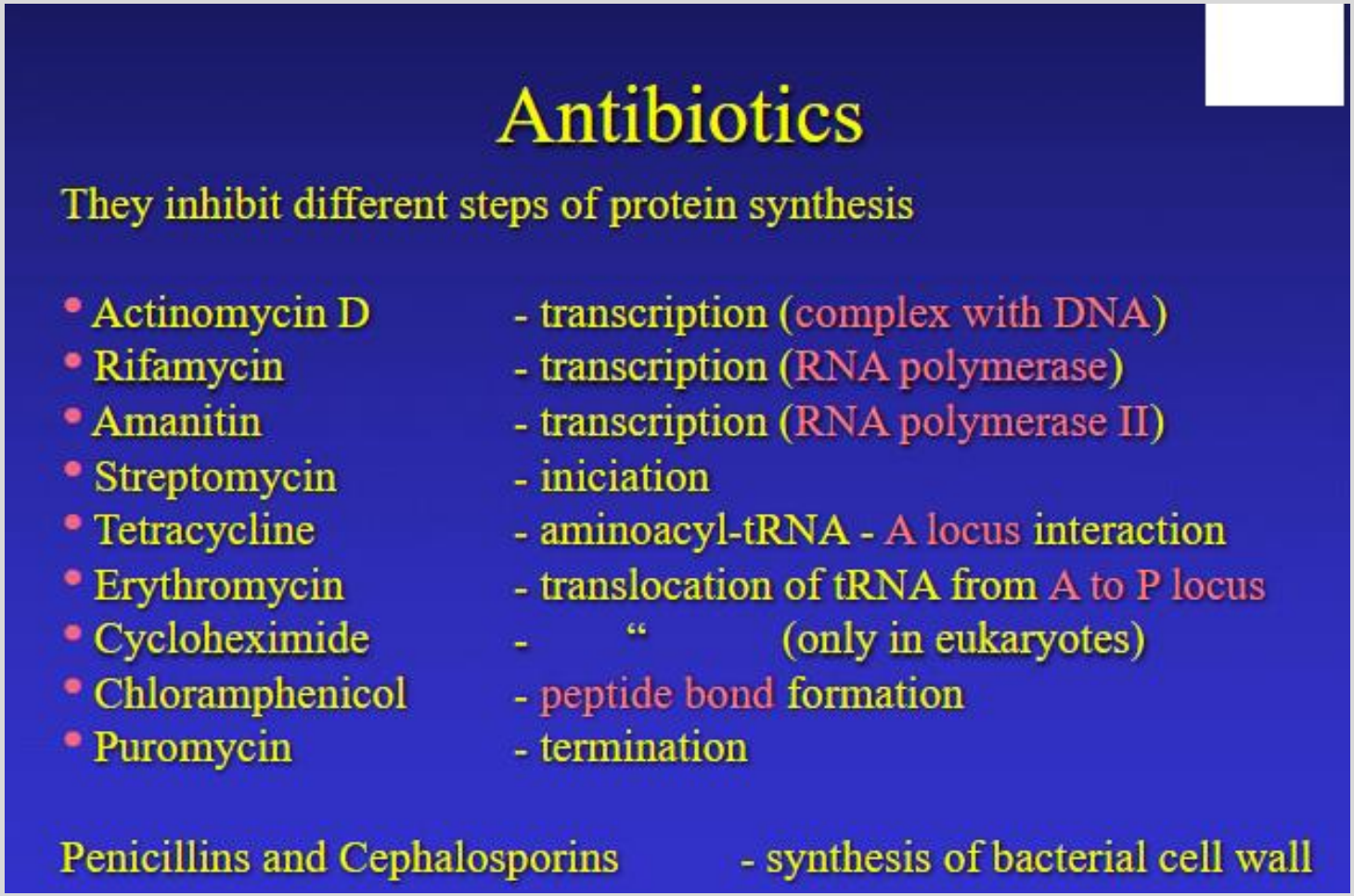
- (d) Finální **SBALENÍ PROTEINů (neboli FOLDING)** - dle posledních výzkumů přibližně třetina syntetizovaných lidských proteinů prochází endoplasmatickým retikulem a je zde také sbalována. To znamená, že tyto proteiny získávají v cisternách endoplasmatického retikula energeticky stabilní konformaci tzn. svou nativní strukturu. Ostatní proteiny se „nesbalené“ exportují a finlizují v jiných částech buňky.

Sbalování proteinů je proces, při kterém dochází k postupnému snižování energie molekuly (jedeme po křivce dolů – viz graf) ale může zahrnovat přechodné energetické bariery (mírné kopečky). Jednou z funkcí chaperonů je snižovat tyto bariery a napomáhat tak správnému sbalení proteinů.

Zjednodušeně lze říct, že folding je rekonformace způsobená intereakcí hyrofobních a hydrofilních částí proteinu s okolní vodou (viz typy aminokyselin v tabulce 3 strany zpět a obrázek oleje vpravo). Exaktní kvantitativní popis řeší moderní kalorimetry, resp bioenergetika a termdynamika pomoci simulačních výpočetních programů a in silico modelů.



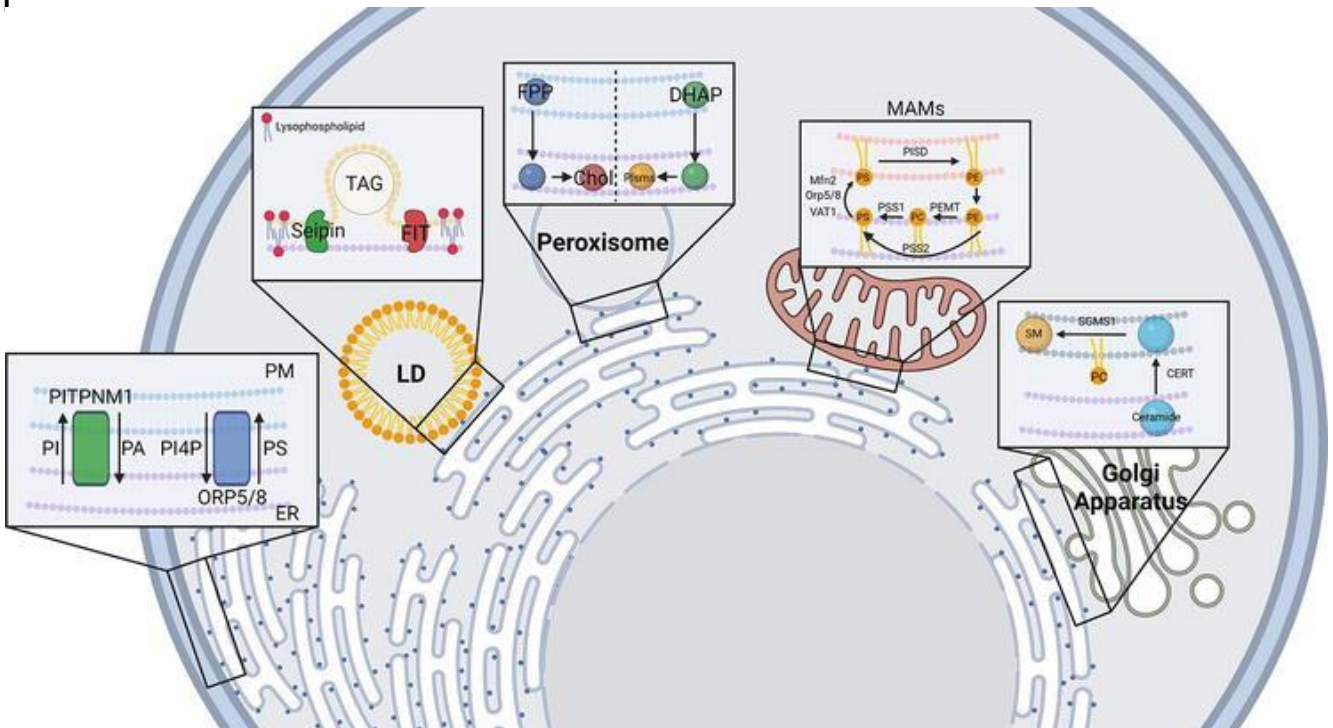
Pozn bokem: některá antibiotika obecně v buňkách inhibují určité fáze syntézy proteinů



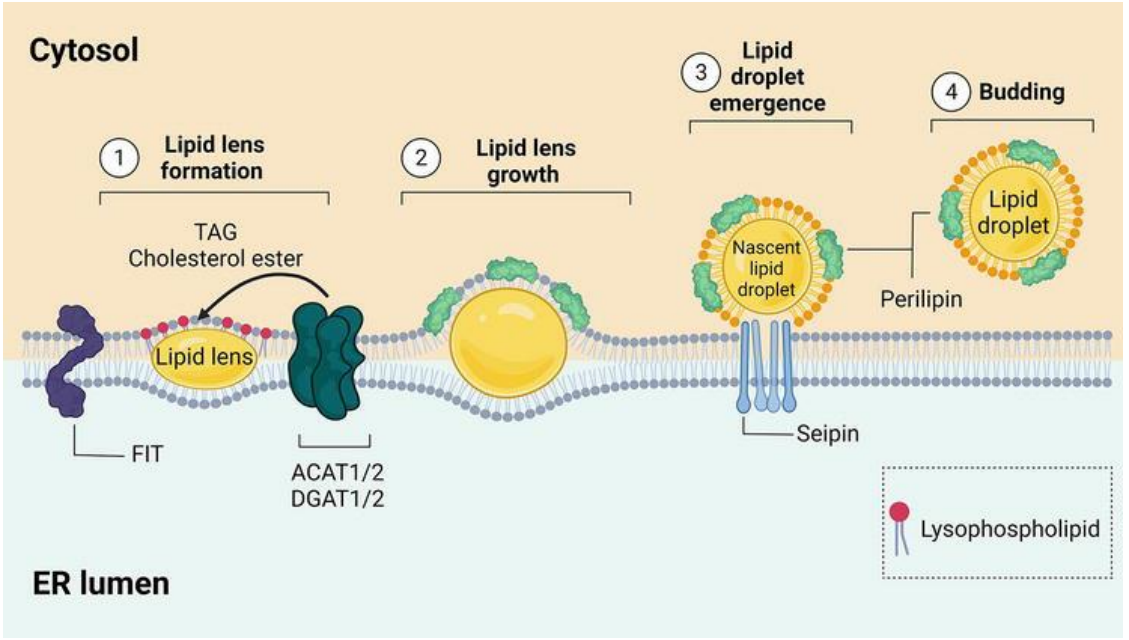
# FUNKCE 2  - syntéze lipidů

# syntéza lipidů

- **Endoplasmic reticulum have important interactions with peroxisomes, mitochondria, lipid droplets, plasma membrane, and Golgi apparatus.**
- With mitochondria, ER works coordinately to synthesize some of the major phospholipids, including phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), and phosphatidylethanolamine (PE). Contacts between ER and peroxisomes permit the synthesis of plasmalogen and cholesterol, while sphingomyelin (SM) is obtained as a result of interactions between ER and Golgi apparatus. Both peroxisomes and lipid droplets derive from ER membranes, implicating proteins such as Seipin and FIT (in lipid droplet biogenesis), or Pex3 and Pex19 (in peroxisomes biogenesis). However, ER can also interact with more organelles such as lysosomes. ER can also contact with plasma membrane; these contacts permit, for instance, the phosphatidylinositol (PI), phosphatidic acid (PA), PS, and phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) transport, thanks to PITPNM1 and ORP5/8 action



- V ER se vytváří i zásobní lipidové kapky (speciálním procesem vychlípením a odškrcením segmentu membrány ER do cytoplasmy)



Poznámka na závěr ER: Řada odborných prací upřesňuje, jak přesně se pak syntetizované proteiny „KONTROLUJÍ“ a EXPORTUJI ven z ER:

Srozumitelnou angličtinou s mnoha odkazy na odborné publikace popsáno např zde:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26841/#A2242

…..The extensive ER network serves as a factory for the production of almost all of the cell's lipids. In addition, a major portion of the cell's protein synthesis occurs on the cytosolic surface of the ER: all proteins destined for secretion and all proteins destined for the ER itself, the Golgi apparatus, the lysosomes, the endosomes, and the plasma membrane are first imported into the ER from the cytosol. In the ER lumen, the proteins fold and oligomerize, disulfide bonds are formed, and *N*-linked oligosaccharides are added. *N*-linked glycosylation is used to indicate the extent of protein folding, **so that proteins leave the ER only when they are properly folded**. Proteins that do not fold or oligomerize correctly are translocated back into the cytosol, where they are deglycosylated, ubiquitylated, and degraded in proteasomes (bude popsáno v následující kapitole). If misfolded proteins accumulate excessively in the ER, they trigger an unfolded protein response, which activates appropriate genes in the nucleus to help the ER to cope.

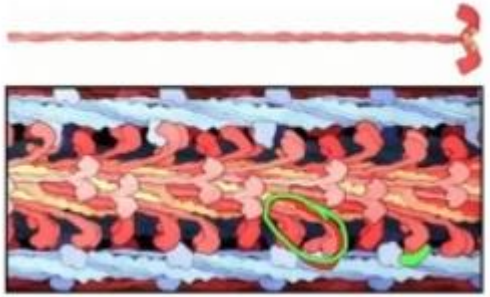
- .

# FUNKCE 3 - modifikace prekurzorů hormonů, enzymů a kooperace signálních molekul

- V endoplazmatickém retikulu (zejména v tom hladkém, kde není hlavní syntéza bílkovin) se odehrává řada významných metabolických pochodů: syntéza glukóza-6-fosfátu, oxidaci a redukci různých steroidních hormonů, syntéze vitamínu C
- Přpravuje prekurzory pro trávicí enzymy (buňky slinivky), kolagen (ve fibroblastech) či protilátky (B lymfocyty, finalizace v Golgiho aparatu a exort vně buňky)
- Jednou z důležitých rolí endoplazmatického retikula je skladovat vápenaté ionty ($Ca^{2+}$) a v případě potřeby je řízeně uvolňovat do cytosolu (to má efekt jednak jako signál pro start stahu svalů, ale i pro start apoptozy nebo jiné reakce buňky na aktuální situaci)

# SARCOplasmatické retikulum

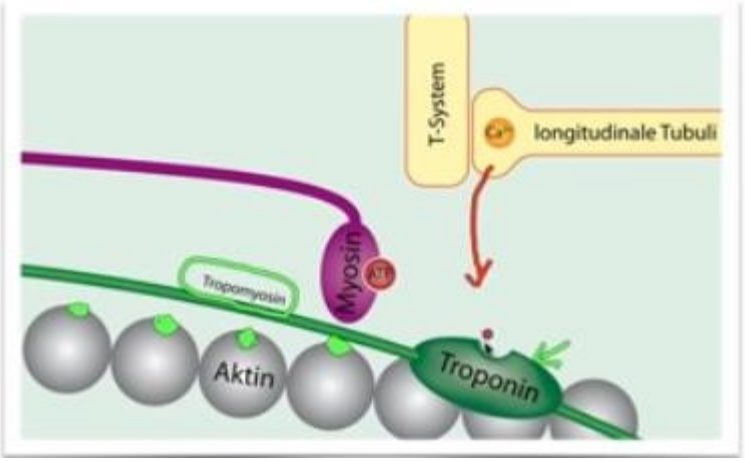
(ER ve svalových buňkách)

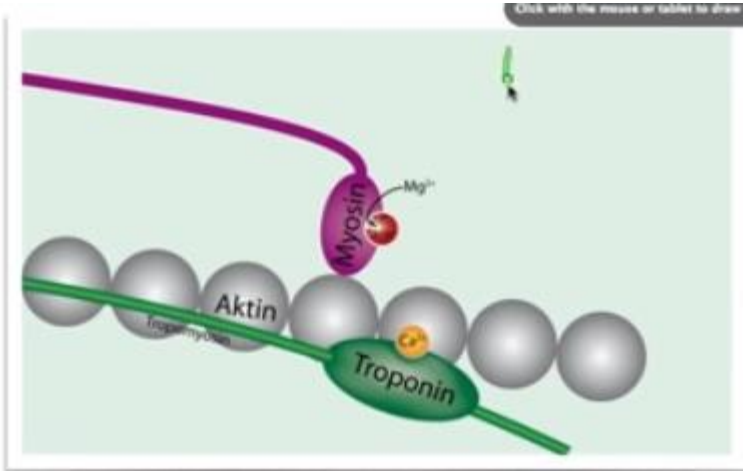


Ca2+ se uvolní

A navazuje na něj Ca usazení v troponinu

a start posunu myosinu

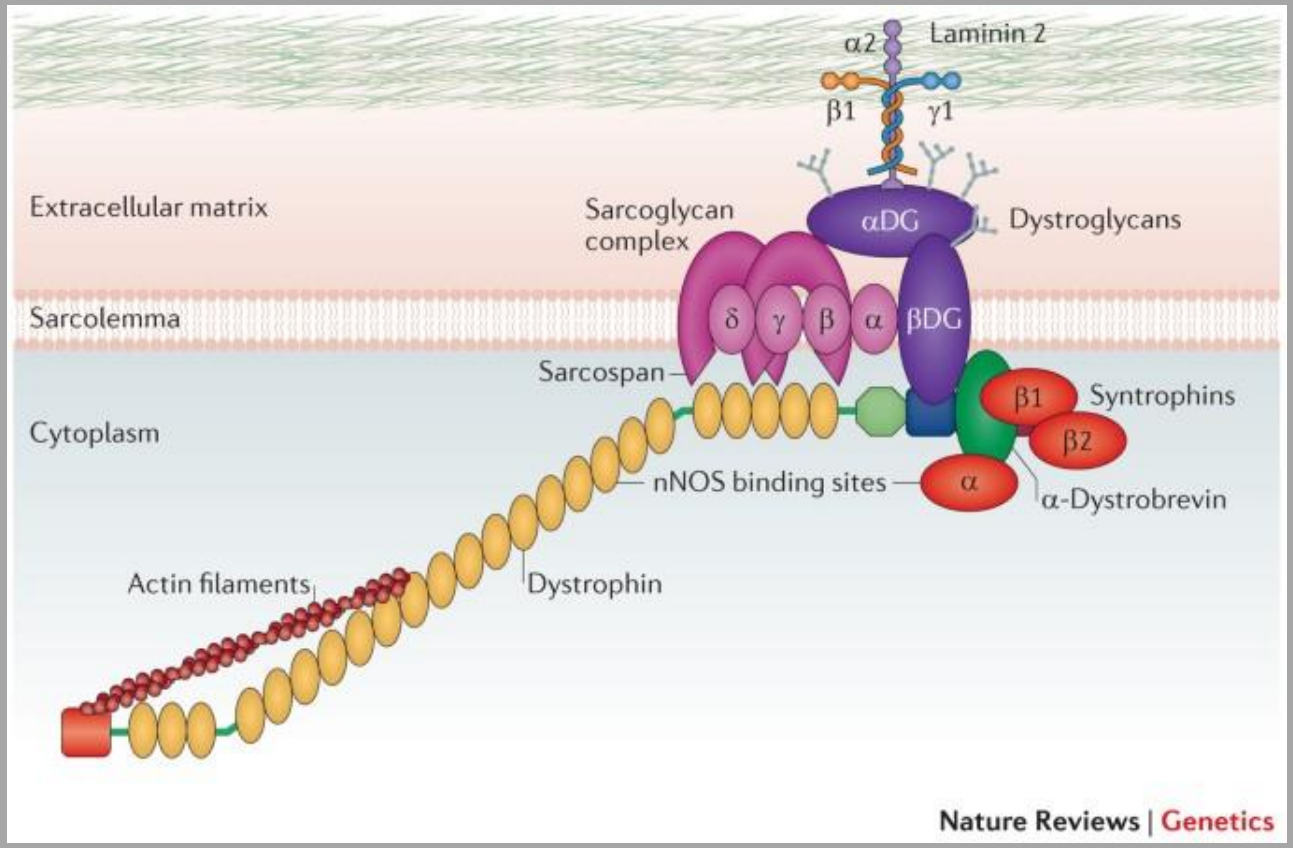


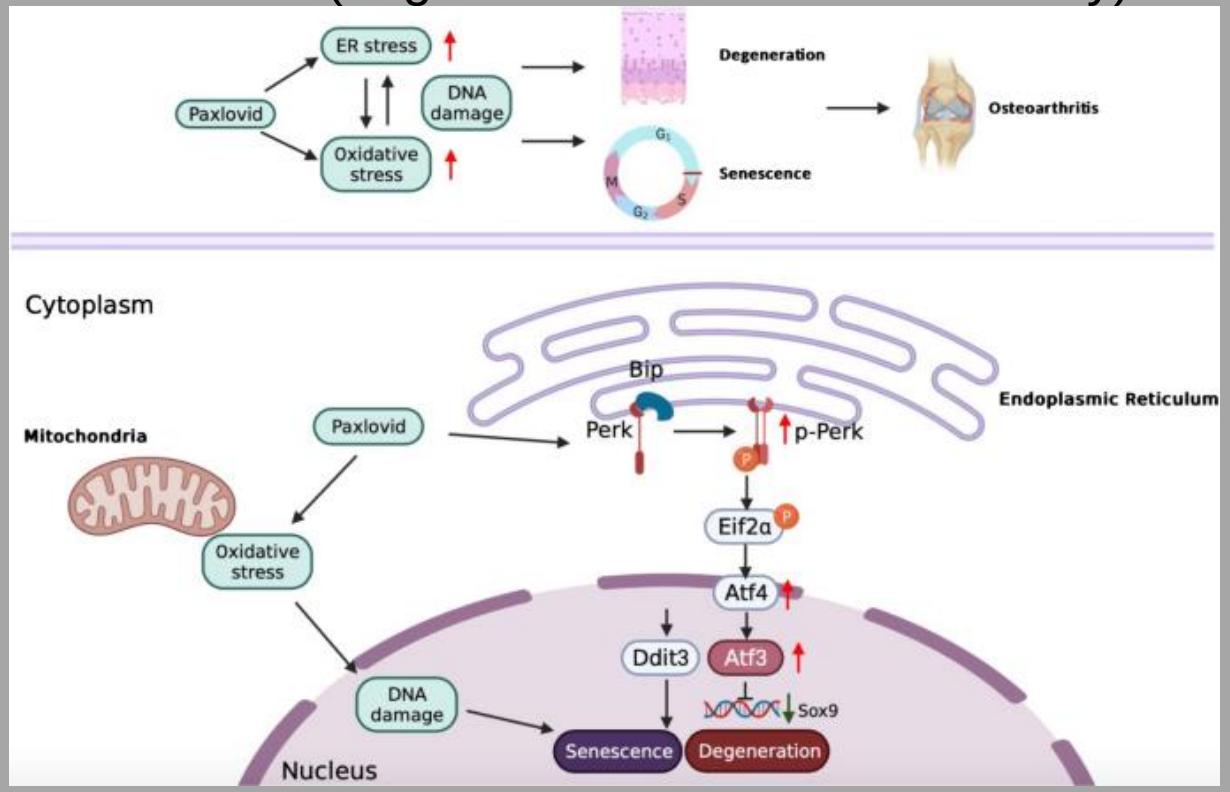

1: $Ca^{2+}$ Release from Terminal Cisternae binding site exposure
2: Myosin head binds to Actin binding Sites (ATP hydrolized)
3: Release of ADP and Pi causes Power Stroke
4: ATP causes Myosin head to be released
5: ATP is hydrolyzed, re-energizes the myosin head
6: $Ca^{2+}$ are pumped back into the Terminal Cysternae

# Poznámka bokem: Patologie spojené s pohybem cytoskeletů svalů

**Duchennova svalová dystrofie** (**DMD** nebo také **svalová dystrofie Duchennova typu**) je gonozomální recesivní vrozené onemocněnízpůsobené mutací genu kódujícího protein dystrofin.



# Aktualita bokem: Paxlovid (Léčivo proti SARS-COV19) intereferuje s endoplasmatickým retikulem a mitochondrií v kloubech (degenerace - vznik osteoartritidy)



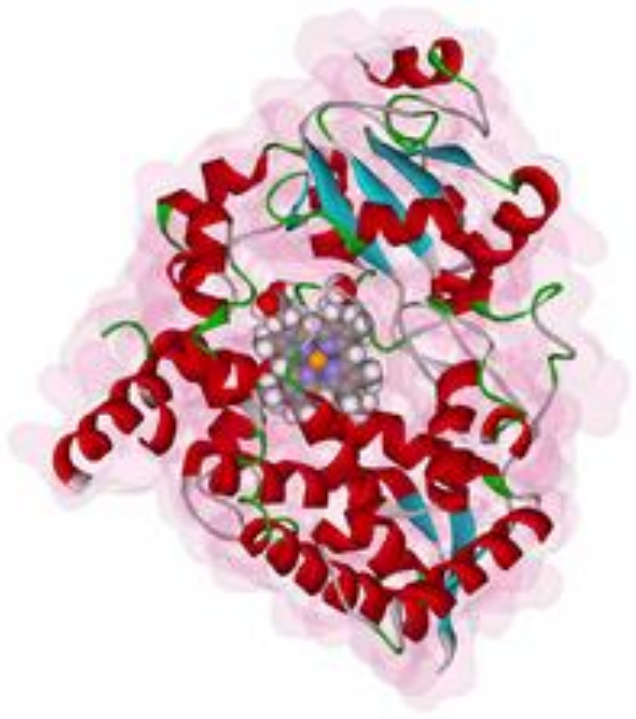

https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-022-03770-4

# FUNKCE 4

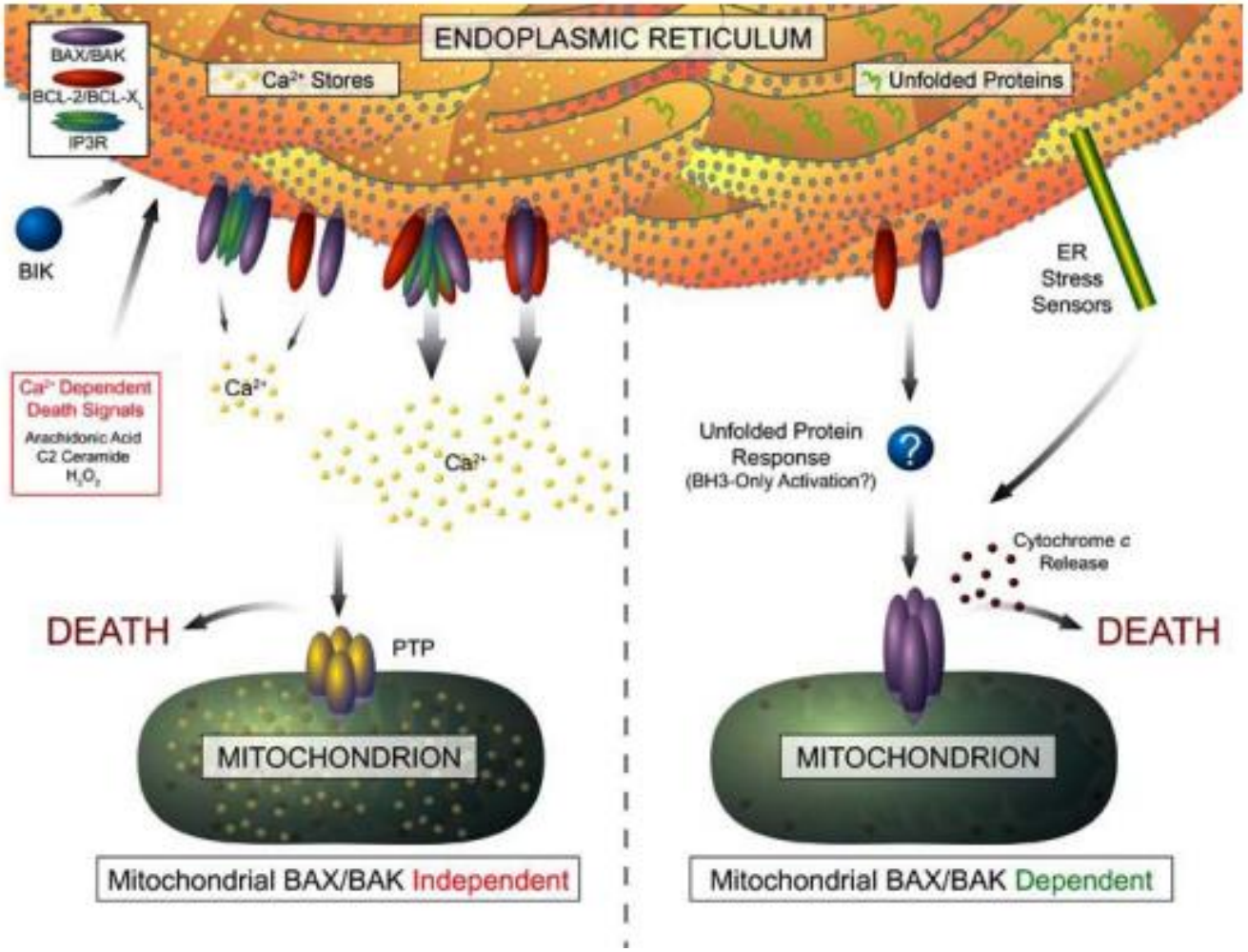
- V membráně endoplazmatického retikula se vyskytuje skupina cytochromů P450

(hlavně v jaterních buňkách)

P450 jsou velmi důležité enzymy pro farmakologii
známe několik podtypů, podtyp 3A4 a 2C9
metabolizuje většinu léčiv  a řadu toxinů a xenobiotik
(např na polárnější molekuly
pro snadnější vyloučení z těla)



# FUNKCE 5 – participace ER na spouštění buněčné smrti



# GOLGIHO APARÁT

Golgiho aparát tvoří lamely a cisterny orientované konvexitou k jádru.

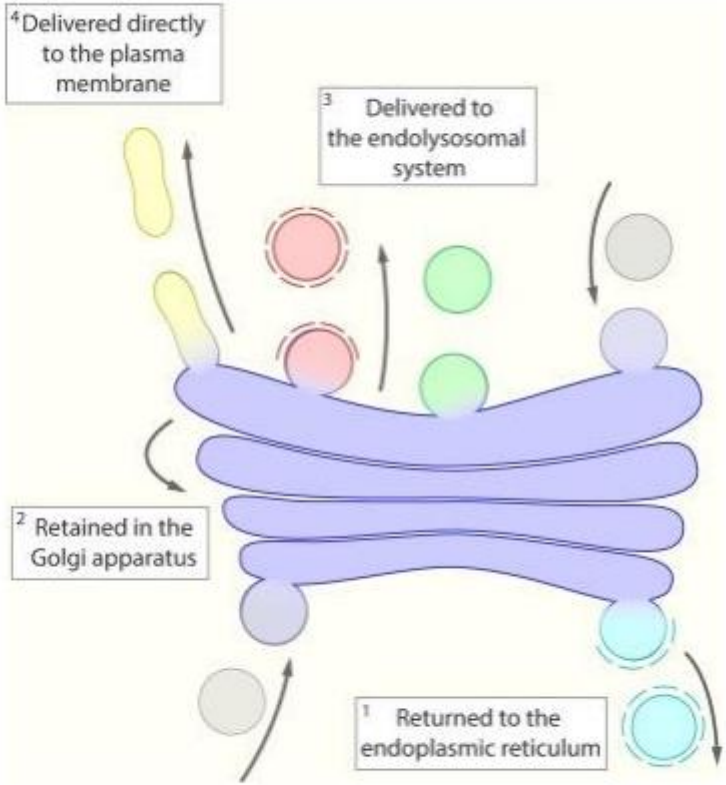
**To, co vytvoří endoplazmatické retikulum se dostane do Golgiho aparátu, kde dochází k postsyntetické upravě proteinů (nejčastěji gylkosylace, fosforylace, sulfatace a spec. Proteolýza) nebo zabudování do sekrečních vezikulů, lyzosomů a dalších organel.**

Po přestavbě opouští proteiny Golgiho aparát druhou stranou povrchu.

Transport bílkovin probíhá buď nepřetržitě (konstitutivně) nebo je regulovaný chemickými signály. Jaký bude osud vytvořeného proteinu (kam bude transportován) je závislé na signálních strukturách a signálních sekvencích.

Sekreční granula jsou vysílána do ctoplazma

resp. směrem k vnější mebráně.



Golgiho aparát je aktivní například při sekreci mateřského mléka

Local control of mammary development and function Christopher H. Knight 1998

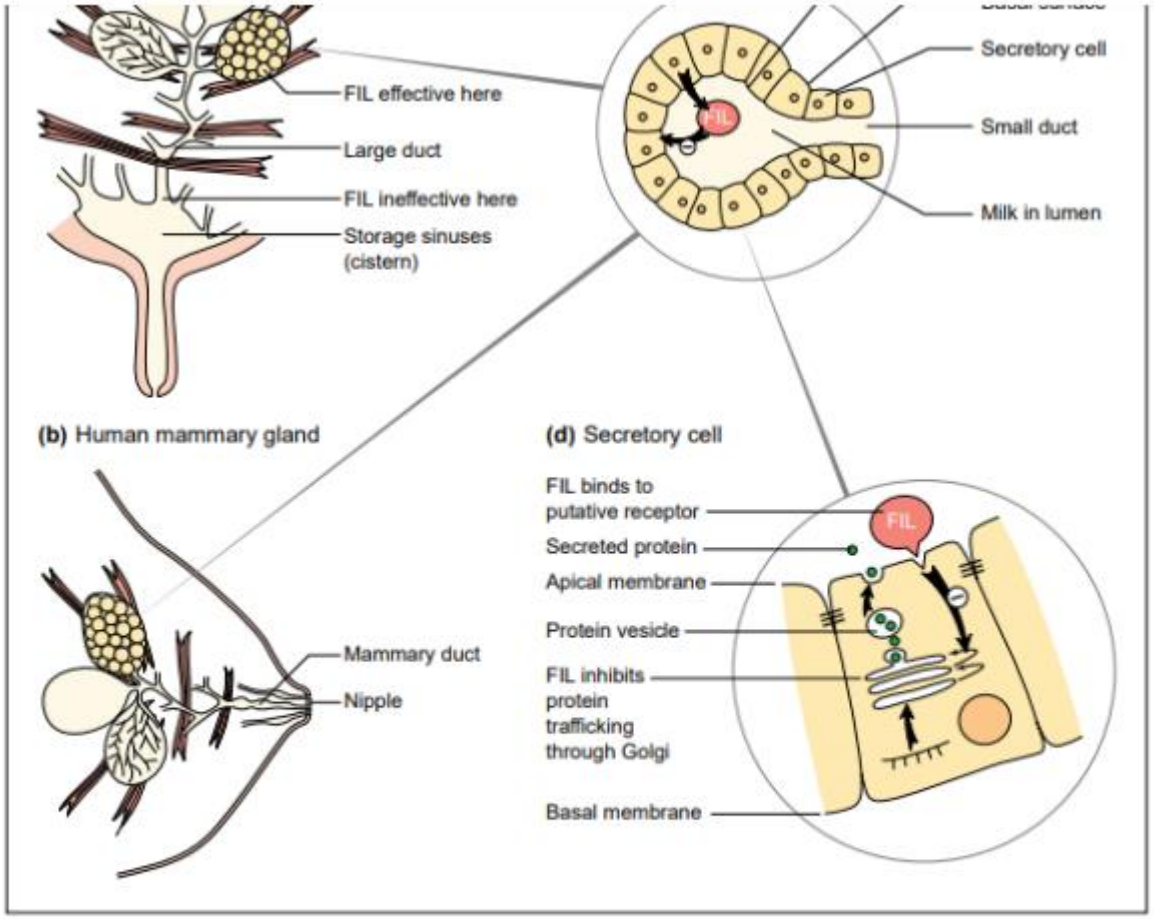
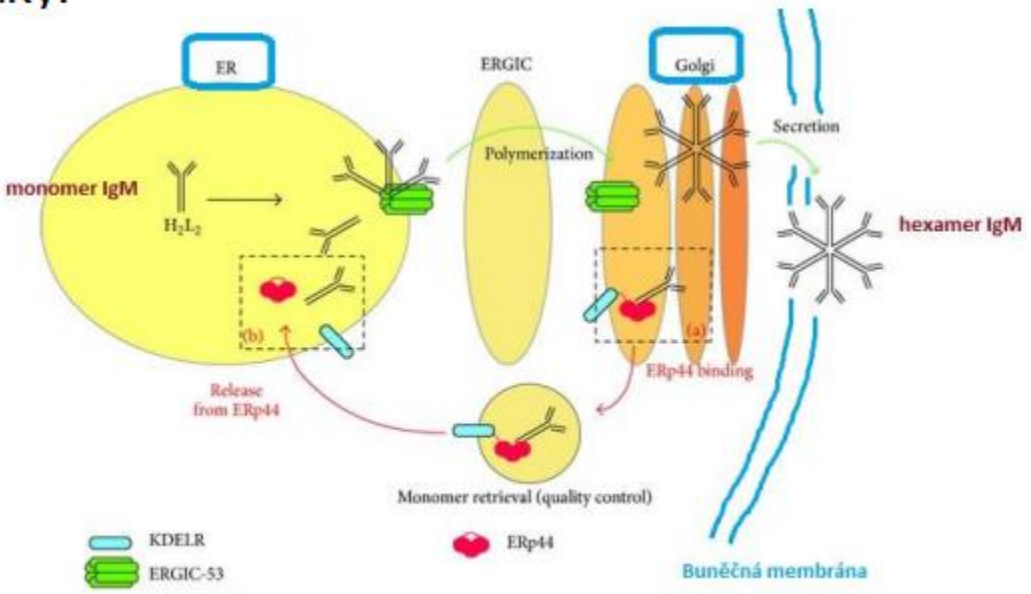
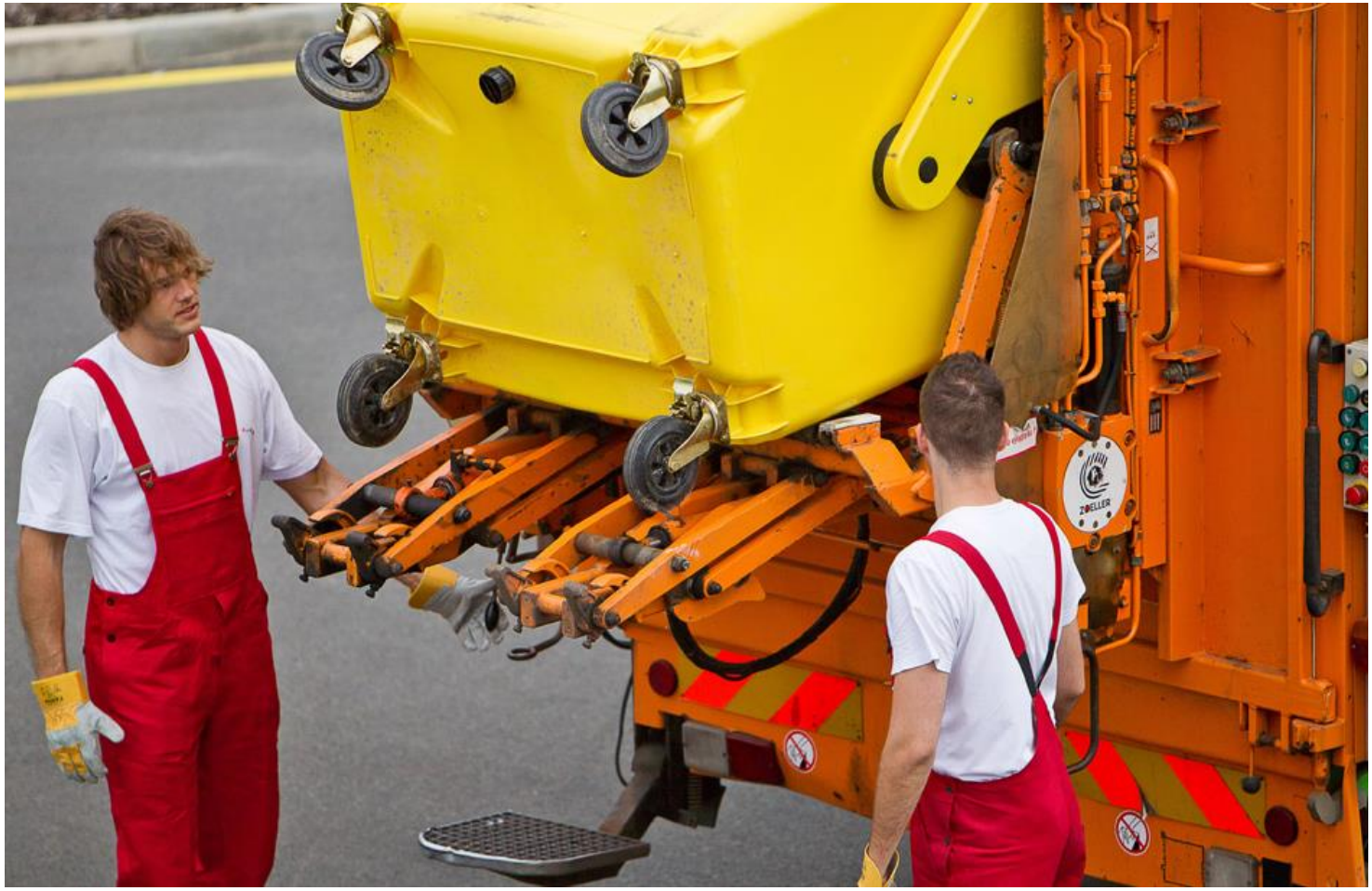



**Fig. 1.** (a) Diagrammatic representation of the mammary gland of a dairy species. Local feedback inhibition of milk secretion results from the action of a secreted milk protein (FIL), which is effective in milk stored within secretory tissue but not in milk that has moved down into the storage sinuses. (b) In rodents, man and some other species the storage sinuses are absent and milk drains through ducts directly to the nipple. (c) Individual secretory alveoli are hollow sacs of polarized secretory epithelial cells drained by a fine duct. Thus, the FIL is an autocrine factor, produced and secreted into milk by secretory epithelial cells from where it binds to presently uncharacterized sites on the apical membrane of the same cells. (d) Within the cell, feedback inhibitor of lactation reduces the rate of protein secretion by disruption of vesicle trafficking through the Golgi apparatus.

- Nebo také přípravě a při exportu MHCII do finální pozice na vnější membráně buňky (viz imunitní systém: MHCII molekula na antigen prezentující buňce)
- Dále při úpravě a transportu IgM molekul (imunoglobuliny při sekreční odpovědi B-lymfocytů proti patogenem …viz kapitoly imunologie) do vnějšku buňky:



# ORGENELY a KOMPLEXY S DEGRADAČNÍ A RECYKLAČNÍ FUNKCÍ



# ORGENELY a KOMPLEXY s degr.a recyklační funkcí

Syntézu proteinů a lipidů jsme popsali u endoplasmatického retikula. Stejně jako rychlá syntéza proteinů je pro buňku důležité v pravý čas určité proteiny a lipidy v buňce zdegradovat (a nejlépe rozložit na původní aminokyseliny a jiné komponenty). Učastní se hlavně **LYSOZOMy a PROTEASOMy**

Tyto DEGRADAČNÍ komplexy a případně nabourání jejich funkce, se jeví jako extrémně důležité jak pro pochopení neurodegenerativních onemocnění, tak pro ovlivnění odumření/inhibice/přežití rakovinných buněk

*Pozn historická: objevy degradačních organel a jejich mechanismů byly relativně nedávno ve srovnání s ostatními organelami:*

*Mitochodnrie – 19. století ; Organely pro syntézu (ER, Golgi ap) - 19. století*

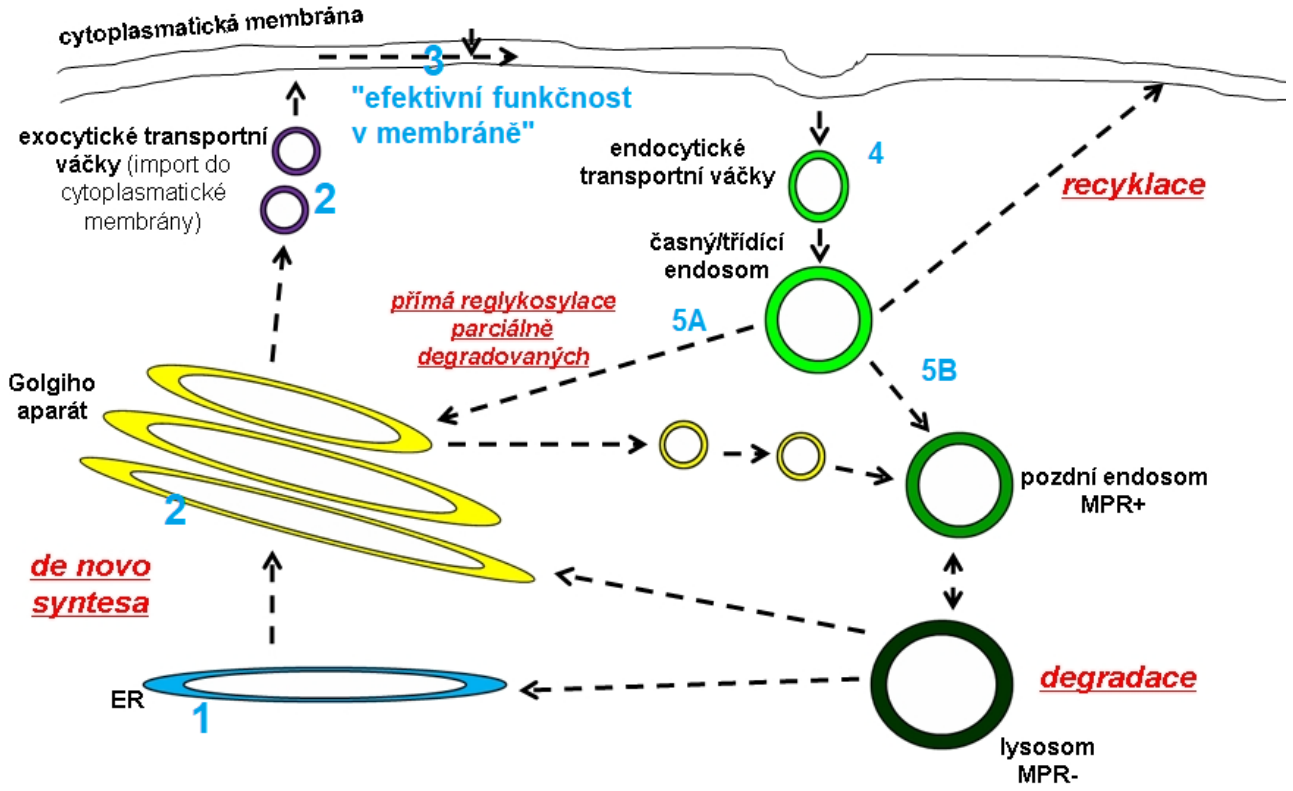
**Lysozomy – 1955 , publikace *S.*** *Goldfischer, E. Essner,A.B. Novikoff: The localization of acid phosphatase activities at the level of ultrastructure.( J. Histochem. Cytochem. 12: 72-95, 1964)*

**Proteasom – 1984, Nobelova cena 2004 (za popsání ubiquitin-proteazomového systému )**

# Synteza a degradace proteinů i lipidů jsou komplexně provazané

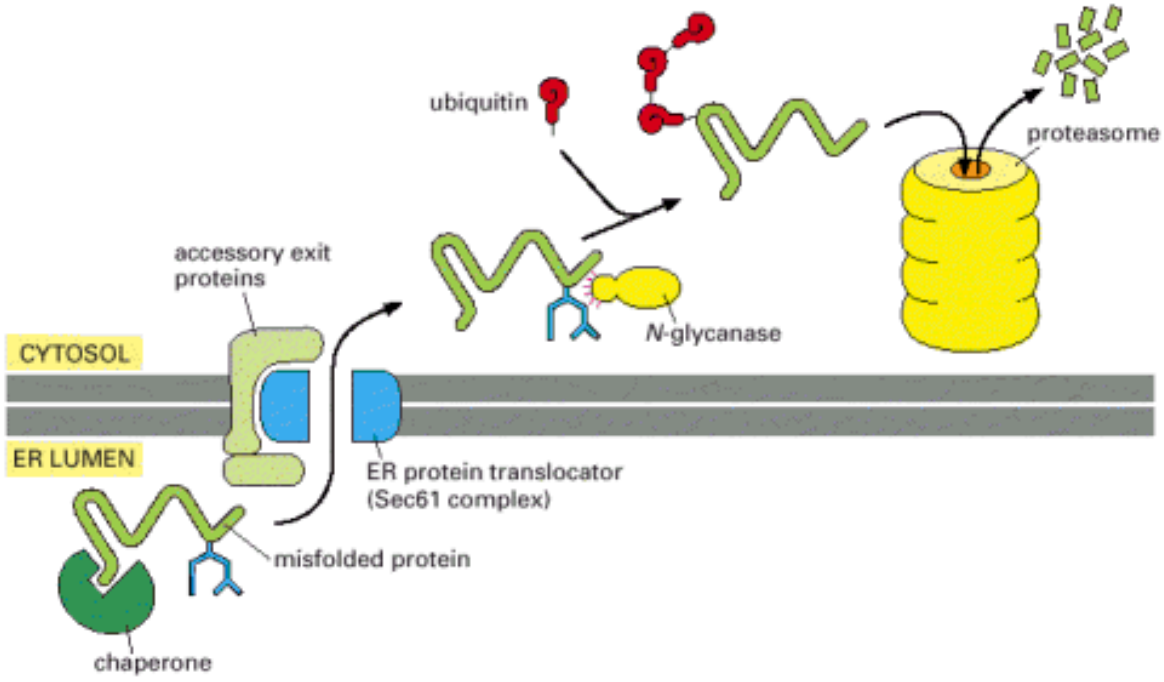
- Jde o komplexní výrobní i recyklační síť více organel,

například síť pro jeden z membránových lipidů:




*(modifikováno dle Tettamanti et al. 2003)*

- A například koperace ER a proteasomu po výrobě chybného proteinu (označen a zlkividován)



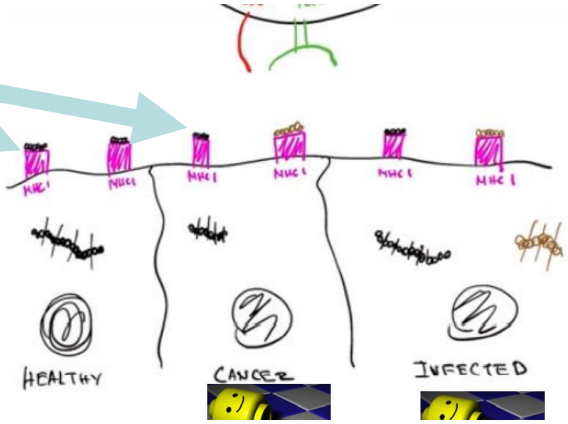
# PROTEASOM

## (pozor: neplést si proteasom a proteom)

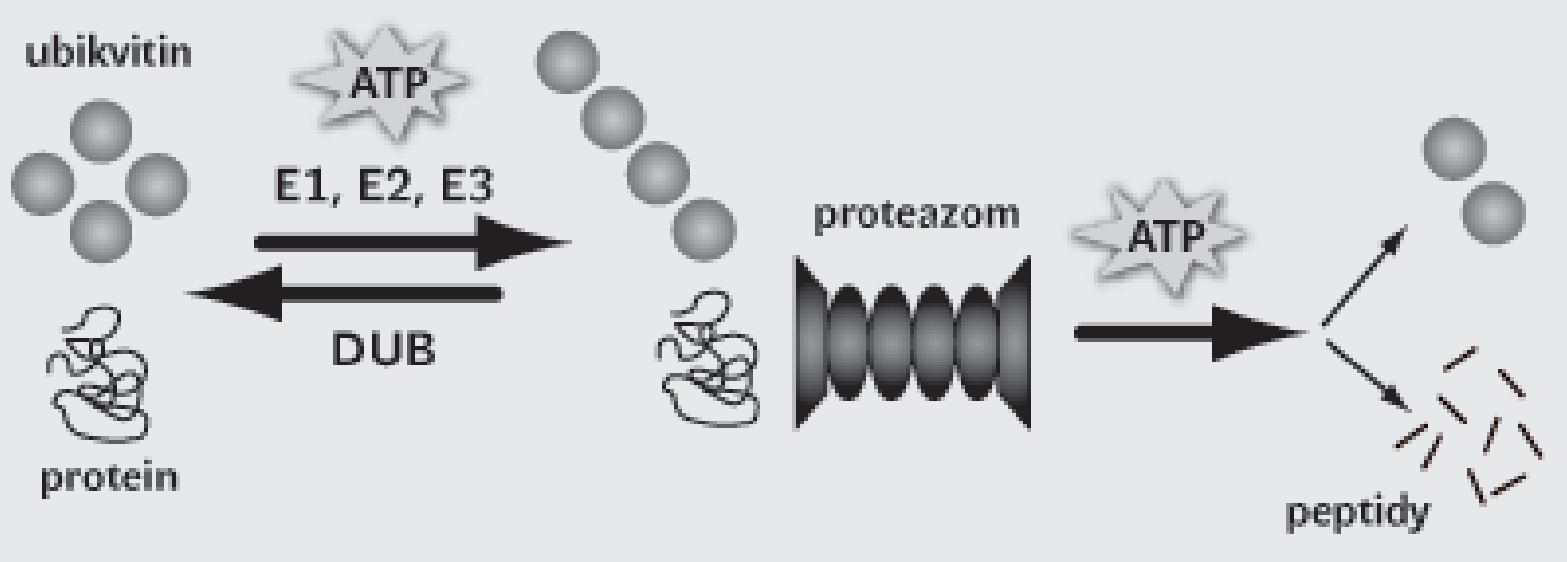
BEZ PROTEASOMU?: by se buňka časem zahltila nepotřebnými proteiny (pro normální buňky nechceme ale toto využívají onkologové pro darebné nádorové buňky), nefungoval by buněčný cyklus, nefungovalo by prezentování fragmentů na apovrchu buňky....

Proteiny jejichž aktivní činnost v buňce má být jen krátkodobá, jsou odstraňovány téměř výhradně v proteazomu po ubikvitinaci.(angl. ubiquitination) neboli označkování „značkou smrti“. Typickým zástupcem takovýchto proteinů jsou tzv. cykliny – jejich pravidelné mizení a znovuobjevování umožňuje buňkám správně načasovat jednotlivé děje nezbytné pro dělení buňky (*souvisí s: přednáška o buněčném cyklu*)

Kromě toho se ubikvitinace podílí i na degradaci bílkovin určených k prezentaci antigenů (každá buňka vystavuje na svém povrchu fragmenty některých bílkovin přítomných uvnitř) (*viz přednáška o imunitních buňkách a závěrečná přednáška o boji lymfocytů s patogeny a nádory*)



# „nic není zadarmo“




Na ubikvitinaci je potřeba energie (ATP)

Na rozložení v proteazomu je též třeba energie (ATP)

- Ubikvitinace a funkce proteasomu souvisí s řadou nemocí:



**Table 3**
Proteolysis dysfunction involved in various neurodegenerative diseases.

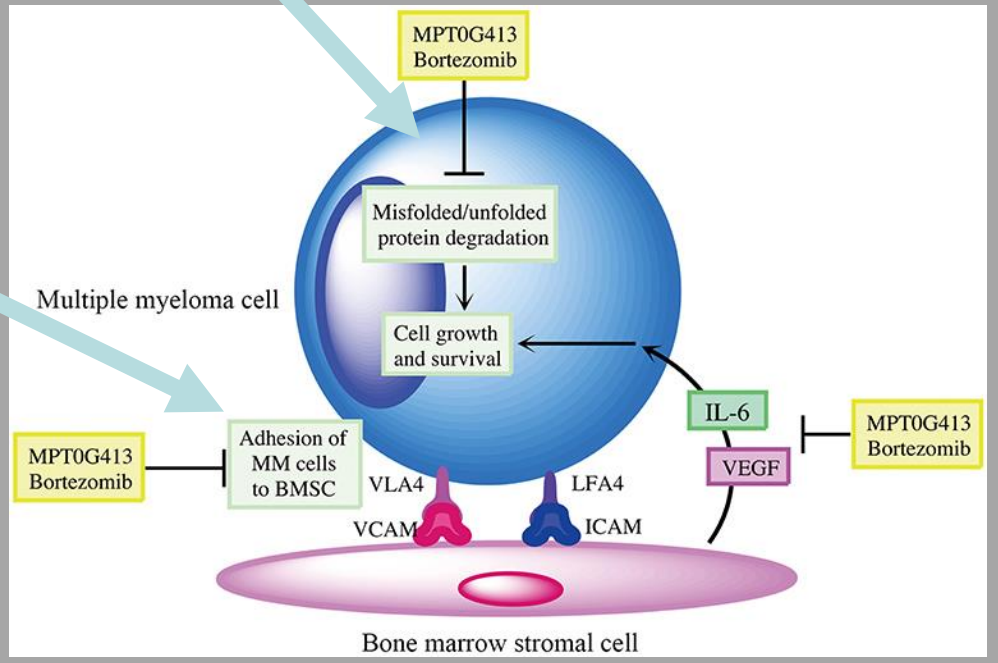
| Disease | Genes | Protein aggregates | Proteolysis dysfunctions reported |
|---|---|---|---|
| Alzheimer disease | *APP, PSEN1, PSEN2* | Tau, Aβ (senile plaques/neurofibrillary tangles) | Decreased proteasome activity [119]<br>Decreased E1, E2 ubiquitin ligase activity [120]<br>Autophagy dysfunction—Aβ in autophagic vacuoles [181]<br>Induction of MMPs in presence of Aβ [206,207]<br>Inhibition of calpain function [231] |
| Amyotrophic lateral sclerosis | *SOD1* | Mutant SOD1, synuclein, TDP43 | Proteasome alterations [150]<br>Increased proteasome and caspase activities [151]<br>Accumulation of autophagosomes and p62 [195]<br>Altered expression of cathepsin D [197] |
| Huntington disease | *Huntingtin, Ataxins* | Polyglutamine aggregates, mutant huntingtin | Decreased proteasome activity [138]<br>Autophagic vacuoles with aggregates [268]<br>Increased expression of calpain isoforms [269] |
| Parkinson disease | *α-Synuclein, Parkin, Pink1, LLRK2, DJ-1* | α-Synuclein, tau (Lewy bodies/ neurofibrillary subunits) | Impaired 26S/20S activity [130]<br>Accumulation of α-synuclein [187]<br>Dysregulation of autophagy in Atg5 and Atg7 KO mice [179]<br>Increased calpain activity [270] |
| Stroke (cerebral ischemia) and brain injury | | Ubiquitin aggregates | Impaired proteasome activity [158,159]<br>Autophagic cell death [198,199]<br>Increased MMP-9 activity [212,214]<br>Increased MMP expression after stroke [213]<br>Increased caspase activity [271]<br>Increased autophagy [272] |

Aβ, amyloid-β; MMP, matrix metalloproteinase.

# Pozn: z farmakologické praxe

Příkladem moderního farmaka pro inhibici proteasomu je Bortezomib (například u buněk *MNOHOČENTÉHO MYELOMY* „zašpuntuje“ proteasom a nadorové buňky nemohou degradovat proteiny a postupně jdou do apoptozy;

Navíc Bortezomib také ztíží adhezi těchto buněk na tzv. stromalní buňky a zpomalí progres onemocnění)



# LYSOZOMY (angl. lysosoms)

- Lysosomes are membrane-bound, dense granular structures containing hydrolytic **enzymes** responsible mainly for intracellular and extracellular digestion.
- It is an important cell organelle responsible for the inter and extracellular breakdown of substances. They are more commonly found in animal cells while only in some lower Lysosomes occur freely in the cytoplasm.
- In the lysosoms is pH decreased to acidic value (cca 5)

(H+ gradient is created by ATPase) (ATPase is enzymes that catalyze the decomposition of adenosine triphosphate (ATP) into adenosine diphosphate (ADP) and a free phosphate ion and produce ENERGY; ….compare to ATP synthse in mitochondria )

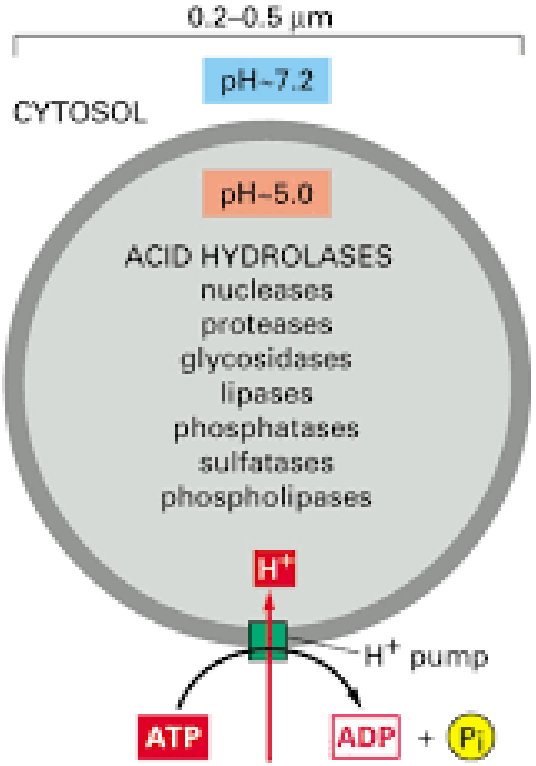



Figure 13–31. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Patologie lysozomu

Lysosomální střádavá onemocnění (LSDs, Lysosomal Storage Diseases) tvoří skupinu více než 70 vzácných dědičných metabolických onemocnění, jejichž příčinou je nejčastěji porucha funkce některého z lysosomálních enzymů.

Farmakologická intervence je dnes v klinické praxi užívána pr několik LSDs – Gaucherovu chorobu, Fabryho chorobu, Pompeho chorobu a mukopolysacharidózu typu I, II, IVA a VI.

# Poznámky (nejen k testům) aneb několik častých pojmových chyb

**Pozor na pojmy:**

***Homeo****stasis = preserving constancy in the internal environment'.*

***Hemostasis*** *(or haemostasis) is a process to prevent and stop bleeding, meaning to keep blood within a damaged blood vessel*

***Hemopoieis (hematopoiesis; haematopoiesis)*** = the formation of blood cellular components – occurs during embryonic development and throughout adulthood

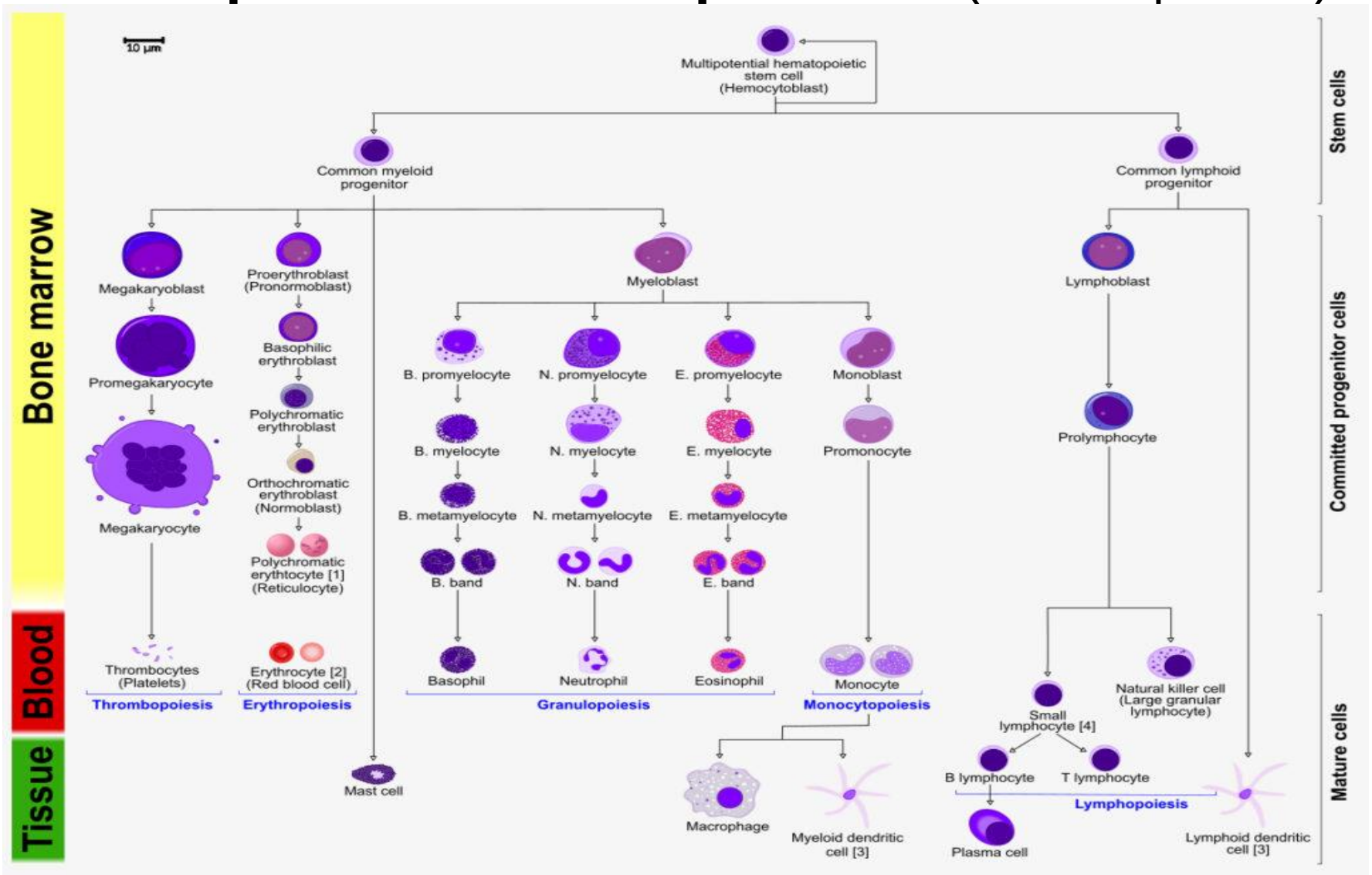
Proteom
Proteasom

**Epi**stasis (Epistase)
**Epi**genetic (Epigenetika)

Endosom
Exosom

Genotype (genotyp)
Phenotype (fenotyp)

# mapa: Hematopoeza (hematopoiesis)

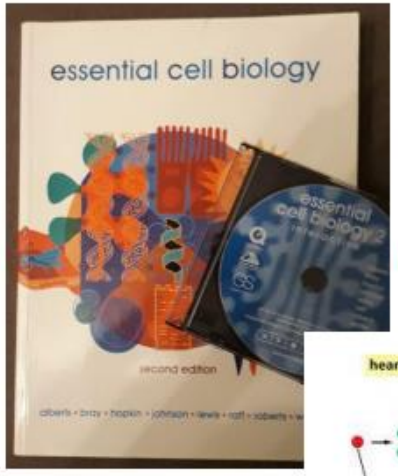



**CD4 pomocné T lymfocyty (T H -lymfocyty)**

**CD8 cytotoxické lymfocyty ( T C )**

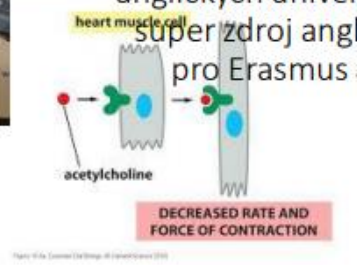
# Biologie

## vytipovaná doporučená literatura k celému semestrálnímu kurzu podzim 2020:
## (aneb co určitě v knihovně na Palackého třídě najdete)



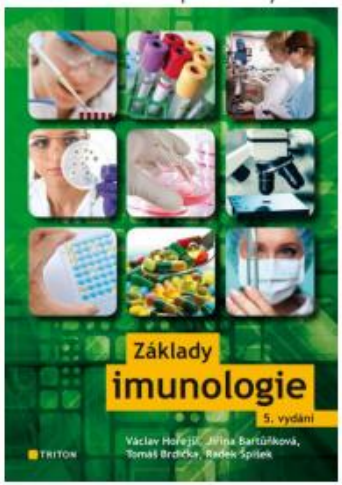

**Alberts: Essential cell biology**

(velká tlustá – není potřeba studovat vše, anglicky, ale názorná, na některé pasáže super grafika, budete se k ní rádi vracet mnoho let. Je to standart na mnoha anglických univerzitách) super zdroj angličtiny pro Erasmus atd




**Hořejší: Základy imunologie**

Obsáhlá, není potřeba na tento semestr studovat vše, shodne s v mnoha dalších předmětech. Knížka ke které se budete vracet i v praxi celý život




**Genetika pro gymnázia Jan Šmarda 2003**

- Dobře a názorně Mendelovy zákony i další mioza, mitosa atd