

Proteiny – životní cyklus

J. Vondráček



Téma přednášky

- ŽIVOTNÍ CYKLUS PROTEINŮ
- základní principy životního cyklu proteinů a mechanismů regulujících dynamiku těchto procesů;
- syntéza proteinu, jeho transport a degradace;
- vybrané post-translační úpravy proteinů;



Kontrola kvality mRNA

- ▶ syntéza mRNA zahrnuje řadu kroků – tedy nejen vlastní transkripci, ale i její post-transkripční úpravy a vazbu proteinů umožňujících tyto úpravy i její transport;
- ▶ jak v jádře, tak v cytosolu může dojít k poškození mRNA – vznik aberantních proteinů - v buňkách existuje proto účinný systém kontroly její kvality;
- ▶ rozpoznání čepičky a polyadenylovaného konce při iniciaci;
- ▶ **nonsense-mediated mRNA decay** – odstraňuje poškozenou mRNA v průběhu transportu z jádra;

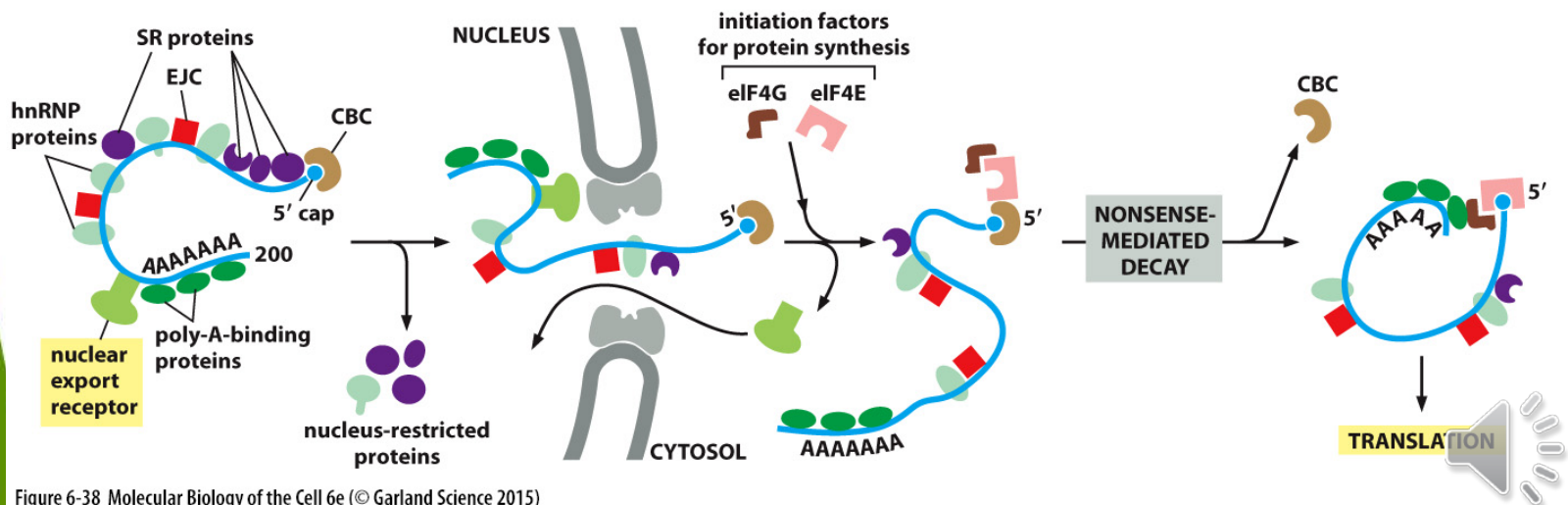


Figure 6-38 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Nonsense-mediated mRNA decay

- ▶ zahájen v okamžiku výstupu 5' konce z jádra – naváže se ribozóm a dojde postupně k uvolnění spec. proteinů vázaných na spoje exonů – **exon junction complexes**;
- ▶ pokud dojde k uvolnění všech EJC, je mRNA uvolněna do cytoplazmy k další translaci, pokud ale **ribozóm dojde ke stop kodonu a zastaví se ještě před uvolněním všech EJC** – je iniciován proces degradace mRNA;
- ▶ kontrola produkce kompletních proteinů – význam např. při přestavbách proteinů v buňkách imunitního systému; u řady dědičných chorob umožňuje eliminaci potenciálně toxického proteinu produkovaného poškozenou alelou;

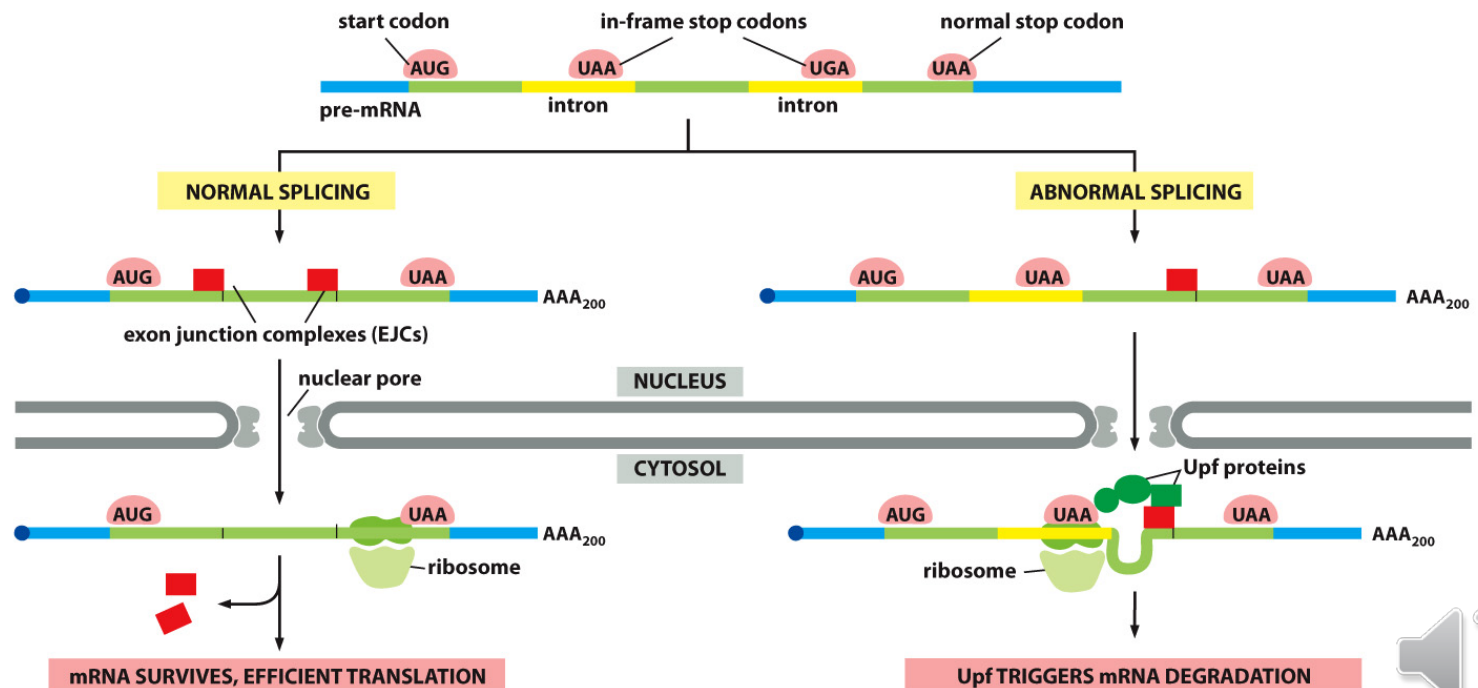


Figure 6-76 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Ribozómy a translace

- ▶ mRNA exportována z jádra v podobě ribonukleoproteinů;
- ▶ translace mRNA probíhá na ribozomech – zajišťují jak katalýzu tvorby peptidové vazby, tak kontrolu přesnosti (1 chyba na cca 10^4 AA);

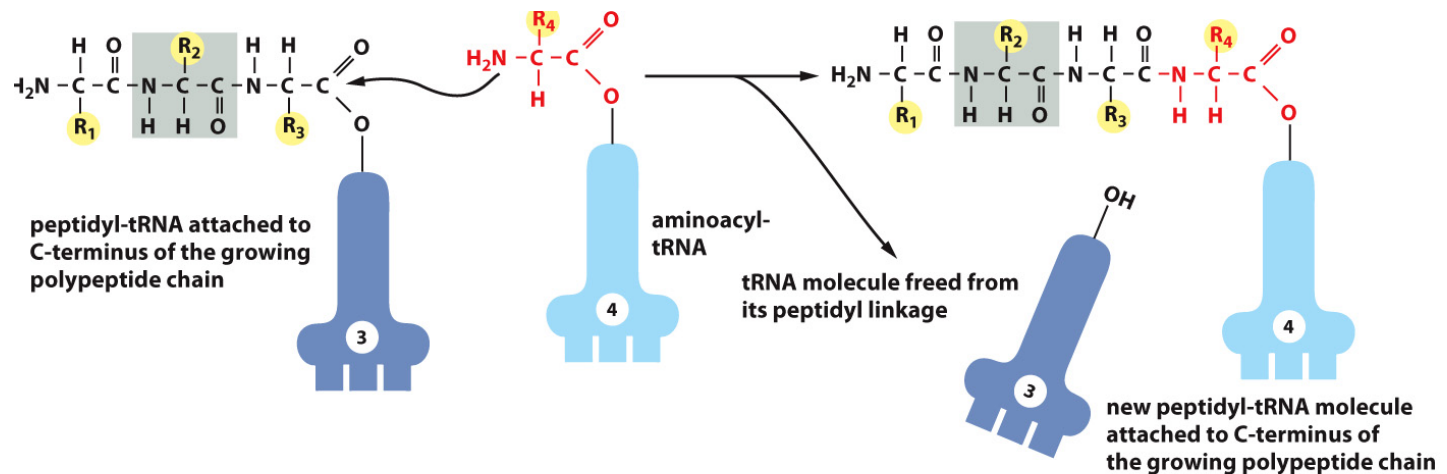


Figure 6-59 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Ribozómy a translace

- ▶ podjednotky ribozómů jsou **sestavovány v jadérku, exportovány jaderným pórem a následně sestavovány ve funkční ribozómy v cytoplasmě**;
- ▶ typická buňka obsahuje milióny ribozómů; pokud neprobíhá translace, jsou obě hlavní podjednotky ribozómu oddělené – spojují se na molekule mRNA (blízko 5' konce);
- ▶ 2 odlišné typy lokalizace – cytoplazma a membrány (ER, jádro);

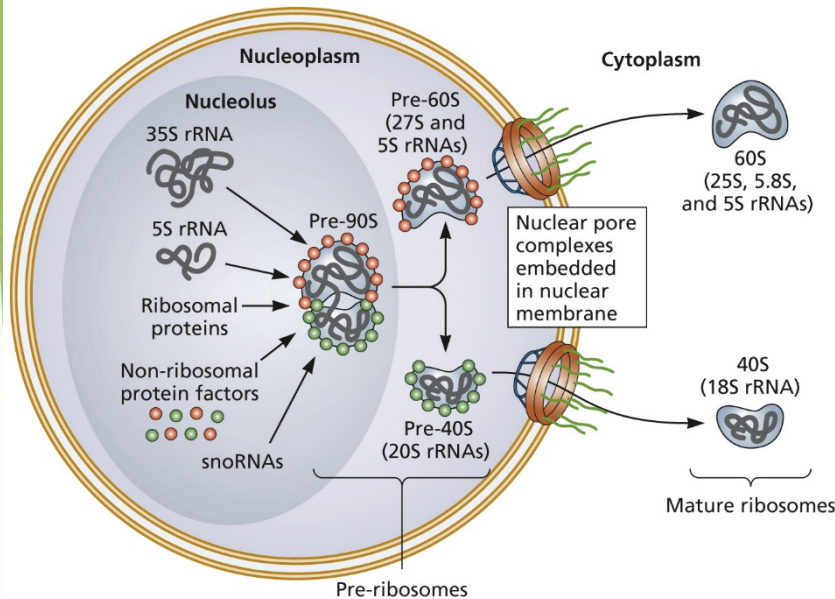


Figure 15.23 Molecular Biology (© Garland Science 2016)

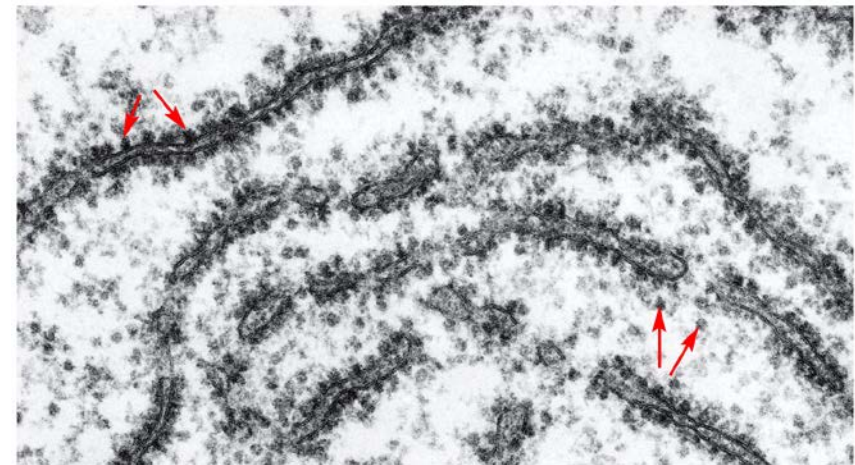


Figure 6-60 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

400 nm



Struktura ribozómu

- ▶ **eukaryotický ribozóm (80S)** – 4 rRNA (ribozomy) a cca 80 proteinů;
- ▶ **mitochondriální ribozóm savců (55S)** – velmi odlišný – nízké množství rRNA (12S – malá podjednotka; 16S – velká podjednotka, menší chem. modif.) a velmi mnoho proteinů;

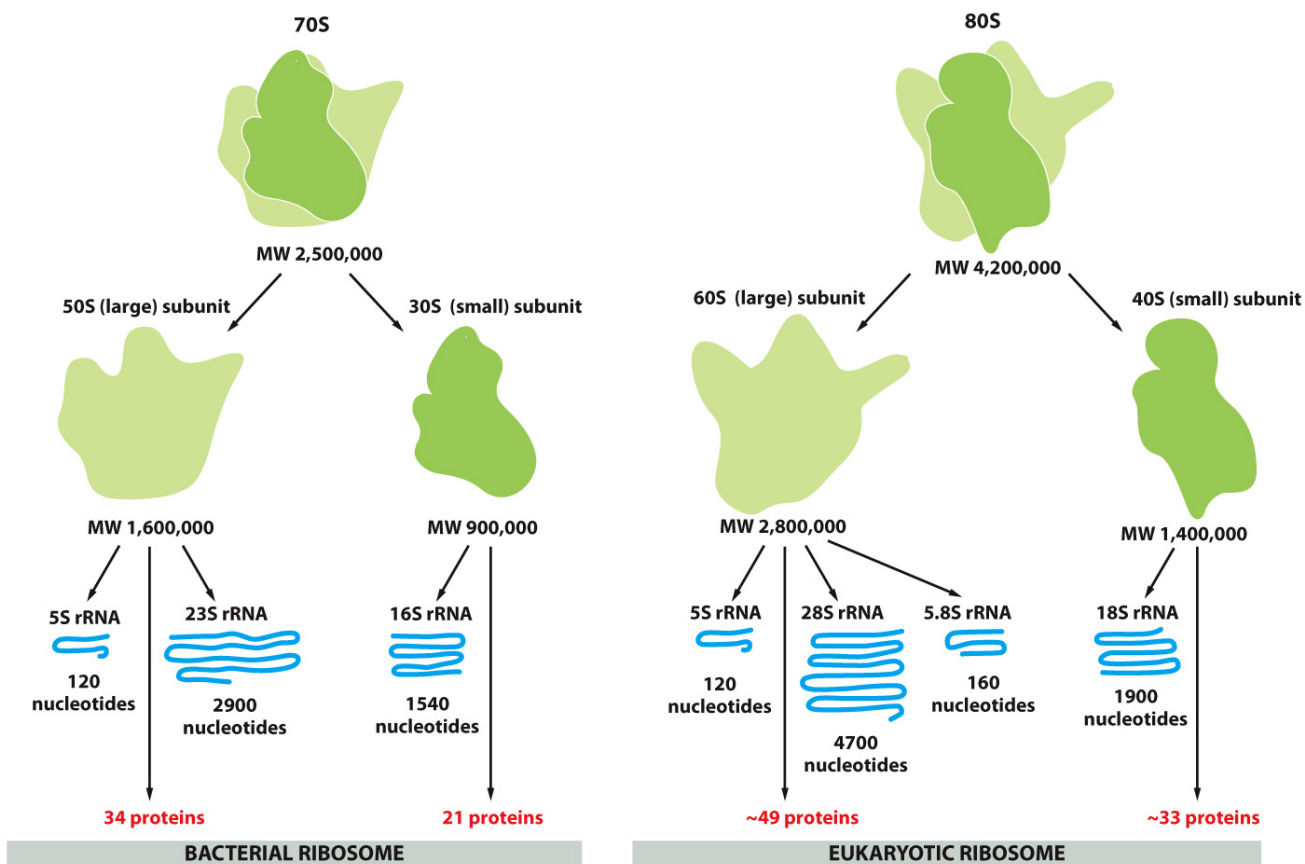


Figure 6-61 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Struktura ribozómu

- ▶ **eukaryotický ribozóm** – 4 vazebná místa pro RNA – 1 pro mRNA a 3 pro tRNA; správný čtecí rámec je zajištěn těsnou vazbou dvou sousedících molekul tRNA (A a P místo) na sousedící kodony na mRNA;

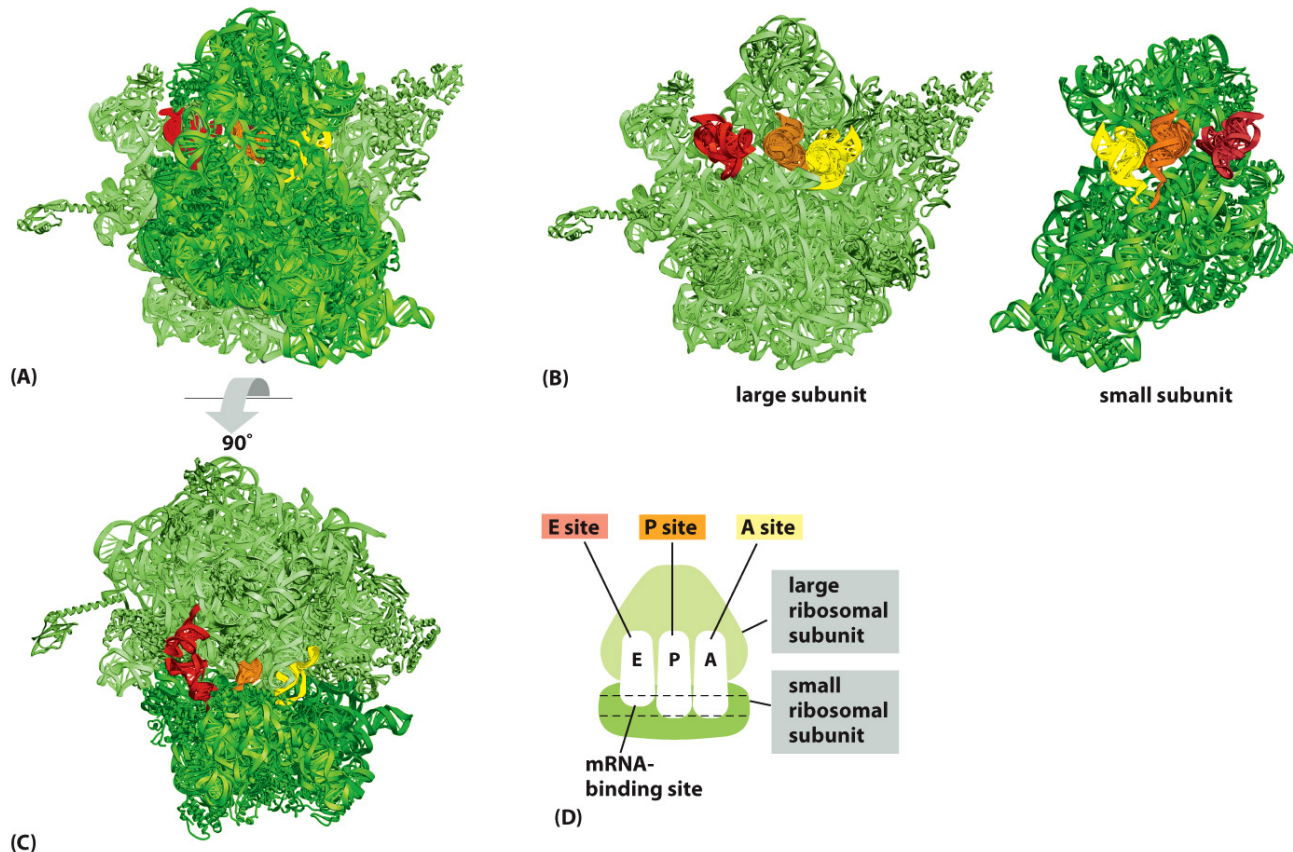


Figure 6-62 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Translace – 4 základní kroky

- **krok 1** – vazba tRNA;
- **krok 2** – tvorba peptidové vazby – uvolnění karboxylového konce peptidu z tRNA a jeho spojení s N-koncem nové AA – reakce katalyzovaná peptidyl transferázou velké podjednotky;
- **krok 3** – translokace velké podjednotky – posun E a P místa;
- **krok 4** – translokace malé podjednotky spojená s uvolněním tRNA;
- rychlost – cca 2 AA/s;
- účinnost a přesnost je závislá na elongačních faktorech – EF1 a EF2;

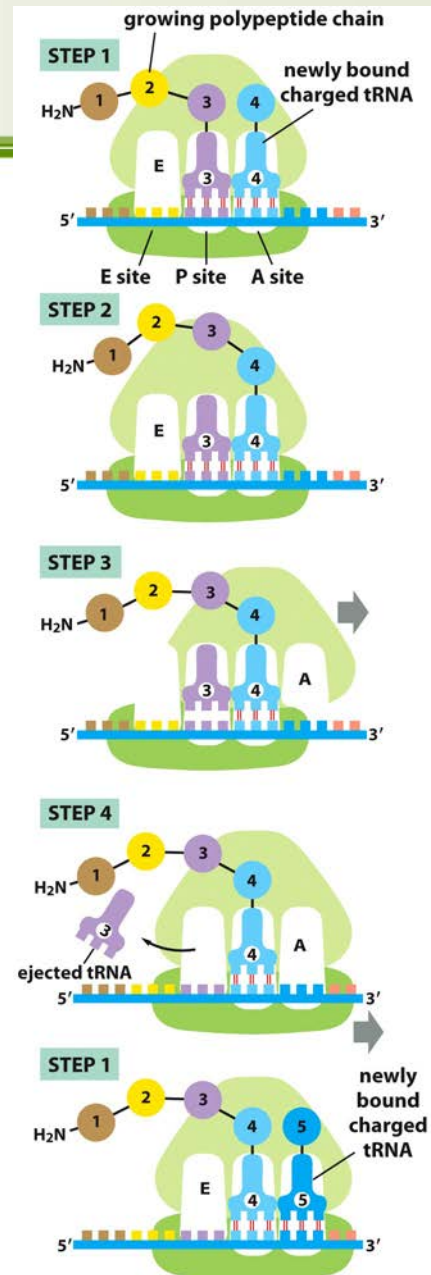


Figure 6-64 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Translace probíhá na polyribozómech

- ▶ syntéza proteinu – desítky sekund až několik minut; pro zrychlení procesu – mnohonásobná iniciace – **polyribozómy (polyzómy)** oddělené cca 80 nukleotidy;
- ▶ eukaryotická mRNA – interakce 5' a 3' konce – **po disociaci ribozómu může ihned dojít k re-iniciaci translace;**

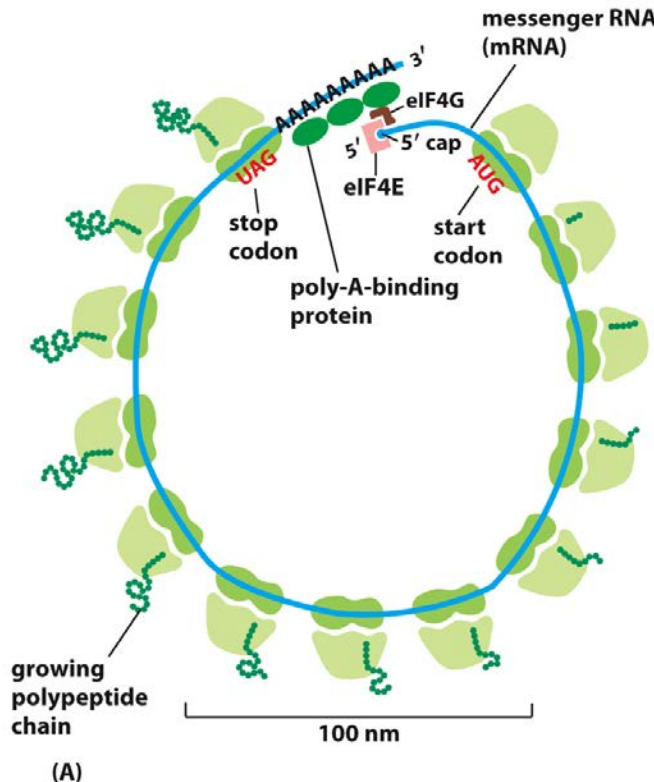
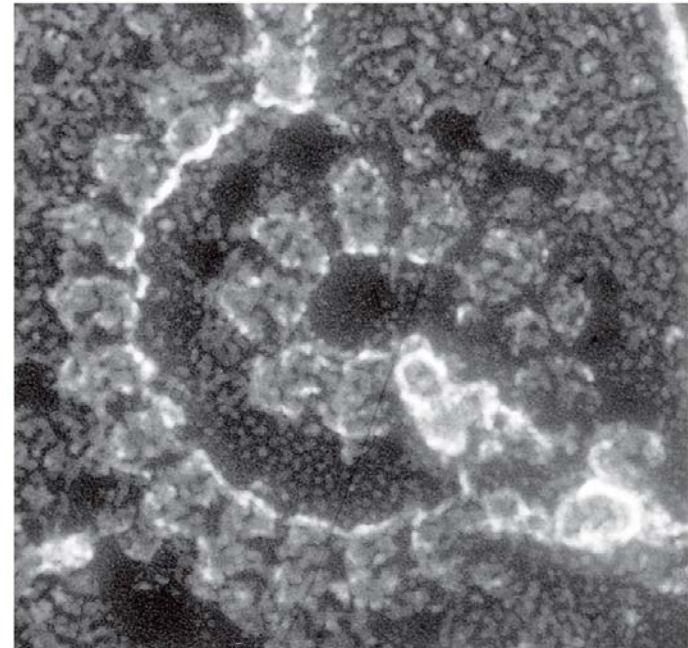


Figure 6-73 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



100 nm

Figure 6-73b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Antibiotika umožňují studium významu dynamiky syntézy proteinů

- stabilita mRNA i proteinu zásadním způsobem ovlivňuje hladinu proteinu v buňce;
- možnost využití specifických inhibitorů;

TABLE 6-4 Inhibitors of Protein or RNA Synthesis

Inhibitor	Specific effect
Acting only on bacteria	
Tetracycline	Blocks binding of aminoacyl-tRNA to the A site of ribosome
Streptomycin	Prevents the transition from translation initiation to chain elongation and also causes miscoding
Chloramphenicol	Blocks the peptidyl transferase reaction on ribosomes (step 2 in Figure 6-64)
Erythromycin	Binds in the exit channel of the ribosome and thereby inhibits elongation of the peptide chain
Rifamycin	Blocks initiation of RNA chains by binding to RNA polymerase (prevents RNA synthesis)
Acting on bacteria and eukaryotes	
Puromycin	Causes the premature release of nascent polypeptide chains by its addition to the growing chain end
Actinomycin D	Binds to DNA and blocks the movement of RNA polymerase (prevents RNA synthesis)
Acting on eukaryotes but not bacteria	
Cycloheximide	Blocks the translocation reaction on ribosomes (step 3 in Figure 6-64)
Anisomycin	Blocks the peptidyl transferase reaction on ribosomes (step 2 in Figure 6-64)
α -Amanitin	Blocks mRNA synthesis by binding preferentially to RNA polymerase II

The ribosomes of eukaryotic mitochondria (and chloroplasts) often resemble those of bacteria in their sensitivity to inhibitors. Therefore, some of these antibiotics can have a deleterious effect on human mitochondria.

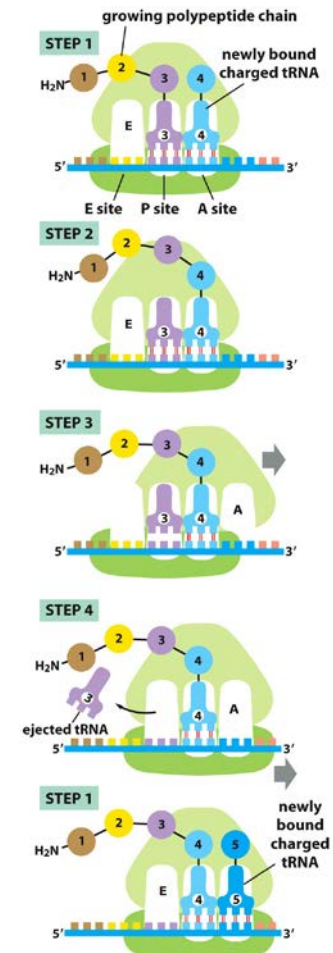
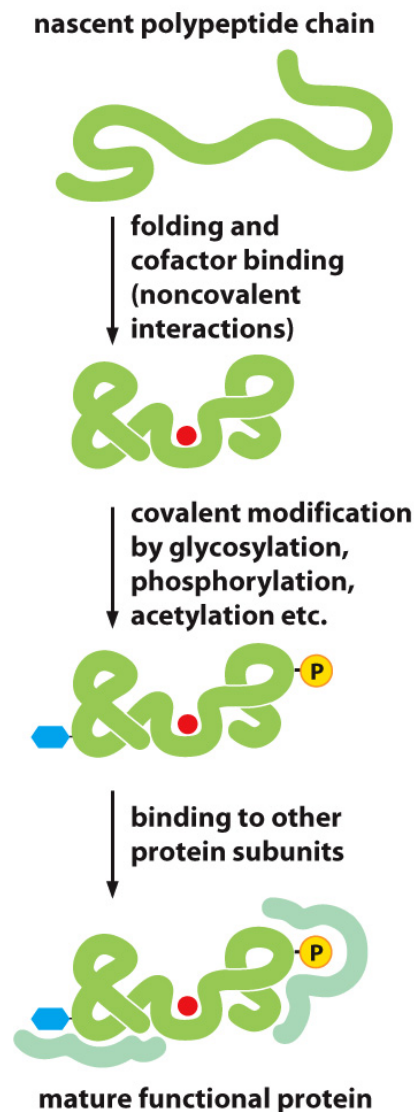


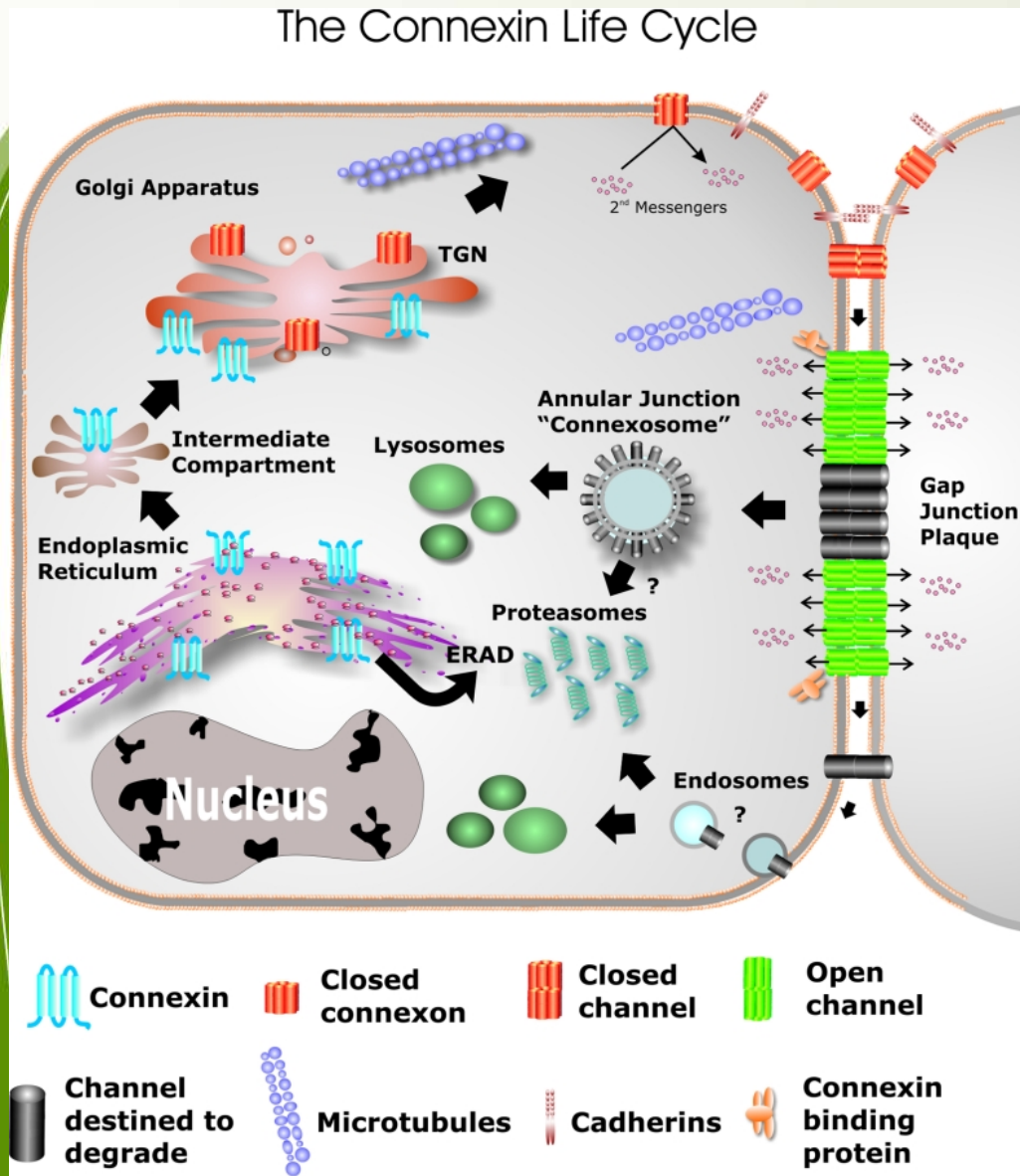
Figure 6-64 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Životní cyklus proteinu

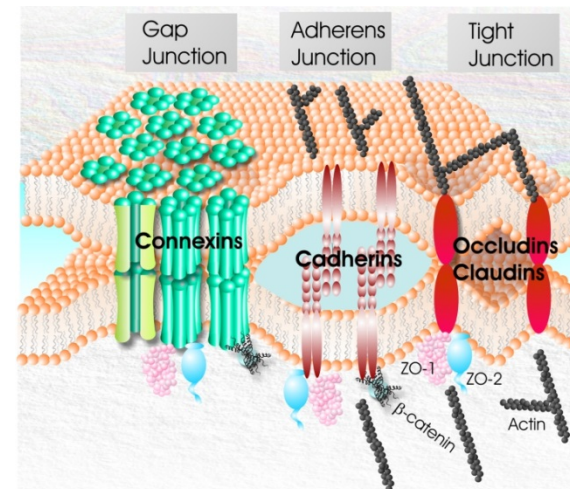
- ▶ po syntéze proteinu musí dojít k jeho **dalším úpravám** zahrnujícím jeho **složení** do správné trojrozměrné struktury, tvorbě **post-translačních modifikací** (včetně např. štěpení proteinu vedoucího ke vzniku aktivního proteinu), vazbu malých molekul (ko-faktorů), **transport a začlenění do správné organely** (buň. struktury), vazbě na partnerské proteiny vytvářející multiproteinové komplexy nebo regulující funkci proteinu;
- ▶ naopak proteiny, které jsou již nefunkční, poškozené, mají nesprávnou strukturu jsou degradovány 2 základními mechanismy – štěpením v **proteazómu** nebo **lysozómu**; oba typy degradace jsou zároveň součástí zpětněvazebných regulací;
- ▶ konečným osudem proteinu nemusí být jeho degradace – buňky **recyklují řadu proteinů**;



Životní cyklus proteinu - příklad - konexin

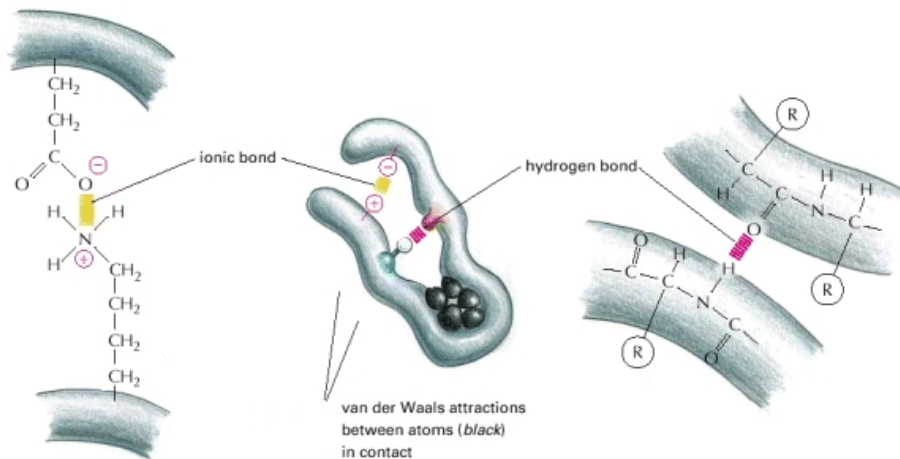


- **konexiny** – součást komplexu vytvářejícího mezervé spoje (gap junctions), umožňujících přenos malých molekul mezi buňkami;



Skládání proteinu (protein folding)

- ▶ po syntéze proteinu musí dojít k jeho složení do správné trojrozměrné struktury; informace pro správné složení je obsažena v primární struktuře (sekvenci AA);
- ▶ dochází k vytvoření kompaktní struktury – protein prostřednictvím nekovalentních interakcí zaujímá konformaci minimalizující volnou energii; ve vodném prostředí jsou hydrofóbní AA soustředěny uvnitř proteinu, zatímco polární AA v blízkosti povrchu, kde vytvářejí vodíkové můstky s vodou, dalšími molekulami, nebo uvnitř – vzájemné vazby AA;



Skládání proteinu (protein folding)

- ▶ ke skládání proteinu může dojít různým způsobem – nejjednodušší je varianta, kdy dochází ke skládání proteinu již v průběhu translace;
- ▶ to nemusí být finální struktura – vzniká forma označovaná jako „molten globule“ ve které probíhají další drobné přestavby a přizpůsobování struktury – relativně pomalý proces;

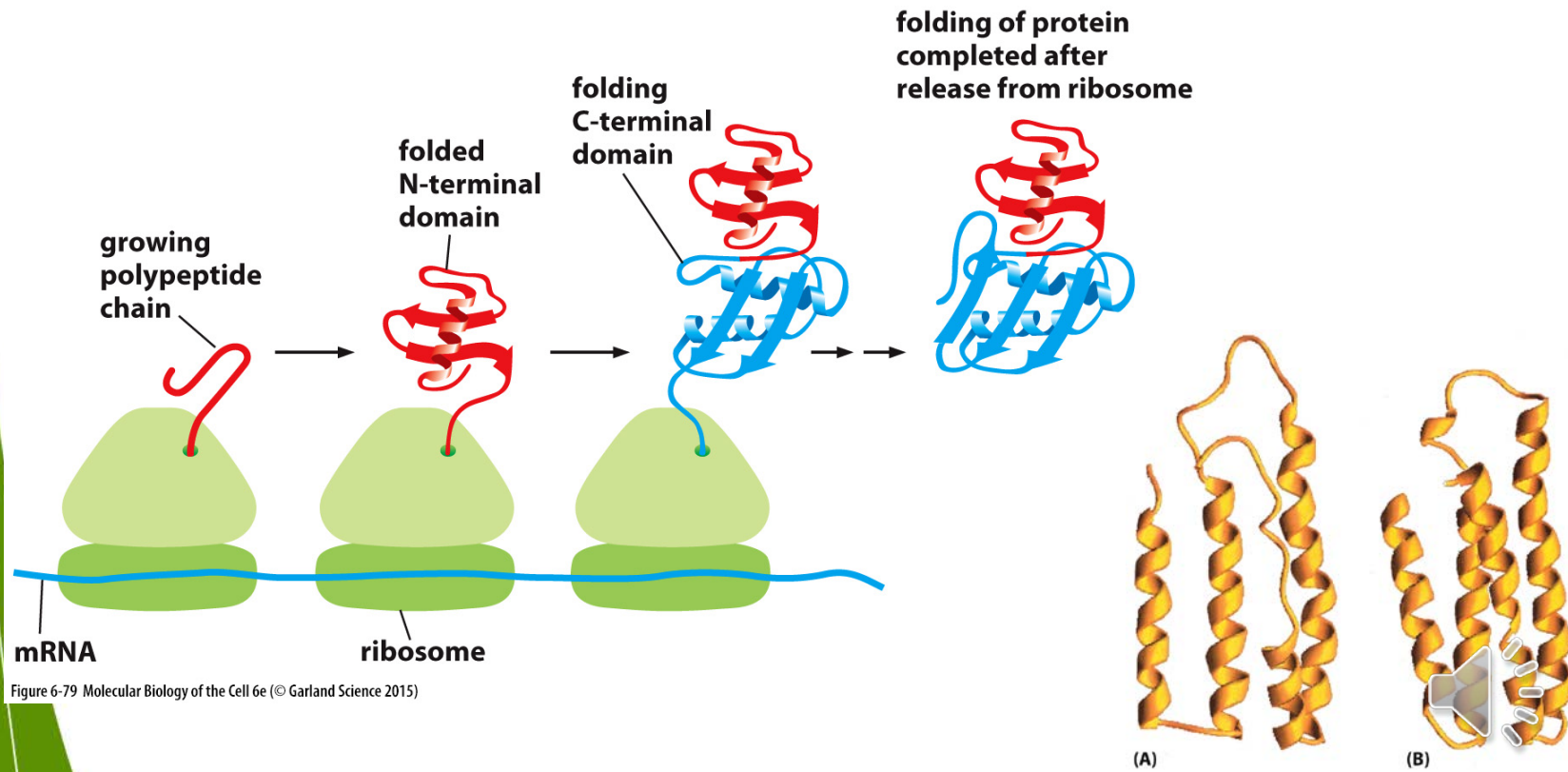


Figure 6-79 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Molekulární chaperony

- ▶ většina proteinů využívá ke správnému složení specializované proteiny – **molekulární chaperony**; umožňují správné sbalení proteinu – bez nich by mohly vznikat potenciálně nebezpečné struktury a agregáty;
- ▶ chaperony rozpoznávají a vážou se na hydrofobní povrchy proteinů – umožňují správné složení, mohou rozpoznávat nesprávně složené proteiny, nebo mohou proteiny stabilizovat v určité konformaci (např. inaktivní receptory apod.);
- ▶ největší skupina – **heat-shock proteins (hsp)** – proteiny teplotního šoku (jejich hladina v buňce prudce narůstá při zvýšené teplotě);
- ▶ **hsp60 a hsp70** – hlavní rodiny – různé typy v jednotlivých organelách – specializované hsp60 a hsp70 např. v mitochondriích, BiP (speciální hsp70 v ER);
- ▶ obě skupiny se liší mechanismem svého působení – obě skupiny mají společné vlastnosti vysokou afinitu k hydrofobním úsekům (hydrophobic patches) proteinů, využívají hydrolýzu ATP k vazbě a uvolnění proteinu;
- ▶ vedle těchto proteinů je v buňkách i velké množství dalších specializovaných chaperonů;



hsp70

- ▶ působí velmi brzy – často je protein ještě navázaný na ribozóm;
- ▶ monomery hsp 70 se vážou na krátké (4-5 AA) úseky a využívají energii ATP k nasměrování správného složení proteinu;

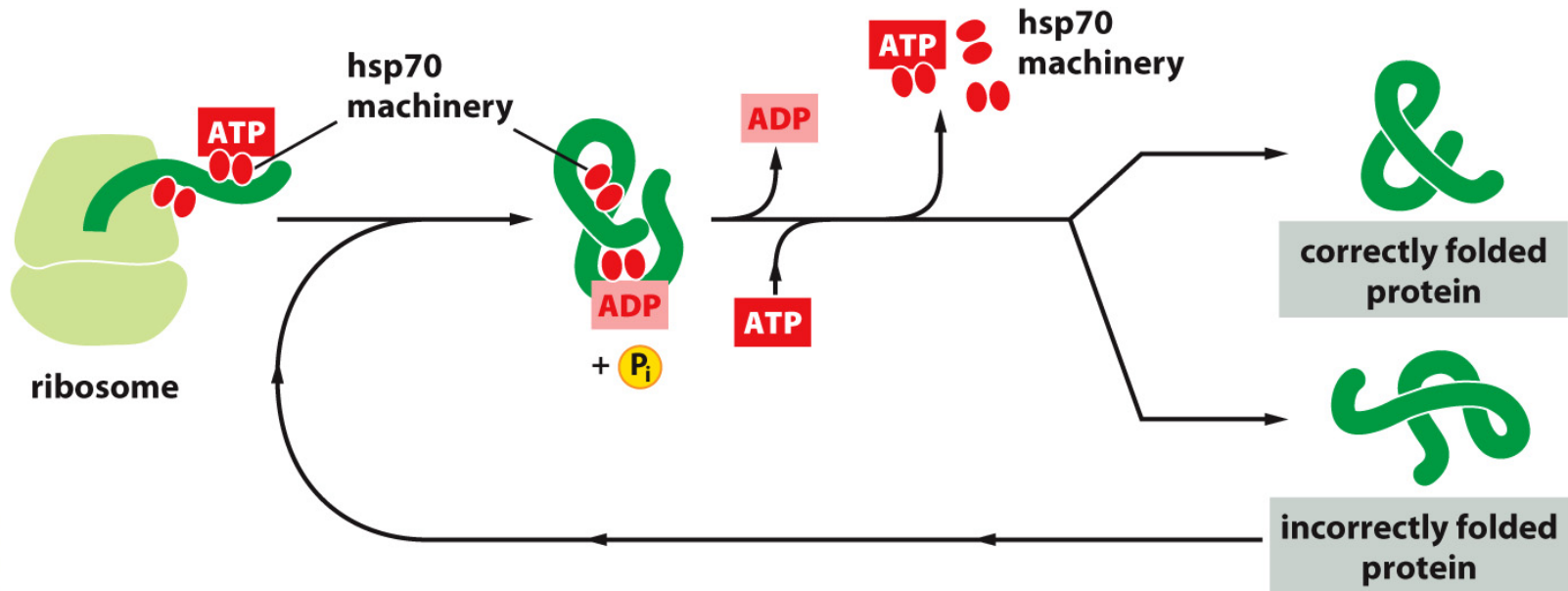


Figure 6-80 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



hsp60 (chaperoniny)

- ▶ působí později – po uvolnění z ribozómu; protein je zachycen prostřednictvím hydrofobních interakcí (během první vazby často dochází k **rozbalení** proteinu) – přenesen dovnitř (hydrofilní povrch) a uzavřen víčkem (uzavření využívá ATP) – po dobu cca 10 s je mu umožněno znovu se složit;
- ▶ poté dojde znovu s využitím ATP k uvolnění víčka a proteinu;
- ▶ hsp60 je v buňce přítomen v různých formách – jako hsp60 v mitochondriích, TCP1 v cytosolu;

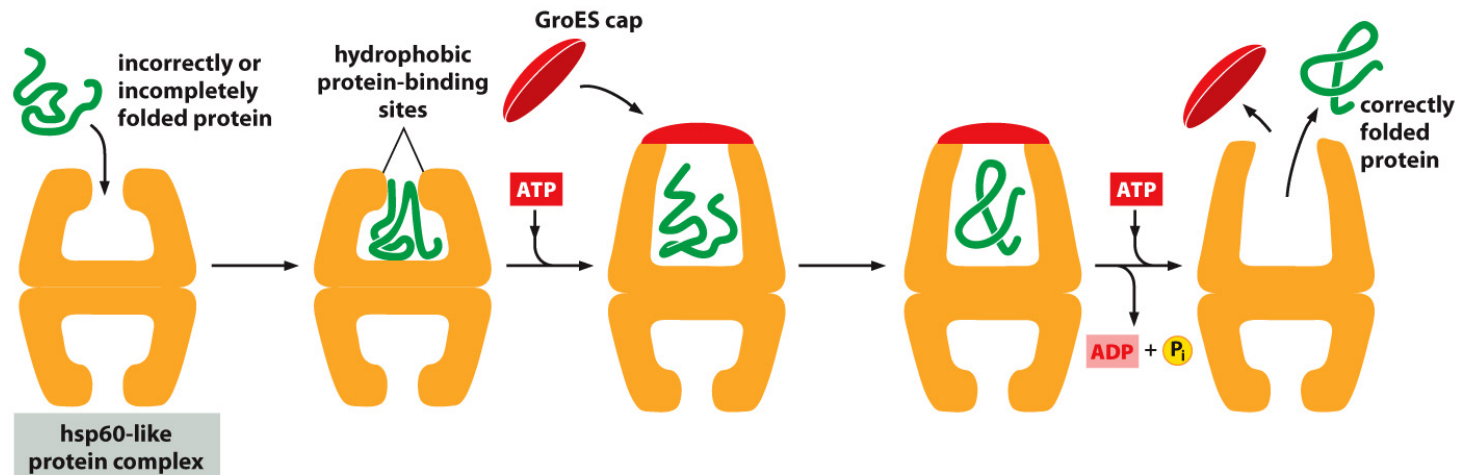


Figure 6-81a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Post-translační modifikace

- vedle správného složení proteinu mají zásadní význam pro jeho další osud a funkci také **post-translační modifikace**;
- zásadním způsobem ovlivní vlastnosti AA a tedy i strukturu proteinu;
- buněčná signalizace;

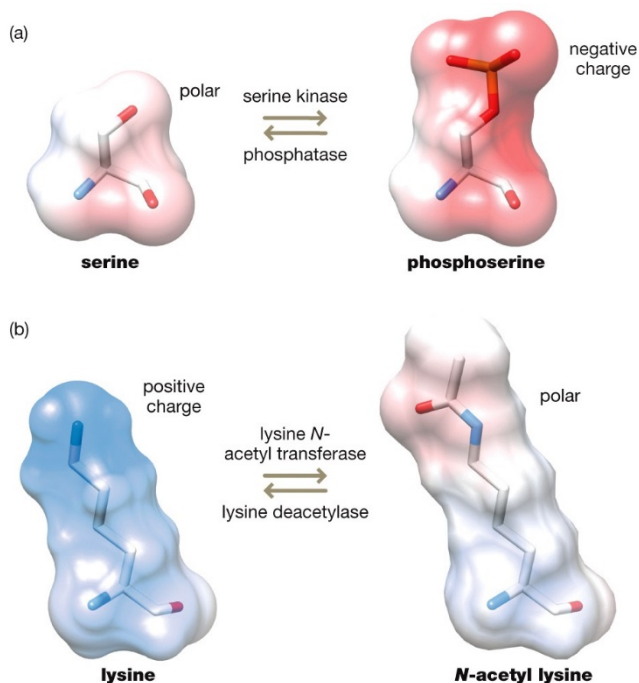
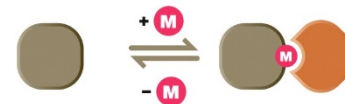


Figure 4.3 Cell Signaling (© Garland Science 2015)

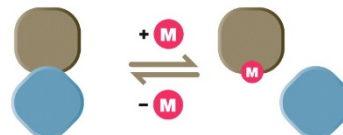
(a) **change conformation, activity**



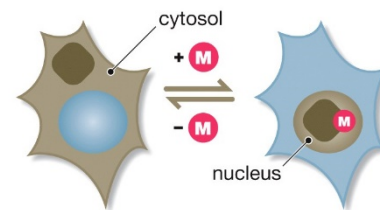
(b) **promote protein binding**



(c) **prevent protein binding**



(d) **change subcellular localization**



(e) **change proteolytic stability**

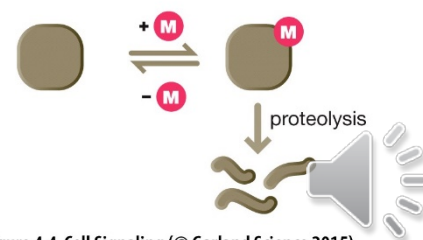


Figure 4.4 Cell Signaling (© Garland Science 2015)

Post-translační modifikace

- hlavní typy – fosforylace (Ser, Thr, Tyr), methylace (Lys), acetylace (Lys), palmitoylace (Cys), N-acetylglukosamin (Ser, Thr), ubikvitin (Lys);
- mnoho dalších;
- řada proteinů může být modifikována na mnoha místech – velmi přesná regulace;

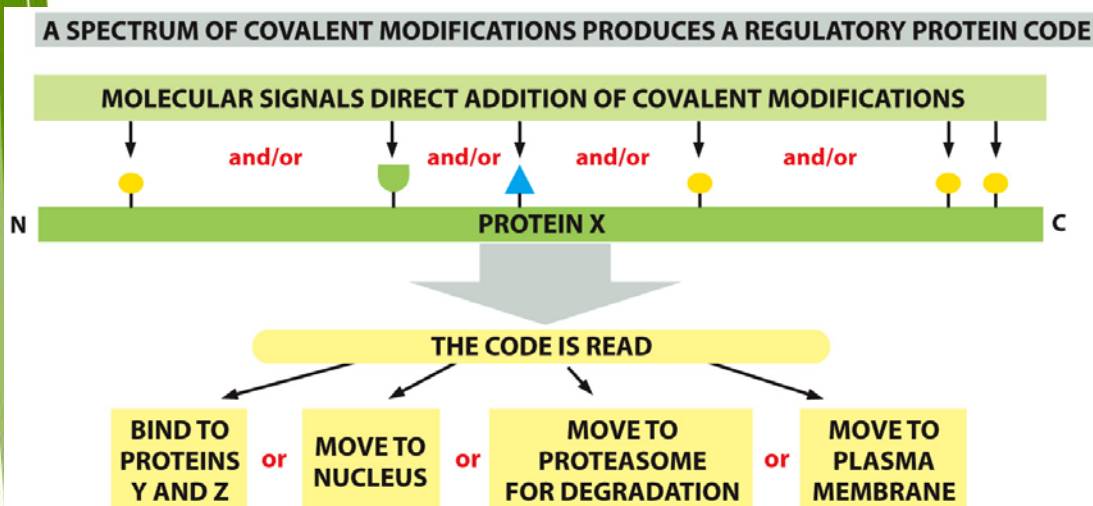


Figure 3-79a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

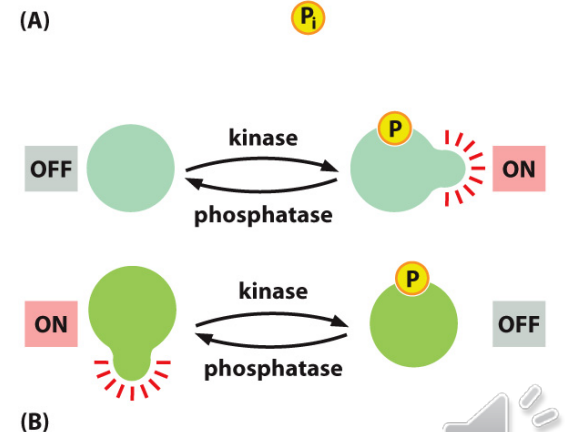
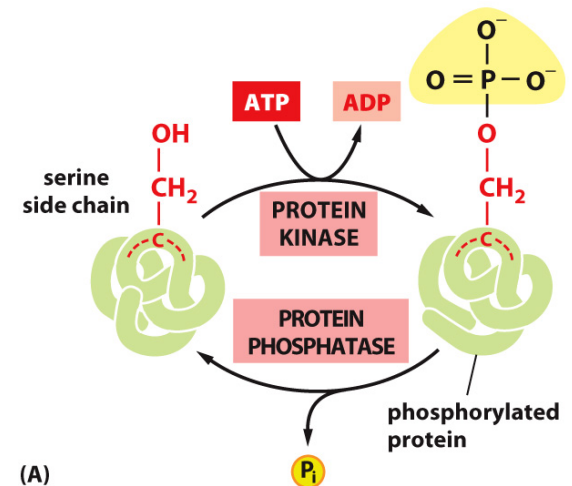


Figure 3-61 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Přesun proteinů do cílového místa (organely)

- ▶ buněčné organely představují oddělené kompartmenty do kterých jsou proteiny transportovány 3 základními mechanismy:
 - „gated transport“ – jaderný pór;
 - prostřednictvím translokace proteinů – specifické proteinové translokátory – např. do mitochondrií, ER;
 - vezikulární transport;
 - každý protein obsahuje „sorting signal“ rozpoznávaný specifickými receptory;

TABLE 12-3 Some Typical Signal Sequences

Function of signal sequence	Example of signal sequence
Import into nucleus	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Export from nucleus	-Met-Glu-Glu-Leu-Ser-Gln-Ala-Leu-Ala-Ser-Ser-Phe-
Import into mitochondria	*H ₃ N-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Import into plastid	*H ₃ N-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala-Ser-Leu-Gln-Ser-Ser-Met-Ser-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Ser-Asn-Ser-Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu-Ser-Pro-Ile-Thr-Leu-Ser-Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
Import into peroxisomes	-Ser-Lys-Leu-COO ⁻
Import into ER	*H ₃ N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Return to ER	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO ⁻

Some characteristic features of the different classes of signal sequences are highlighted in color. Where they are known to be important for the function of the signal sequence, positively charged amino acids are shown in red and negatively charged amino acids are shown in green. Similarly, important hydrophobic amino acids are shown in orange and important hydroxylated amino acids are shown in blue. *H₃N indicates the N-terminus of a protein; COO⁻ indicates the C-terminus.



Transport proteinů do mitochondrií

- ▶ **mitochondriální proteiny kódované jadernou mRNA** jsou tvořeny na cytosolových ribozomech – transport do **specifického mit. subkompartmentu; kompartmentalizace mitochondrií hraje významnou roli v jejich funkci** - vnější membrána vybavená poriny je volně propustná pro malé molekuly (malé metabolity – např. součást citrátového cyklu), zatímco matrix je oddělena vnitřní membránou, která umožňuje přenos malých molekul a iontů pouze pomocí specializovaných membránových transportérů – tvorba elektrochemického gradientu a potenciálu);
- ▶ signální sekvence – na N-konci (po přechodu do mitochondrií je odstraněna signální peptidázou) nebo uvnitř sekvence;

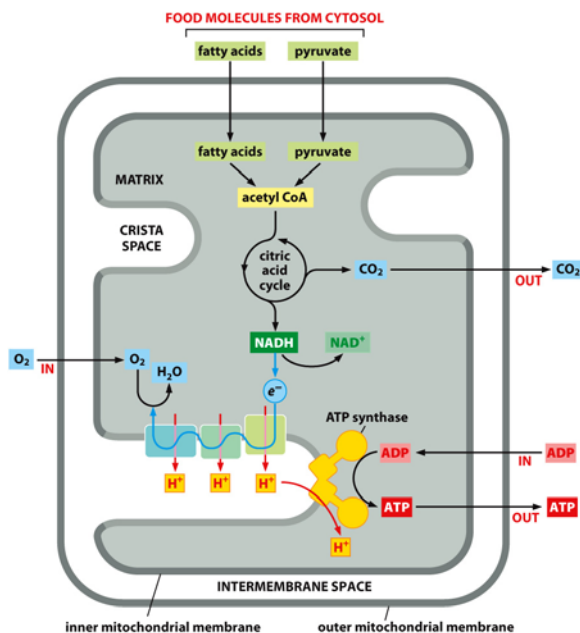


Figure 14-10 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

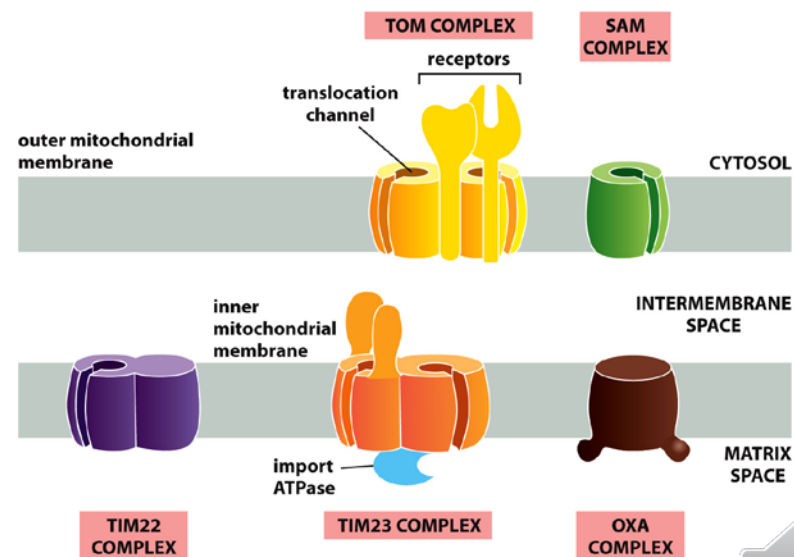


Figure 12-21 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Transport proteinů do mitochondrií

- ▶ **mitochondriální proteiny kódované jadernou mRNA nejsou skládány do finální konformace**, ale zůstávají nesložené (navázané na hsp70 či specializované proteiny vázané na sign. sekvenci);
- ▶ **vážou se na receptory pro import** (součást komplexu TOM) – protein poté přechází do translokačního kanálu; TOM a TIM komplexy mohou přenášet protein současně až do mit. matrix, ale ten může také interagovat s dalšími proteiny a začlenit se do vnější nebo vnitřní mit. membrány;

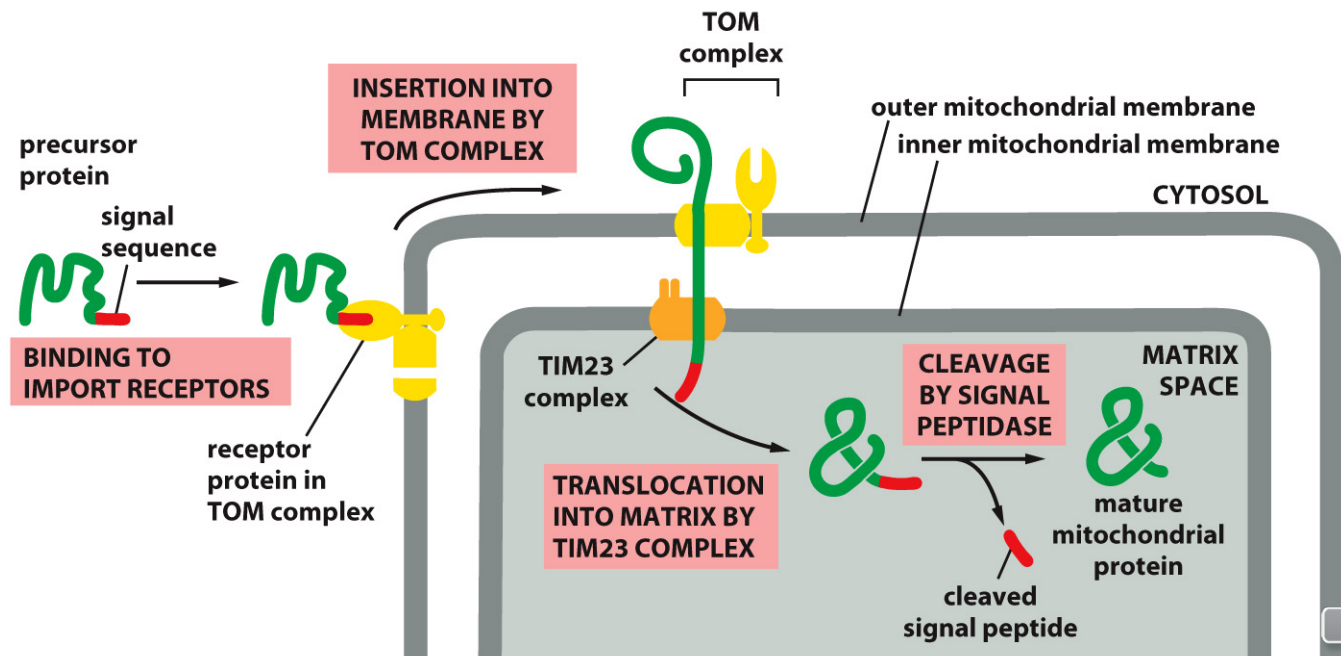


Figure 12-22 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Transport proteinů do mitochondrií

- ♦ **transport vyžaduje energii** – štěpení ATP – pro uvolnění chaperonů; gradient umožňuje přenos pozitivně nabitě signální sekvence do matrix;
- ♦ na vnitřní straně vnitřní membrány – **mitochondriální hsp70** – s využitím energie váže a uvolní nesložený protein – ten následně interaguje s **mitochondriálním hsp60** – je složen do finální podoby;

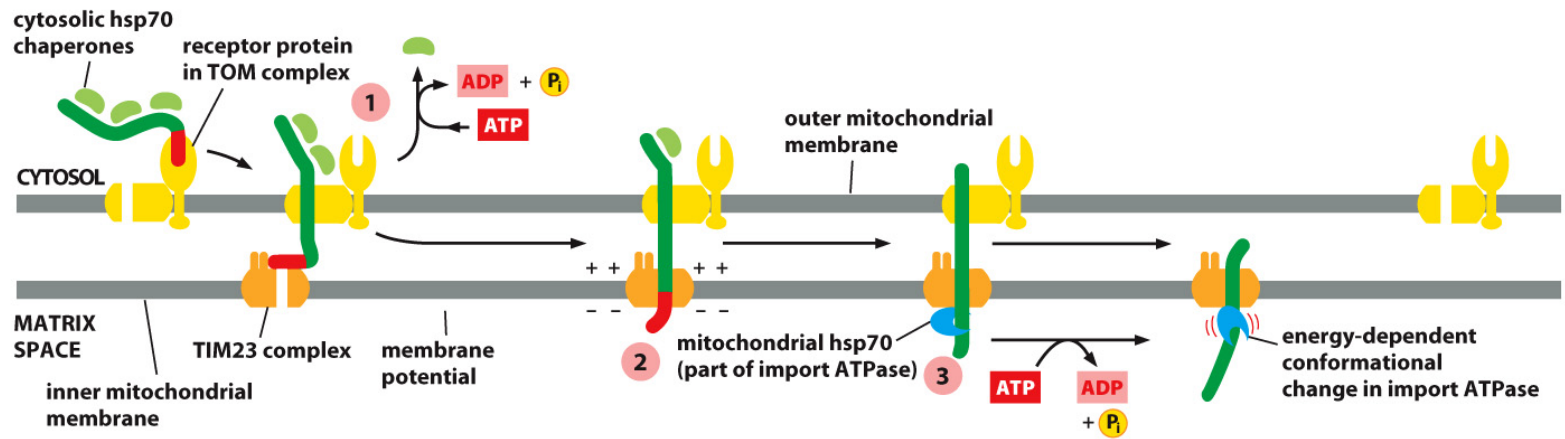


Figure 12-23 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Začlenění proteinů do vnější a vnitřní mit. membrány

- do vnější mit. membrány jsou **proteiny začleněny prostřednictvím struktur α -helixů nebo** (poriny – proteiny umožňující přechod malých molekul) působením specializovaných chaperonů v mezimembránovém prostoru a pomocí komplexu SAM;
- pro proteiny určené pro mezimembránový prostor nebo vnitřní membránu existuje řada mechanismů:

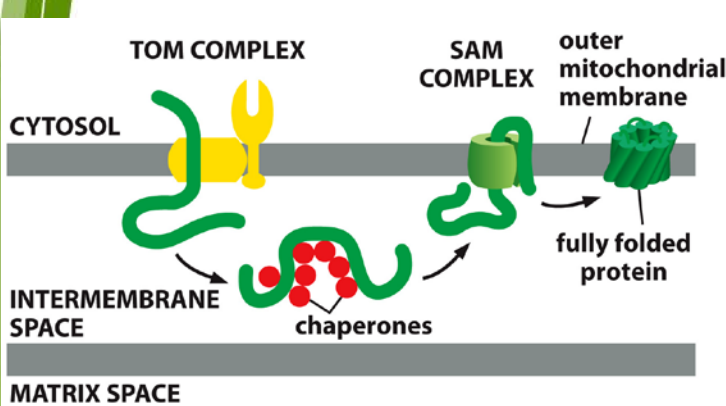


Figure 12-24a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

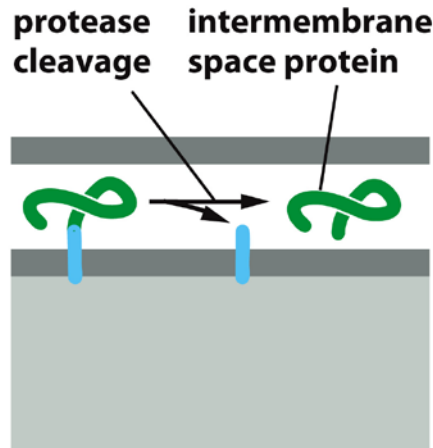


Figure 12-25c Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

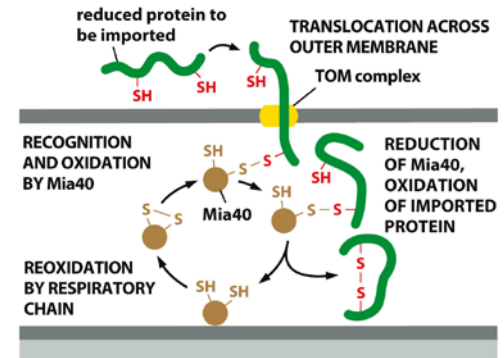


Figure 12-24d Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

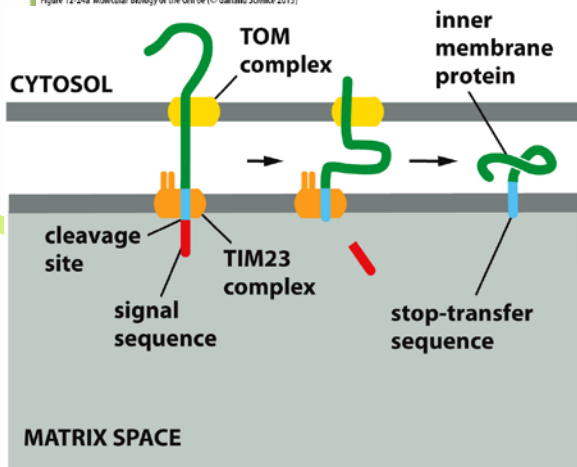


Figure 12-25a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

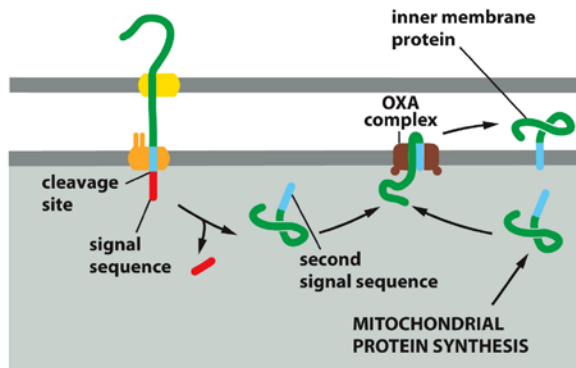


Figure 12-25b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

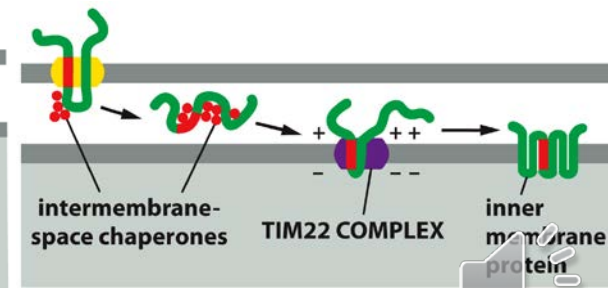
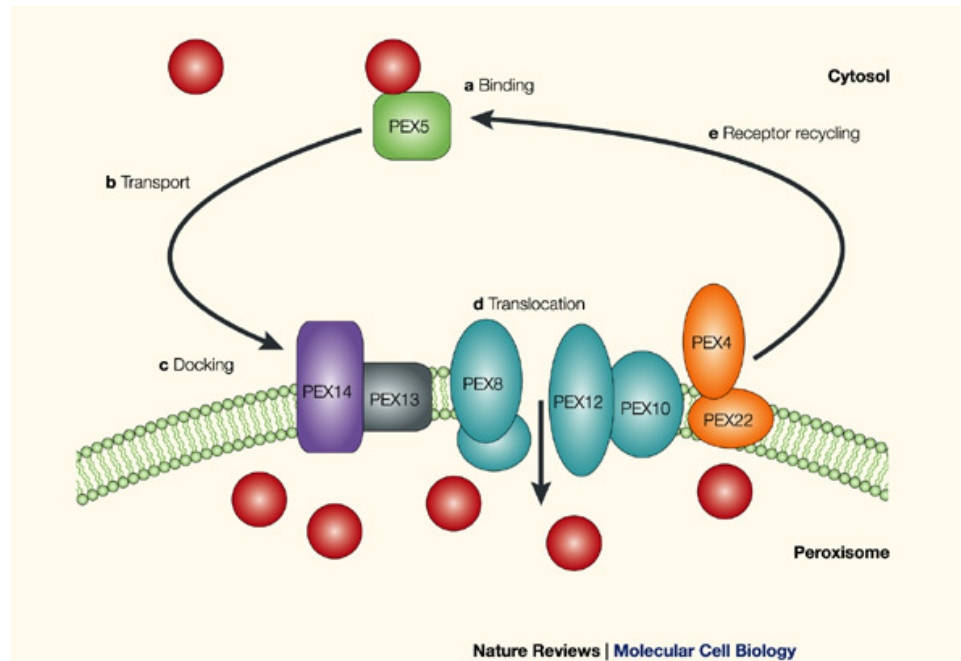


Figure 12-25e Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Transport proteinů do peroxizómů

- ▶ peroxizomální proteiny jsou většinou syntetizovány na cytosolových polyzómech;
- ▶ specifická sekvence – **Ser-Leu-Lys** – PTS1 - na C-konci peroxizomálních proteinů (rozpoznávána Pex5) sekvence PTS2 na N-konci (rozpoznávána Pex7);
- ▶ rozpoznávány specifickými cytosolovými receptory – následný import je umožněn **peroxiny** – vytvářejí velký komplex umožňující transport složených proteinů;
- ▶ cytosolový Pex5 funguje jako cytosolový receptor – po transporu peroxizomálního proteinu je uvolněn zpět do cytoplazmy (pomocí hydrolýzy);
- ▶ menší část peroxizomálních proteinů je importována i z ER;



Transport proteinů do endoplazmatického retikula (ER)

- ▶ první signální sekvence určující lokalizaci proteinů byly popsány u ER;
- ▶ **ER přijímá proteiny již v průběhu jejich syntézy**– jejich další osud závisí na typu proteinu – **membránový vs. solubilní**;
- ▶ membránové proteiny jsou ihned **začleněny do membrány ER**, zatímco solubilní proteiny jsou translokovány do lumen ER;
- ▶ **ER signaling sequence** je rozpoznána komplexem „**signal-recognition particle**“ (SRP) – rozeznává ribozóm syntetizující protein – naváže se na ribozóm, zastaví translaci
- ▶ po navázání na signální sekvenci dojde k odhalení vazebného místa pro SRP receptor na membráně ER, připojení proteinového translokátoru a postupnému přenosu rostoucího polypeptidového řetězce do ER;

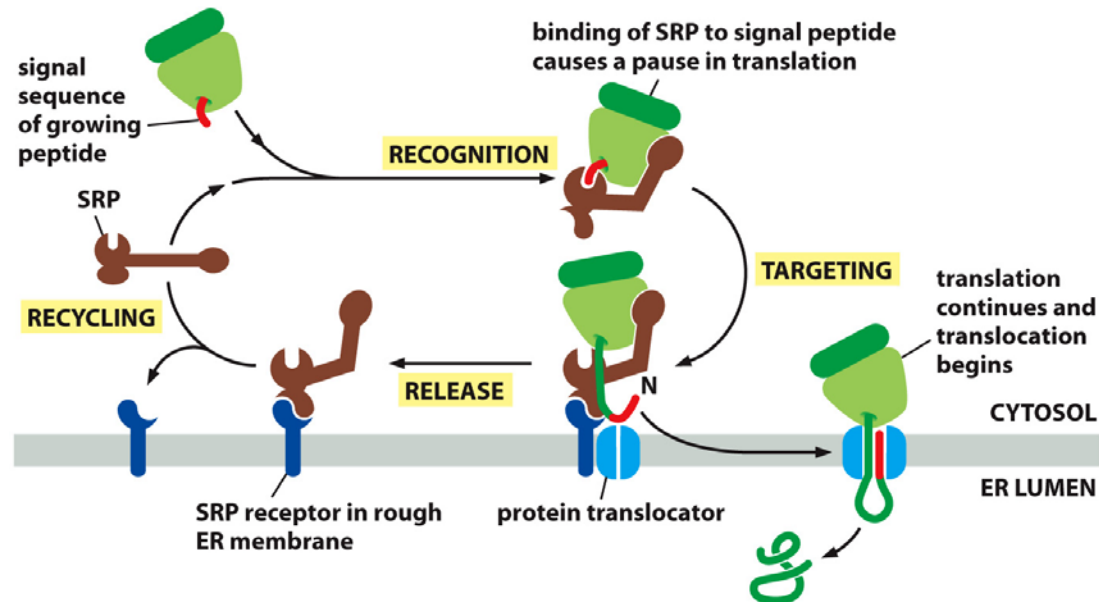


Figure 12-37 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Transport proteinů do ER

- ▶ existence dvou různých populací ribozómů: cytosolových a membránových;
- ▶ translokace proteinů do mitochondrií a peroxizómů probíhá **post-translačně**;
- ▶ translokace do ER **ko-translačně**;
- ▶ některé proteiny mohou být do ER transportovány až po skončení translace;

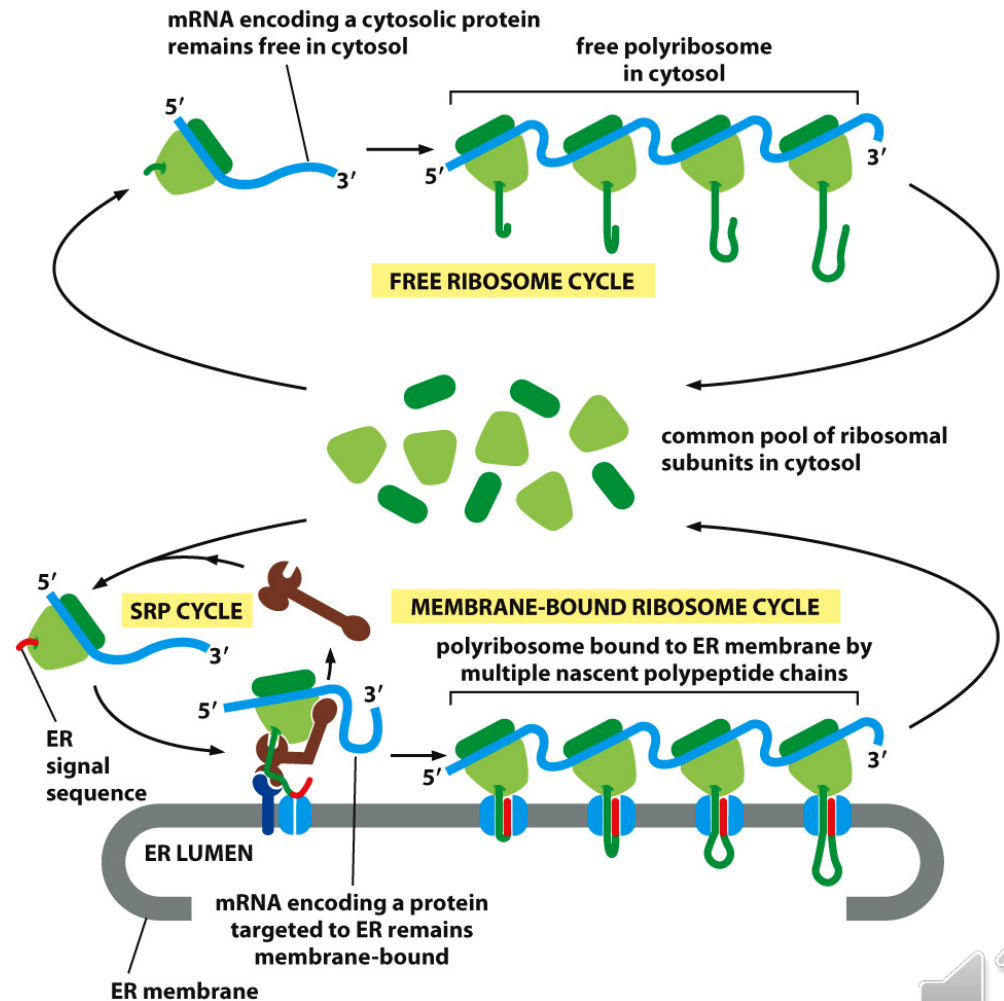


Figure 12-38a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Transport proteinů do ER

- ▶ některé proteiny mohou být do ER transportovány až po skončení translace – na vnitřní straně membrány ER působí specifický hsp70 protein – BiP (binding protein) – ten s využitím štěpení ATP střídavě váže a uvolňuje protein – podobně jako mitochondriální hsp70;

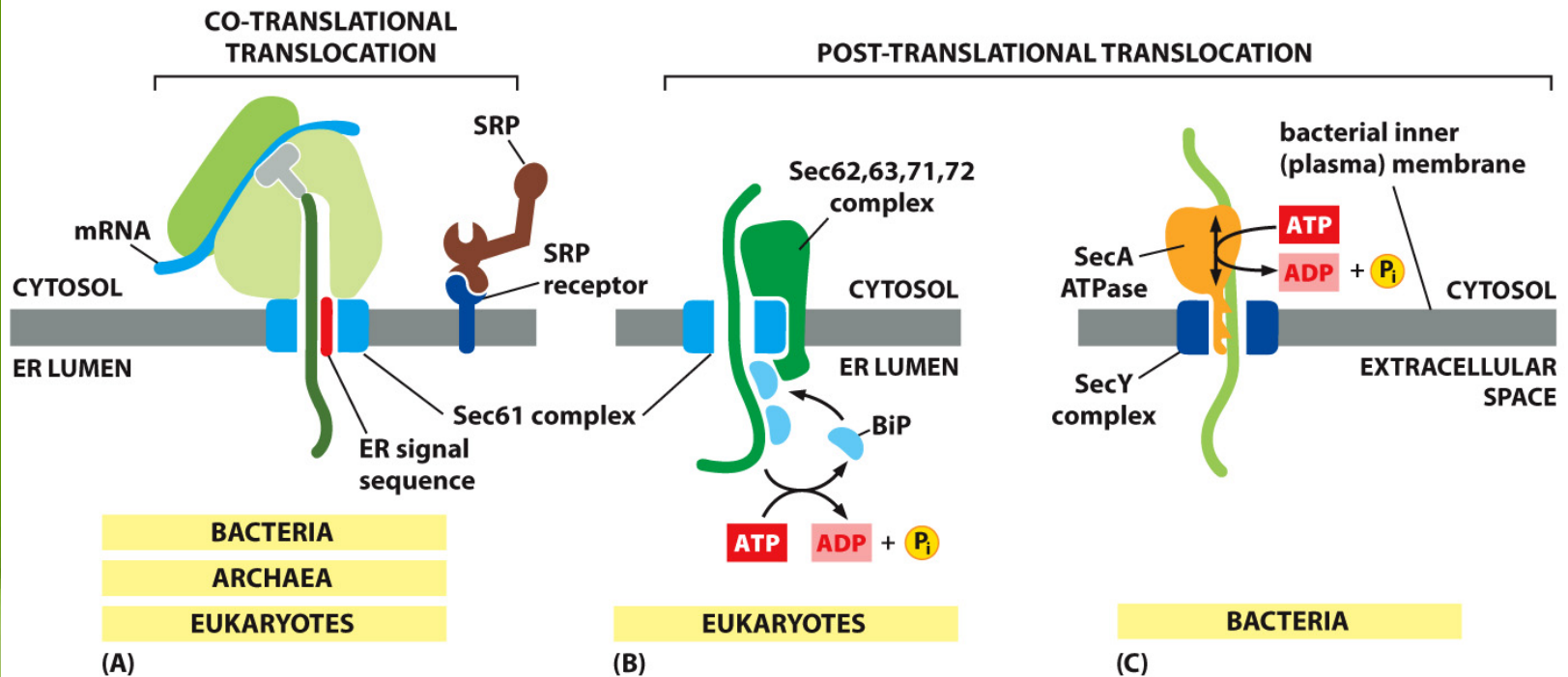


Figure 12-41 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Transport membránových proteinů do ER

- interakce signálního peptidu s komplexem Sec61 udržuje pór otevřený; u solubilních proteinů dojde po jeho odštěpení k uzavření póru a uvolnění proteinu do lumen;

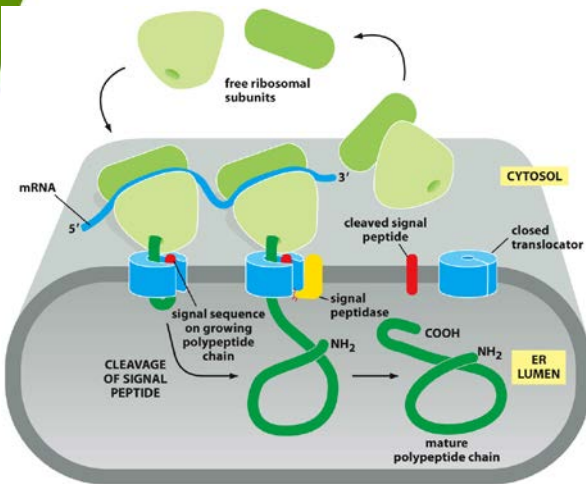


Figure 12-35 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

- u membránových proteinů – hydrofobní **stop-transfer** signál - inkorporuje protein do membrány;

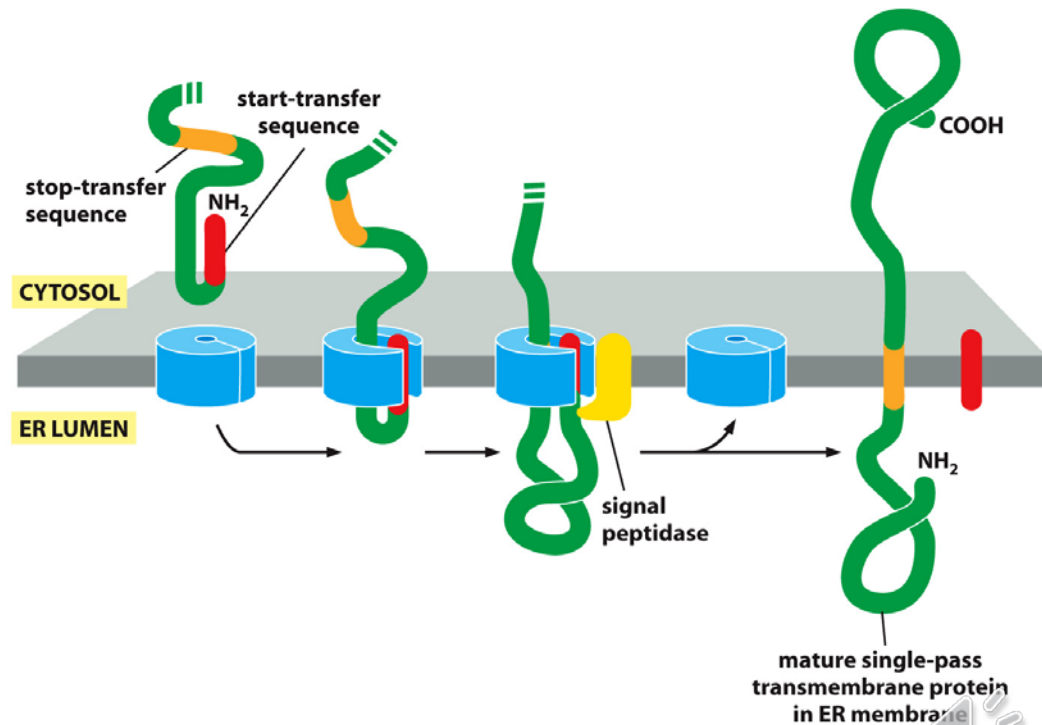


Figure 12-42 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

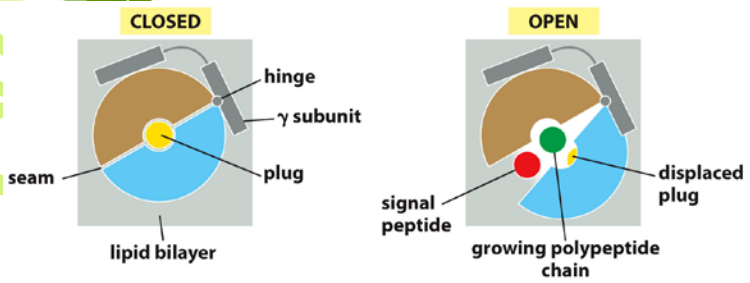


Figure 12-39b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Transport membránových proteinů do ER

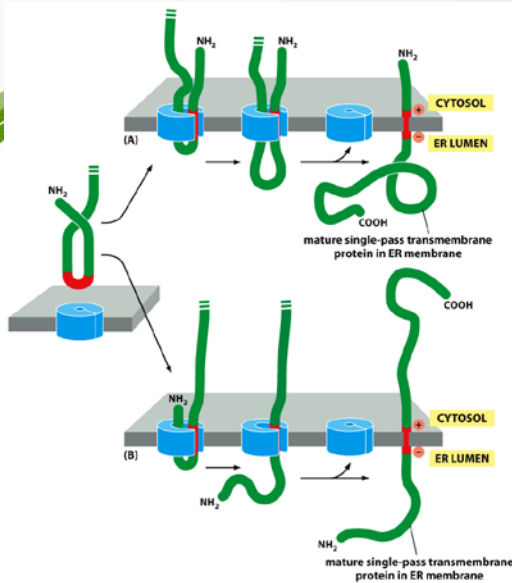


Figure 12-43 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

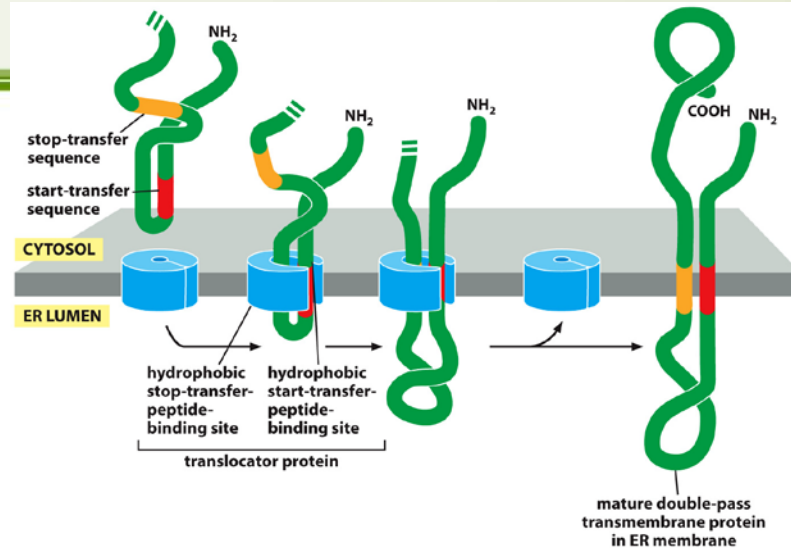
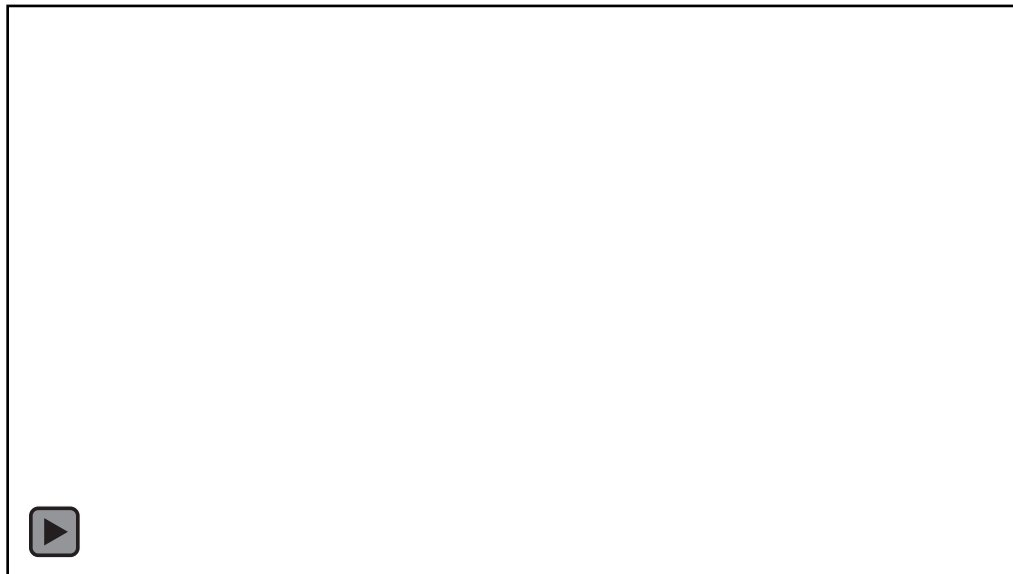


Figure 12-44 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Transport tail-anchored proteinů do ER

- ▶ některé proteiny jsou připojeny do membrány ER jen koncovou kotvou – **tail anchor** (např. řada proteinů řídících vezikulární transport);
- ▶ tato sekvence je příliš krátká na to aby ji mohla rozeznat SRP (zůstává uvnitř ribozómu v okamžiku ukončení translace) – tzv. „**pre-targeting complex**“ zachytí hydrofobní C-konec a s využitím specifické ATP-ázy jej začlení do membrány ER; transport podobných proteinů do mitochondrií a peroxizómů není jasný;

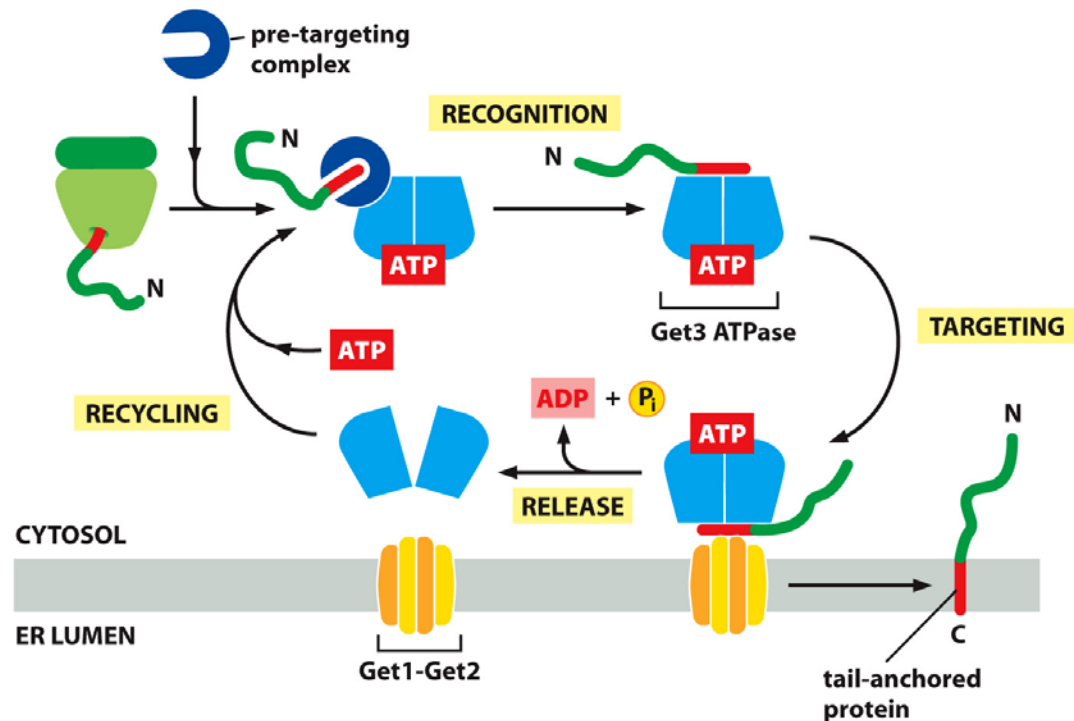


Figure 12-46 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Syntéza glykosyfosfatidylinositolové (GPI) kotvy

- ▶ řada proteinů plazmatické membrány je k ní připojena prostřednictvím GPI kotvy;
- ▶ její syntéza probíhá v ER;
- ▶ tyto proteiny jsou uvolňovány z membrány specifickými fosfolipázami;

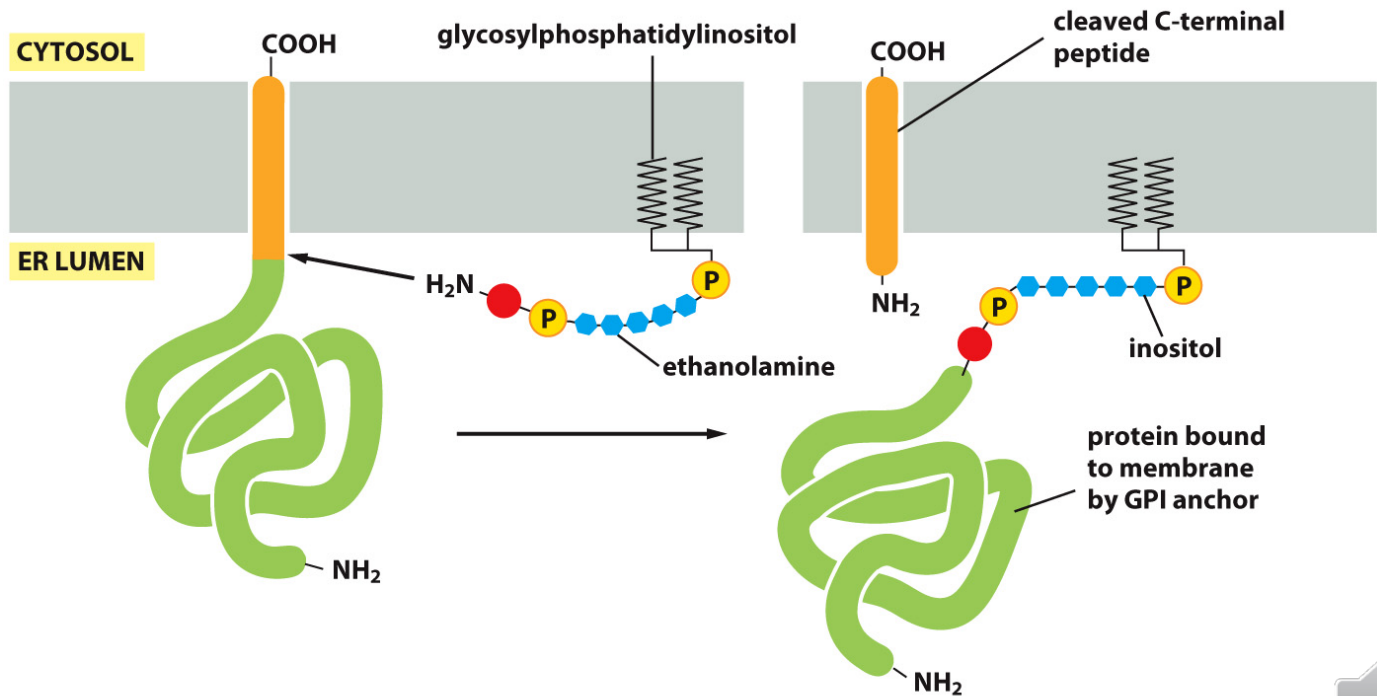


Figure 12-52 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



GPI není jediná forma post-translační modifikace umožňující připojení k membráně

- další proteiny plazmatické membrány k ní mohou být připojeny na vnitřní straně prostřednictvím specifických lipidních modifikací;
- tyto reakce jsou katalyzovány cytosolovými enzymy - např. cca 0.5–0.8% všech proteinů mají připojen N-myristoyl – katalyzováno enzymem N-myristoyltransferázou;
- typicky tato úprava probíhá už na ribozomech, co-translačně;

Modification	Site of attachment	Strength of membrane association	Reversible?
Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor	C-terminus	Strong	No
N-myristoylation	N-terminus	Weak	No
S-acylation	Internal cysteine	Weak	Yes
Prenylation	C-terminus	Weak	No

Table 5.1 Cell Signaling (© Garland Science 2015)

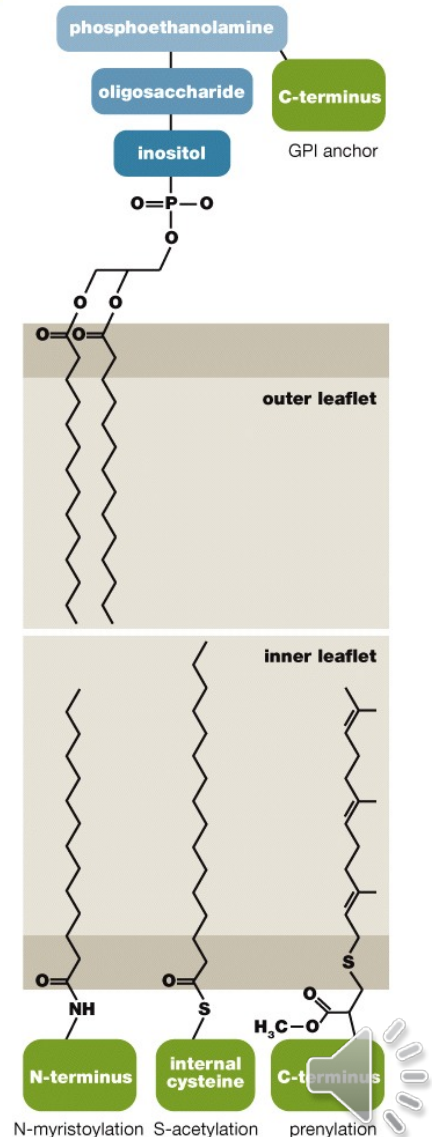


Figure 5.9 Cell Signaling (© Garland Science 2015)

Skládání a glykosylace proteinů v ER

- ▶ proteiny translokované do ER jsou **dvojího typu** – **rezidentní** (vlastní proteiny ER) a **proteiny transportované do dalších organel**;
- ▶ rezidentní – „ER retention signal“ – 4 AA na C-konci;
- ▶ patří mezi ně BiP – rezidentní chaperon hsp70, PDI (protein disulfide isomerase) – katalyzuje tvorbu –S-S- můstků mezi dvěma Cys;
- ▶ **proteiny jsou v ER také glykosylovány** – vazba oligosacharidů – oligosacharyl transferáza (enzym asociovaný s translokátorem proteinů) – asi 50% proteinů (směřují do GA, lysozómů, plazm. membrány nebo jsou exkretovány) – **glykoproteiny**; N-linked (asparagine-linked);
- ▶ kompletní oligosacharid je na vnitřní straně ER membrány ukotvený lipidní molekulou – dolichol – poměrně složitý proces;
- ▶ jednotlivé sacharidy jsou poté postupně štěpeny v ER a GA;
- ▶ O-glykosylace; vazba jednotlivých N-acetylglukosaminů;

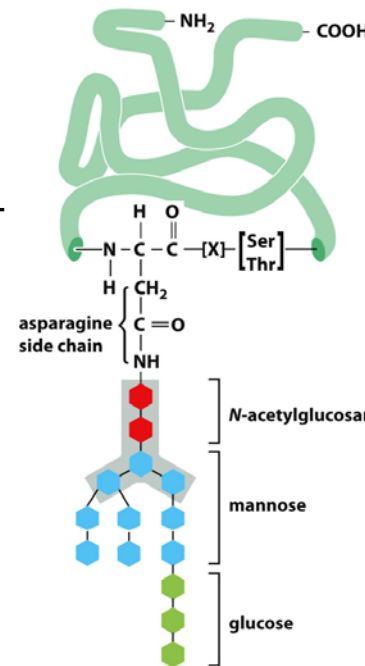


Figure 12-47a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

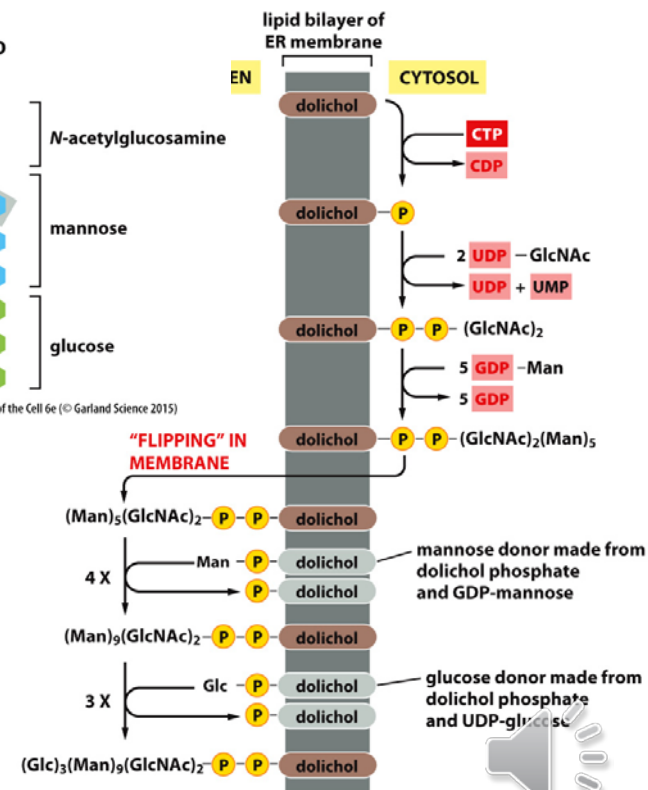


Figure 12-48 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Skládání a glykosylace proteinů v ER

- vedle dalších funkcí souvisí glykosylace i se skládáním proteinů v ER; jsou zde přítomné specifické chaperony rozpoznávající oligosacharidy – např. **kalnexin, kalretikulín**; vážou ještě nesložené proteiny a brání jejich agregaci – podporují jejich vazbu na specifické chaperony rozpoznávající volné –SH skupiny;
- kalnexin se váže na N-linked oligosacharidy s 1 koncovou glukózou – po jejím odštěpení protein uvolní a ten může opustit ER; neúplně složené proteiny jsou označeny glukózou – reakce katalyzovaná **glukosyl transferázou**;
- řada proteinů (někdy až 80% molekul příslušného proteinu) **není složena správně** nebo nevytváří příslušný oligomer – tyto proteiny jsou **retrotranslokovány** do cytoplazmy a degradovány **proteazómem**; složitý proces – nutné rozeznat meziformy od nesprávně složených proteinů;

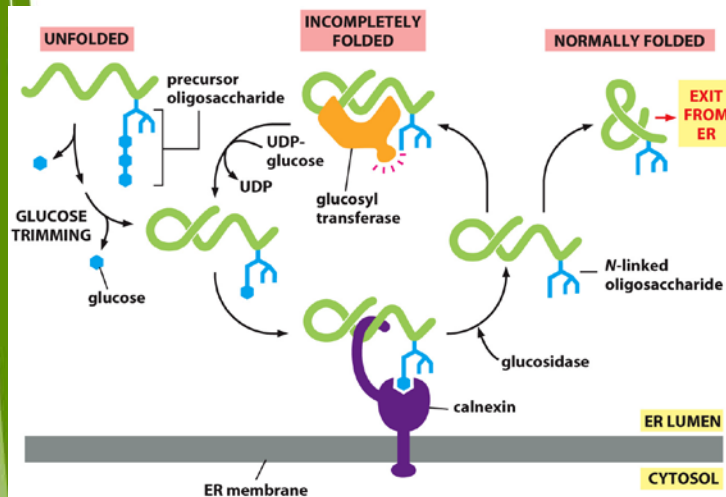


Figure 12-49 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

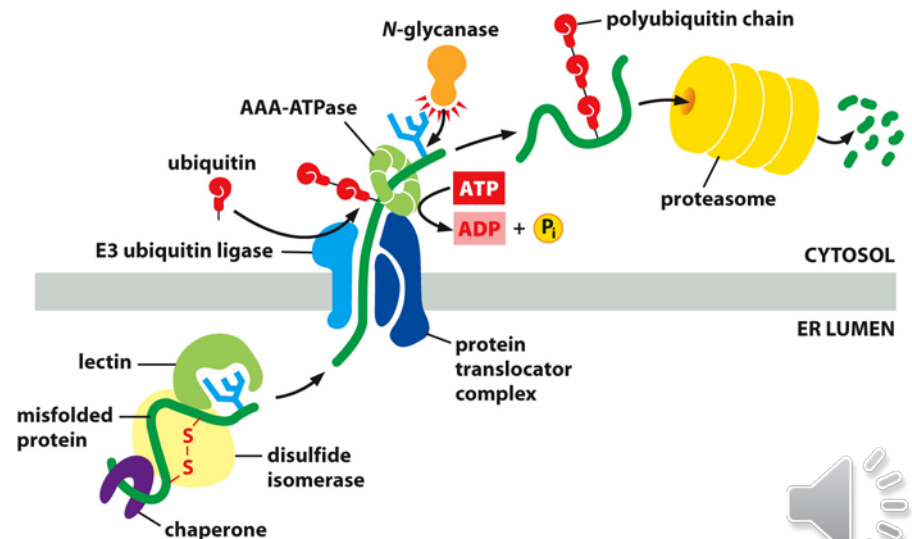


Figure 12-50 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Unfolded protein response

- ▶ buňky mají možnost citlivě reagovat na nadbytek nesprávně složených proteinů;
- ▶ nadměrné množství nesprávně složených proteinů vyvolá „**unfolded protein response**“ (UPR) – stimulace transkripce genů kódujících chaperony ER, proteiny umožňující retrotranslokaci proteinů a jejich degradaci a obecně proteinů, které umožní zvýšit kapacitu procesů skládání proteinů v ER;
- ▶ aktivace UPR také zpomalí translaci (inhibice iniciačních faktorů);

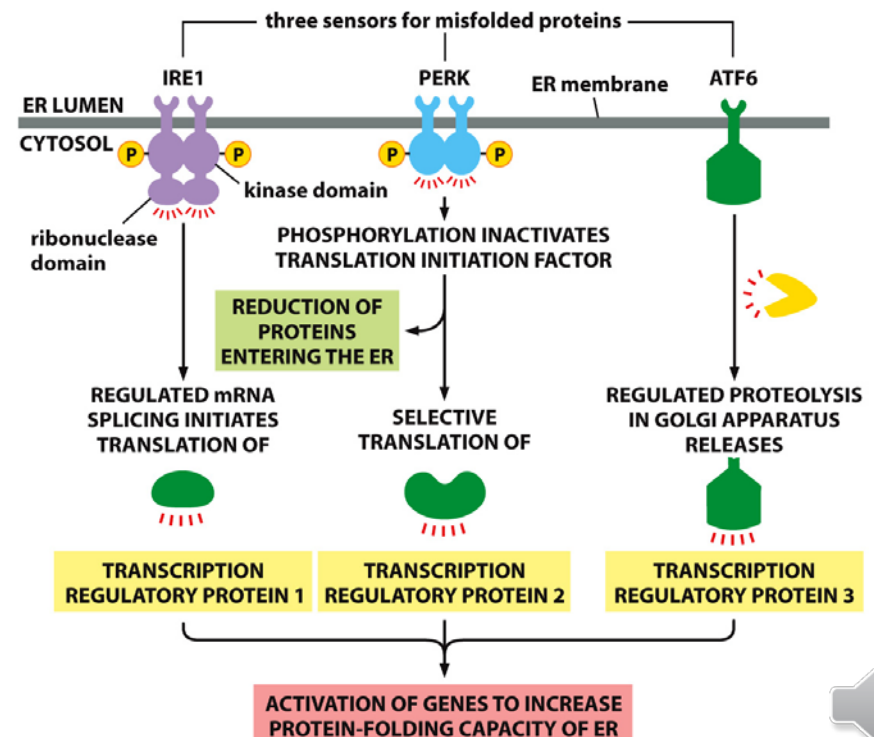


Figure 12-51a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Transport proteinů v rámci vezikulárního transportu

- transport proteinů mezi ER a dalšími organelami je součástí sekrečních a endocytických drah v buňce, které slouží k transportu proteinů, cukrů a lipidů na plazmatickou membránu a exkreci či zachycení membránových komponent a zachycení významných složek výživy – cholesterol, železo, vitamíny a další;

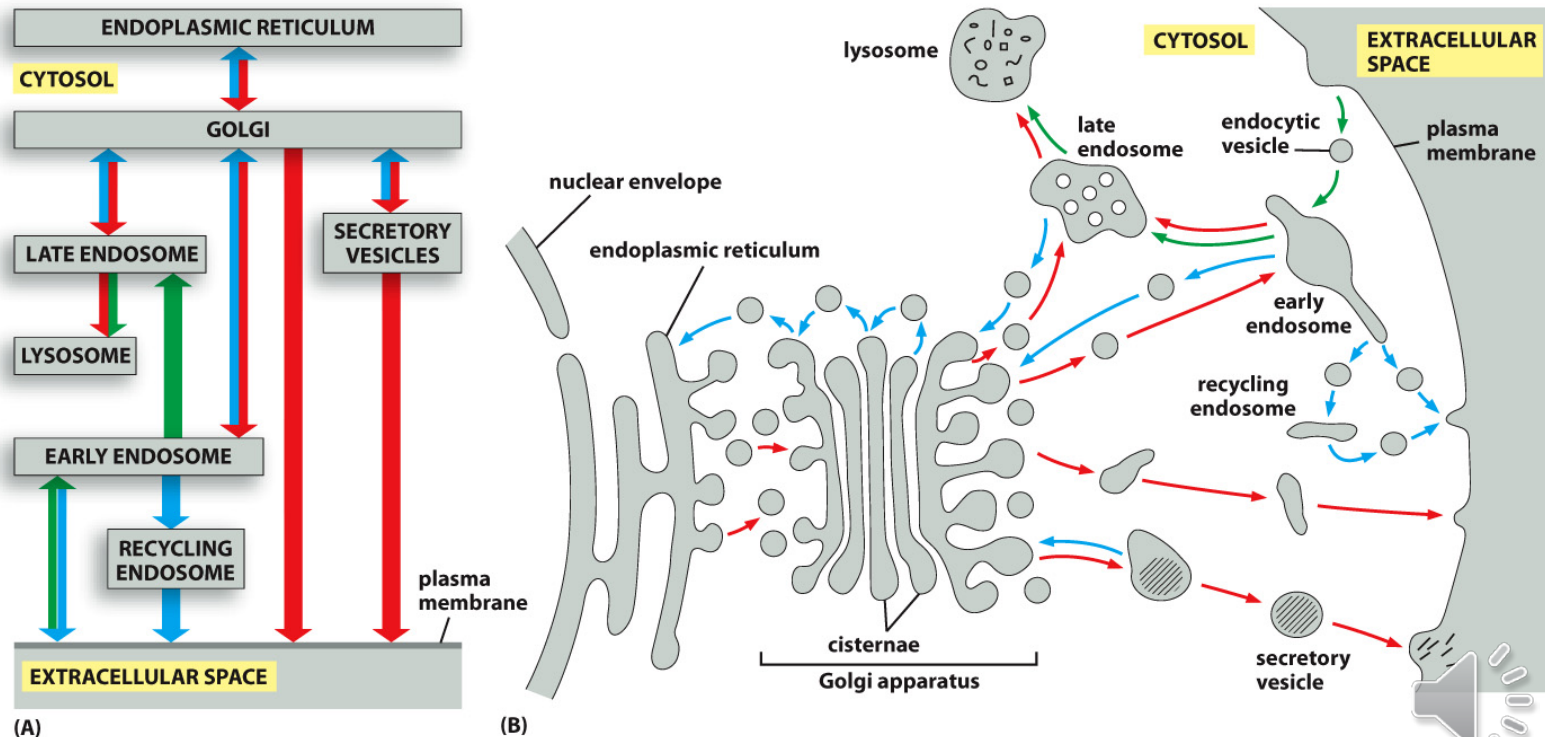


Figure 13-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Transport proteinů v rámci vezikulárního transportu

- ♦ transport vezikulů závisí na jejich tvorbě a složení:
 - vezikuly – „**clathrin-coated**“ vezikuly – přenášejí materiál z plazmatické membrány a mezi endozómy a GA;
 - „**COP (coat protein complex) I-coated**“ vezikuly – vznikají z GA a „**COPII-coated**“ z ER;

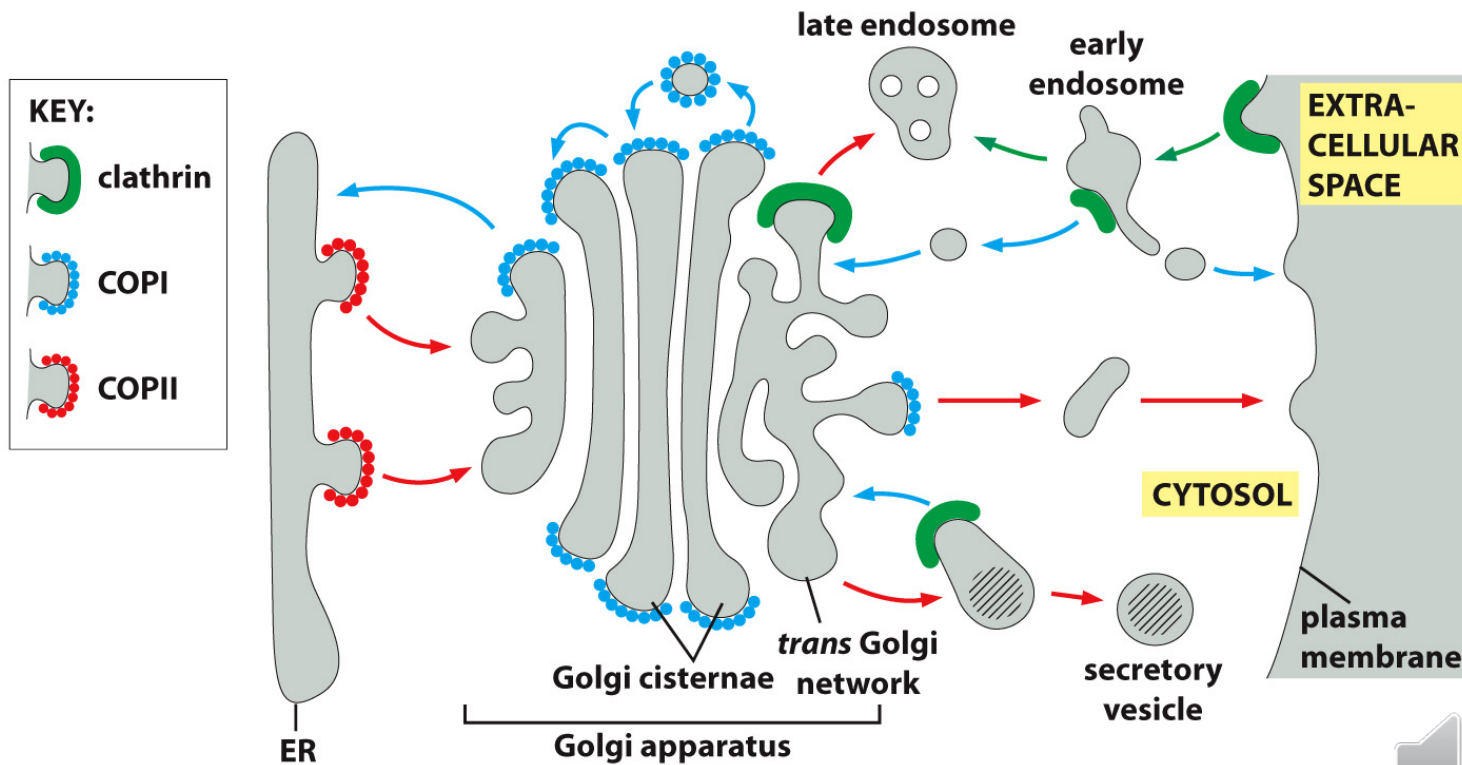


Figure 13-5 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Transport proteinů v rámci vezikulárního transportu

♦ vznik vezikulu je vícestupňový proces:

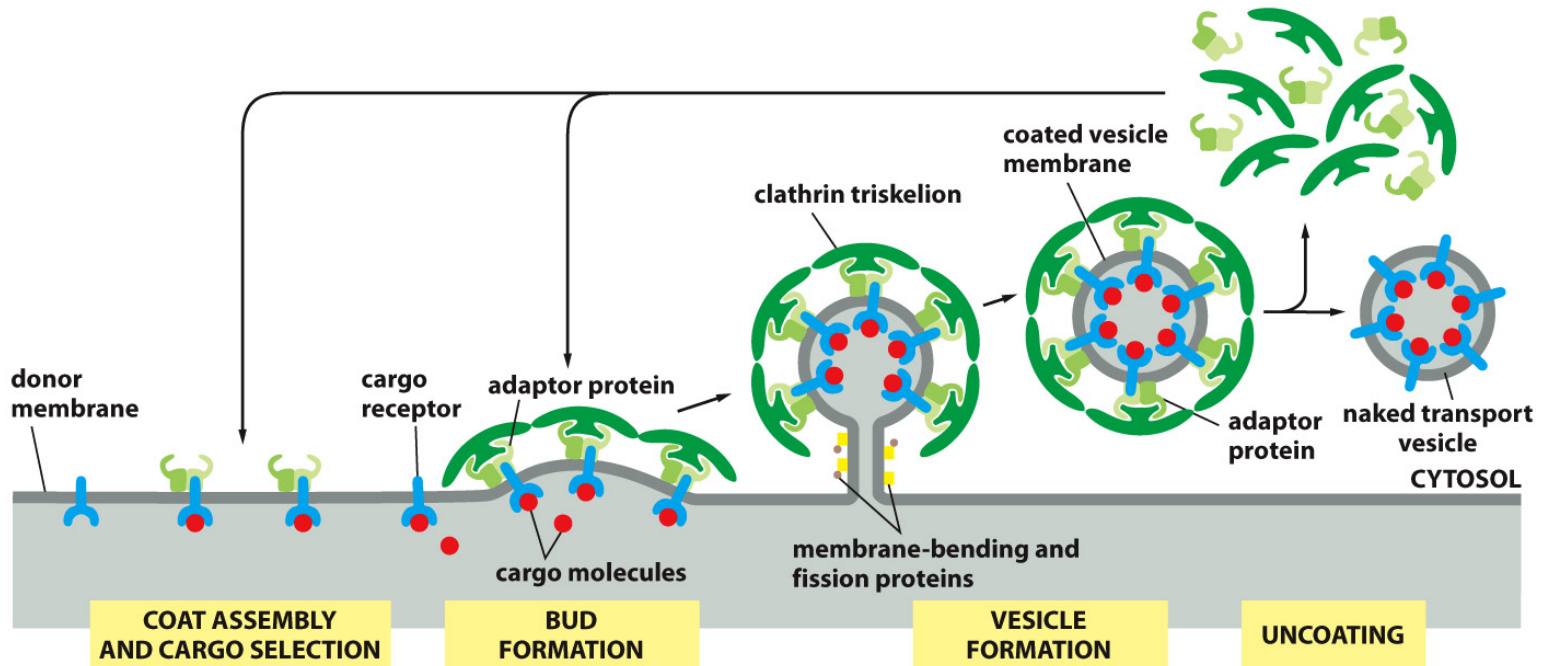


Figure 13-8 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



COPII-coated vezikuly

- **zásadní pro transport proteinů z ER do GA a dále**; vznikají ve specializovaných oblastech ER – „ER exit sites“;
- do těchto vezikulů jsou proteiny zařazovány prostřednictvím interakcí se specifickými receptory – **membránové proteiny** se vážou přímo (prostřednictvím exit signálu) na adaptérové proteiny, které jsou součástí COPII, **solubilní proteiny** se vážou na transmembránové **kargo receptory**;
- struktura těchto receptorů není příliš dobře známa;
- transport z ER je umožněn pouze správně složeným a asociovaným proteinům – úloha chaperonů (BiP, kalnexin);
- velice striktní kontrola;

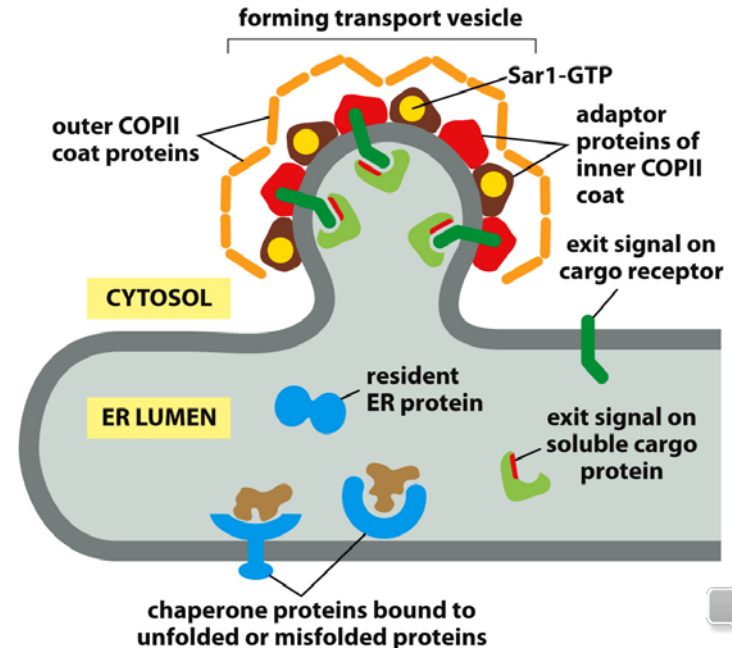


Figure 13-22 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Transport z ER – vesicular tubular clusters

- ♦ po uvolnění z ER **jednotlivé vezikuly ztrácejí coating** – fúzí (prostřednictvím SNARE proteinů) a vytvářejí **klastry vezikulů a válců**; připojeny na mikrotubuly – transport do GA;
- ♦ **zároveň vytvářejí COPI-coated vezikuly** – **zpětný transport** rezidentních ER proteinů, kargo receptorů, SNARE proteinů apod. – zpětný transport pokračuje i z GA, po „doručení zásilky“;

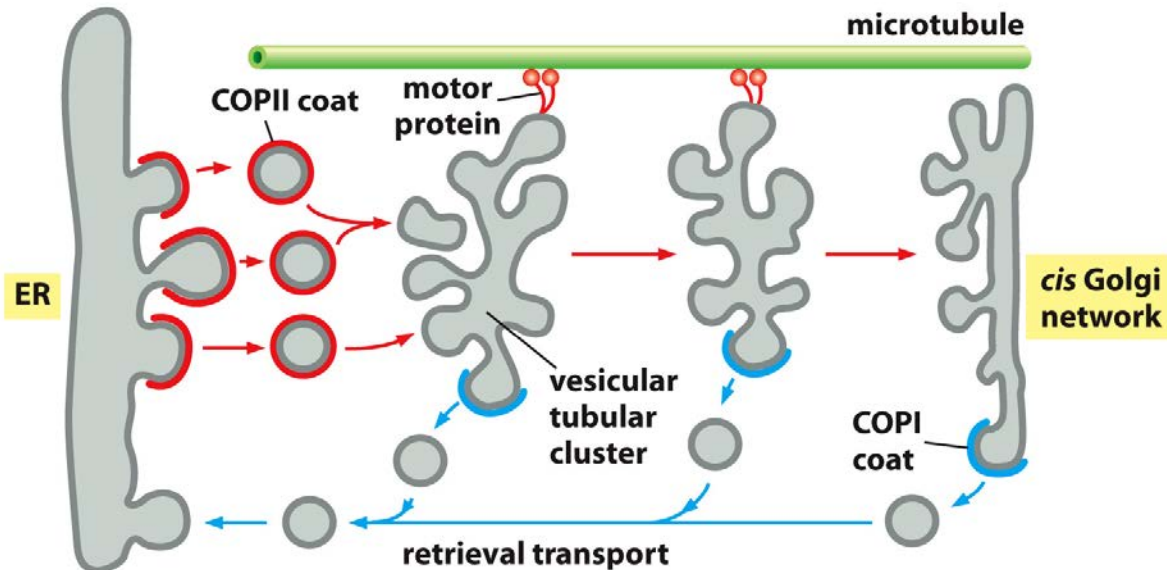


Figure 13-24b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

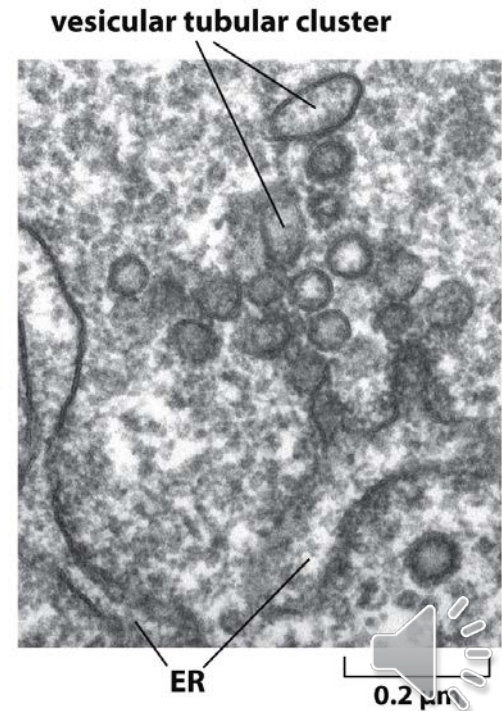


Figure 13-24a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Transport z ER – vesicular tubular clusters

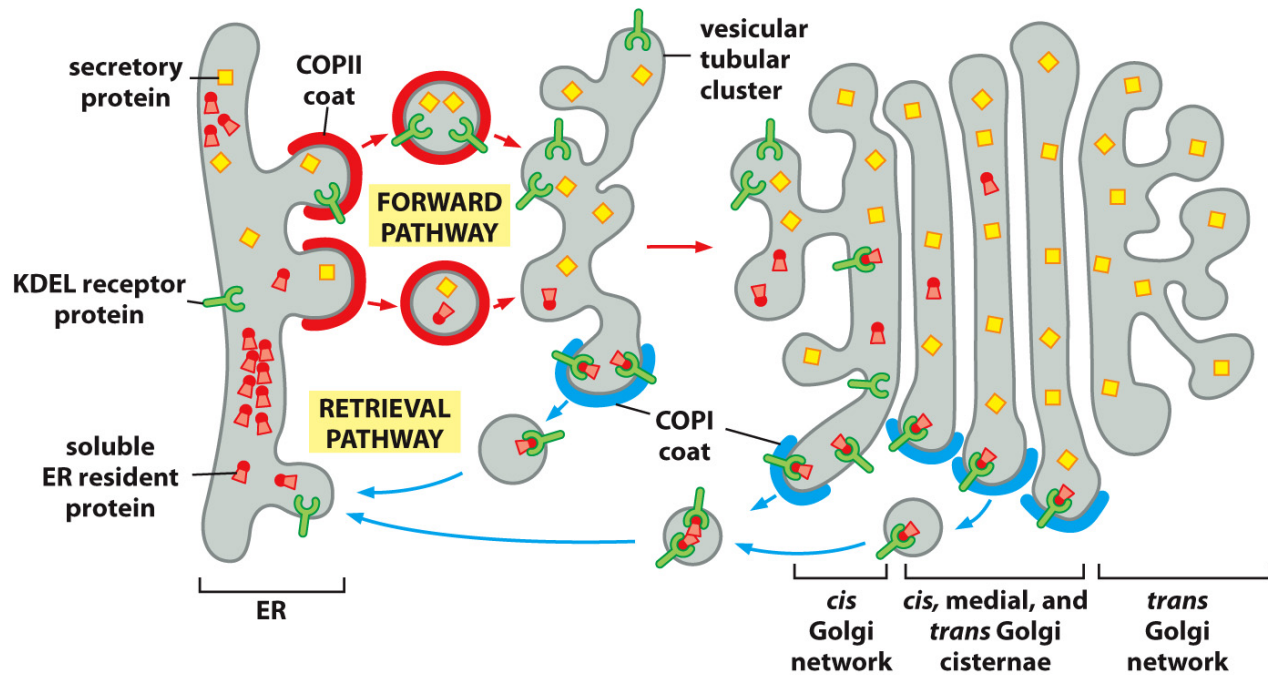


Figure 13-25b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Golgiho aparát – modifikace oligosacharidy a další transport

- ▶ v GA probíhá série úprav proteinů – odbourávání a připojování specifických oligosacharidů;
- ▶ sorting – třídění- proteinů do dalších organel;

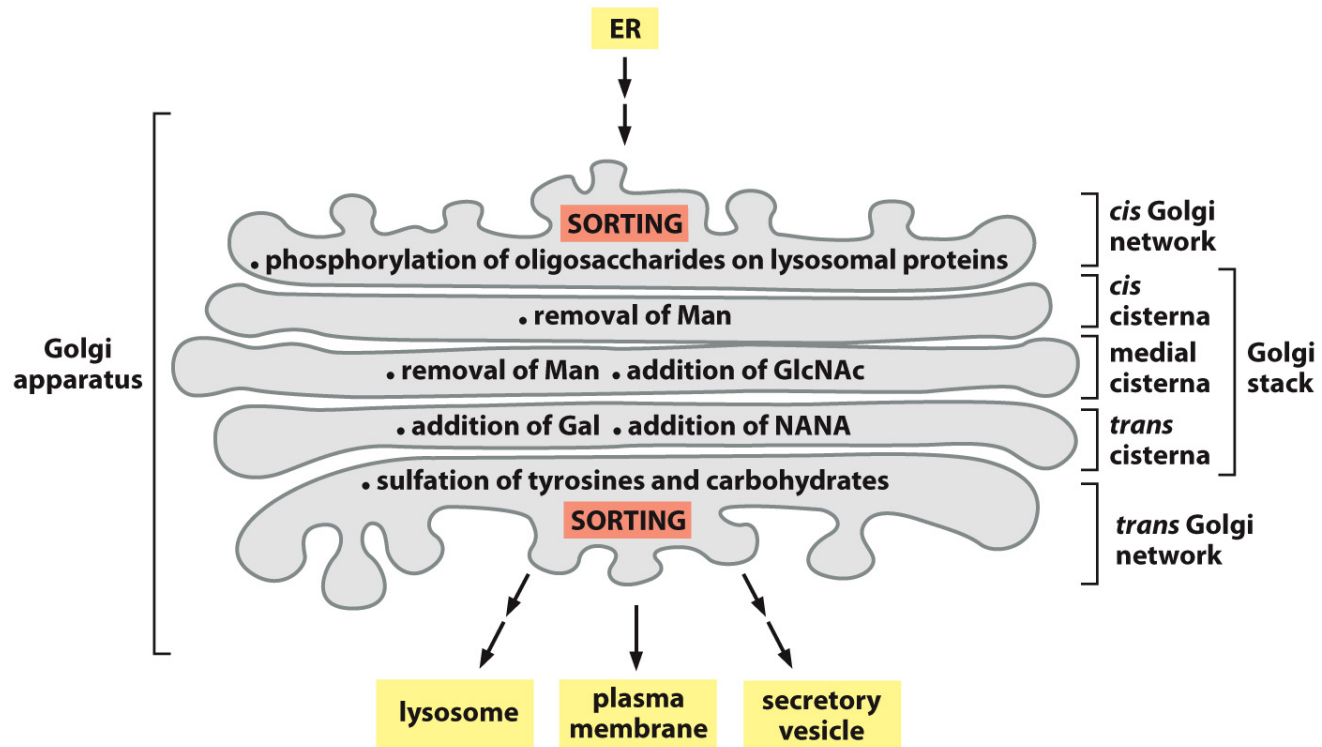


Figure 13-29 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Golgiho aparát – modifikace oligosacharidy a další transport

- ▶ v GA probíhá série úprav proteinů – odbourávání a připojování specifických oligosacharidů – 2 hlavní typy modifikací;
- ▶ původní N-linked oligosacharid byl zkrácen v ER – v GA přidány nové sacharidy (komplexní oligosacharidy) nebo ne (oligosacharid s vysokým obsahem manózy);

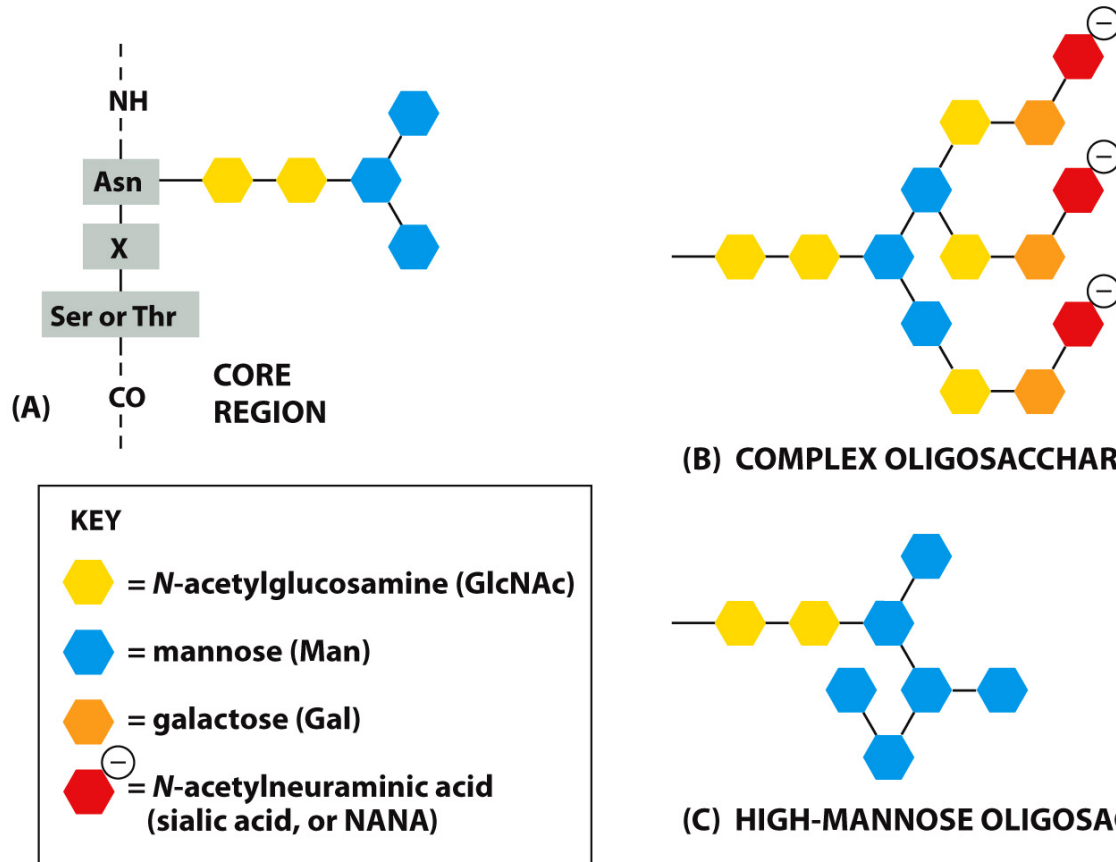


Figure 13-30 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Golgiho aparát – modifikace oligosacharidy a další transport

- vedle těchto modifikací i další – k OH skupinám Ser a Thr (nebo hydroxylovaným Pro a Lys reziduím) – O-linked glykosylace;

N-LINKED GLYCOSYLATION

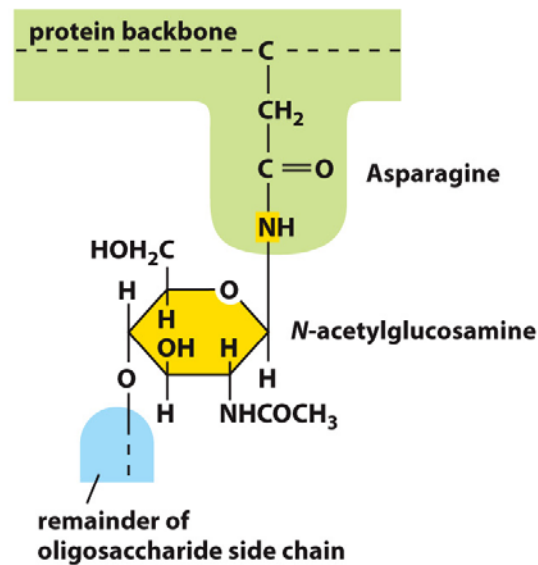
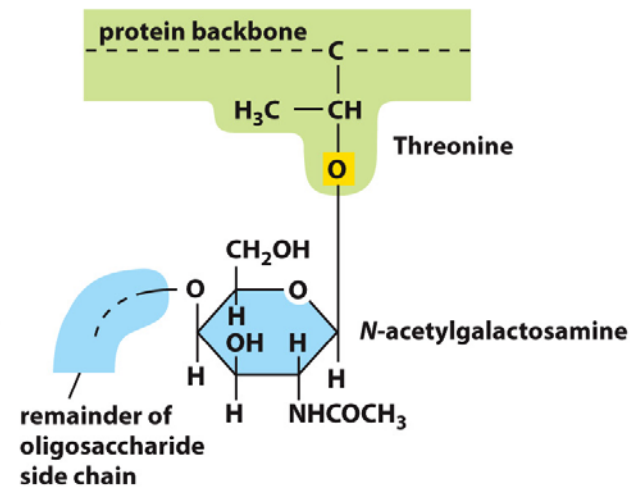


Figure 13-32 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

O-LINKED GLYCOSYLATION



- tvorba proteoglykanů;

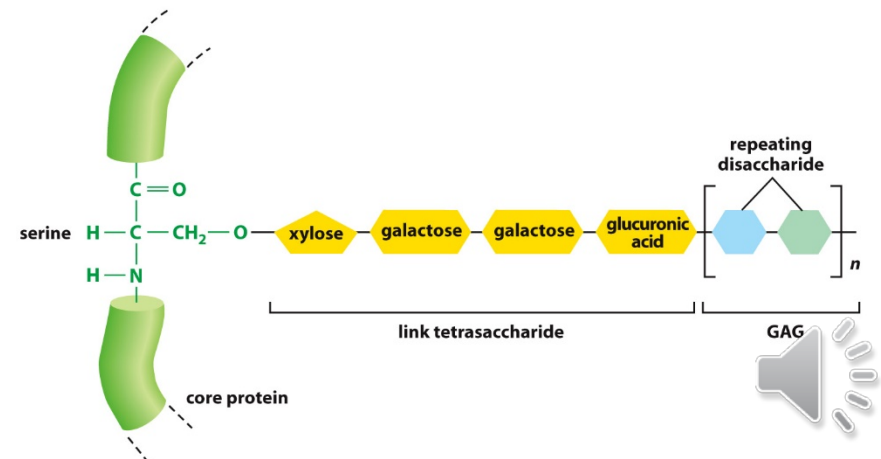


Figure 19-35 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Transport GA – 2 teorie

- ▶ zrání cisteren vs. vezikulární transport; oba mechanismy se pravděpodobně doplňují;

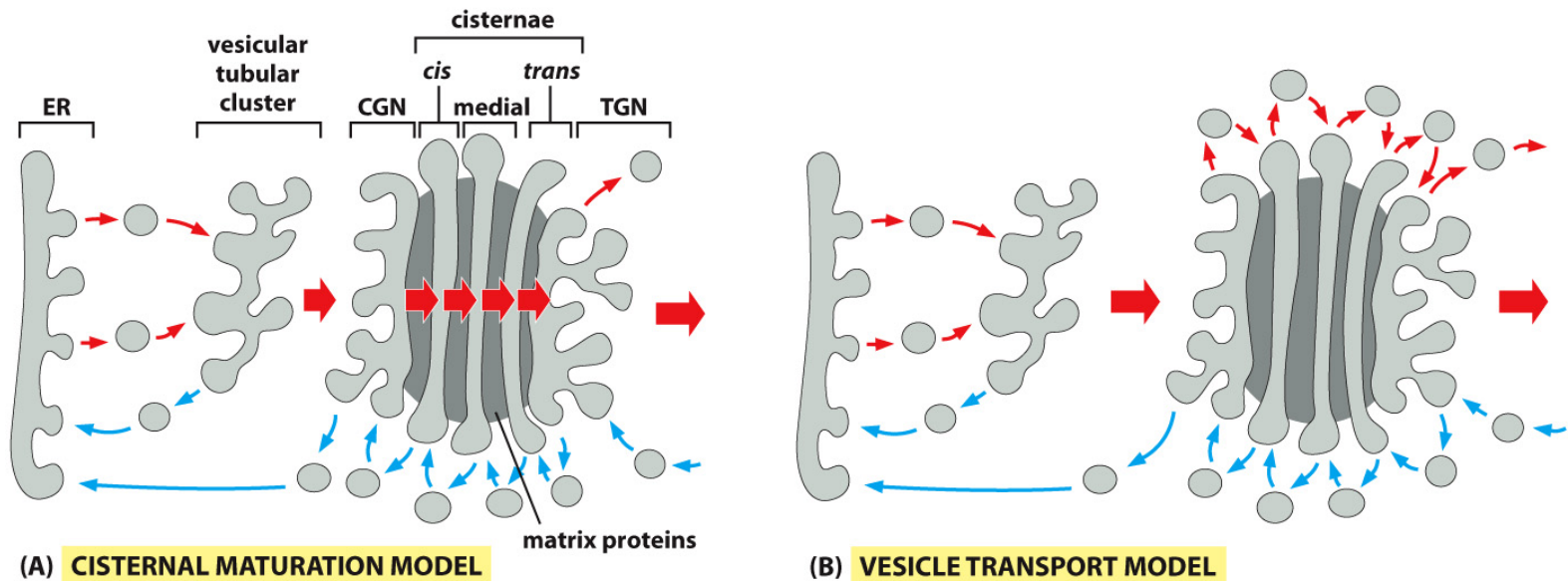


Figure 13-35 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Třídění proteinů v GA

- 3 základní dráhy – do lysozómů, konstitutivní sekreční dráha a regulovaná sekreční dráha;

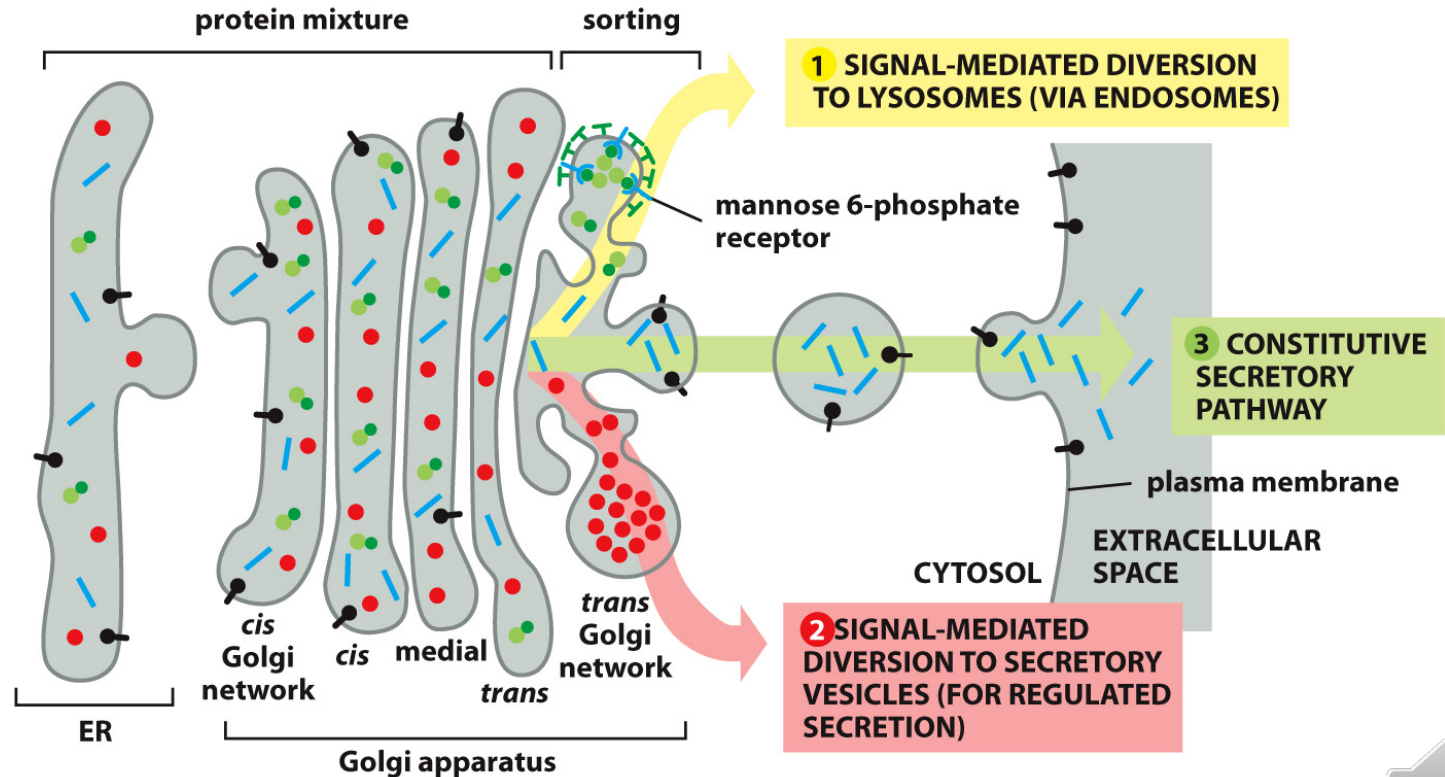


Figure 13-63 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Transport do lysozómů

- ▶ proteiny opouštějí trans-Golgi síť a putují dále do endozómů - lysozómů;
- ▶ označeny M6P;
- ▶ některé lysozomální hydrolázy mohou uniknout do extracelulárního prostoru – mohou být zachyceny M6P receptory na povrchu buňky;

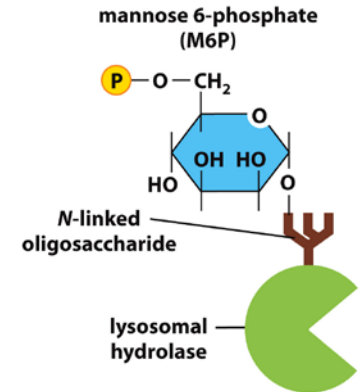


Figure 13-44 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

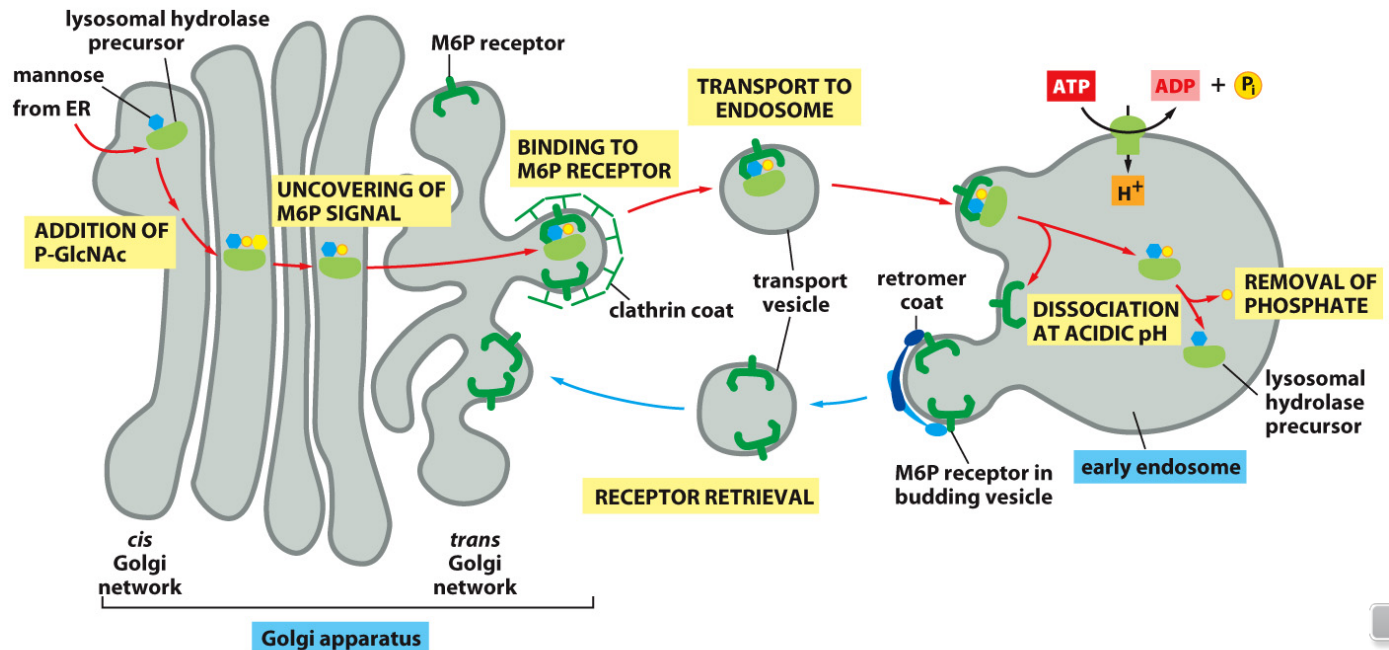


Figure 13-45 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Konstitutivní sekreční dráha (default pathway)

- ▶ všechny proteiny z GA (s výjimkou proteinů vrácených do ER, transportovaných do lysozómů, rezidentních proteinů GA, nebo proteinů určených pro regulovanou sekreci) jsou transportovány touto dráhou na plazmatickou membránu;

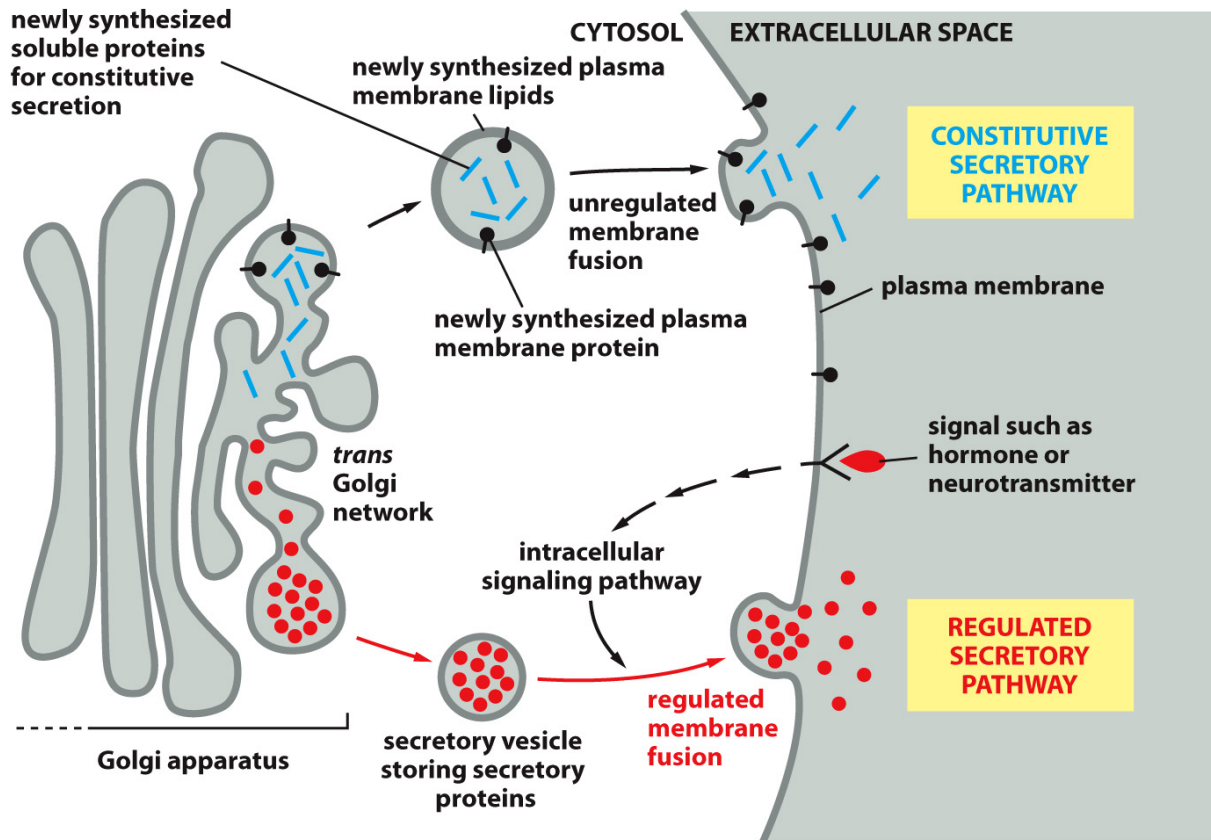


Figure 13-62 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Tvorba sekrečních vezikulů

- dochází k selektivní agregaci a zakoncentrování vylučovaných proteinů, recyklaci membrány a acidifikaci obsahu;

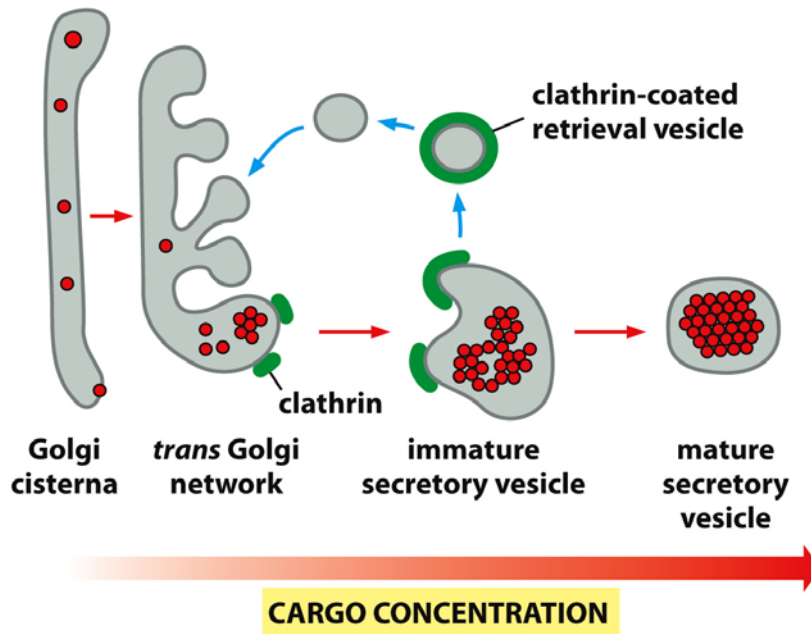


Figure 13-64a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

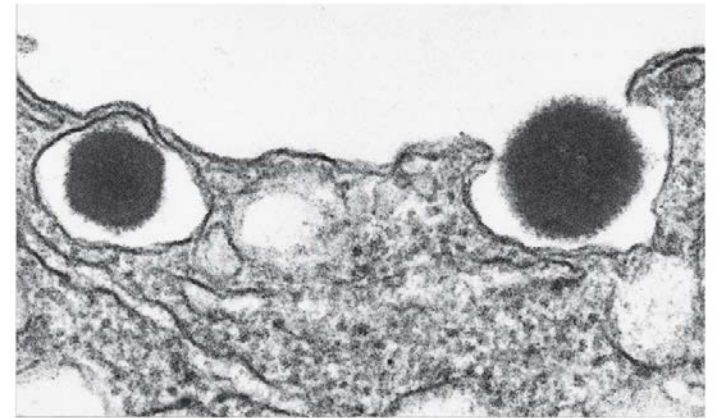
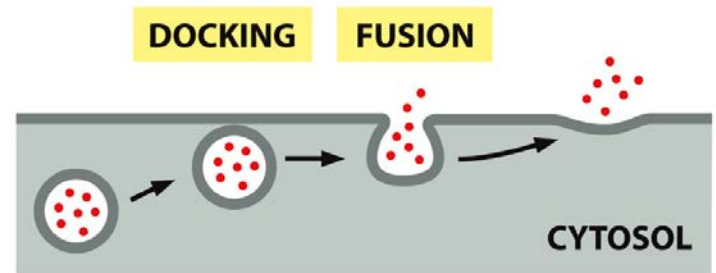
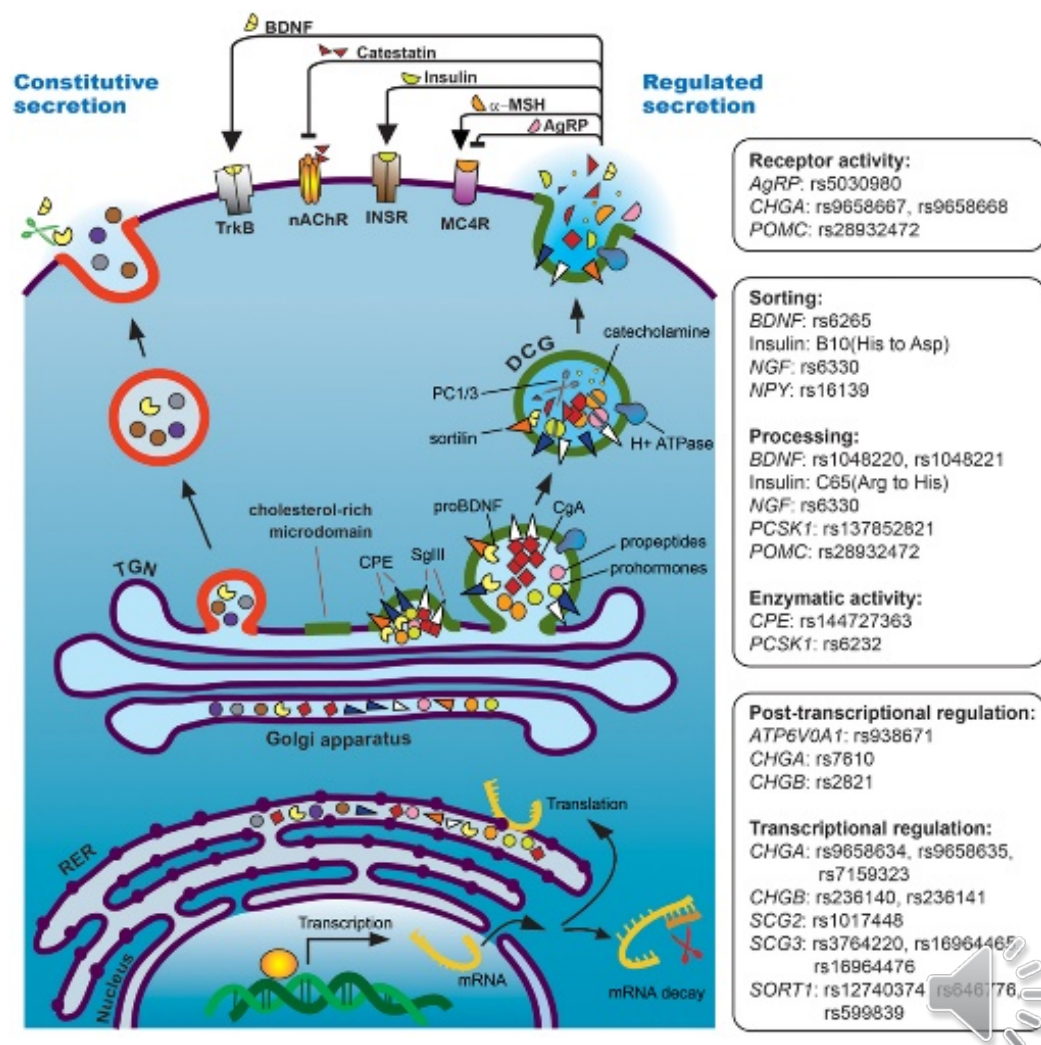


Figure 13-65 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Regulovaná sekreční dráha

- sekreční vezikuly jsou často uskladněny v blízkosti membrány – k fúzi s membránou a uvolnění obsahu dochází rozpoznáním specifického signálu – př. peptidové neurotransmitery transportované do zakončení axonu; neurosekreční buňky, apod.;



Polarizované buňky – proteiny směřují do specifických membránových domén

- membránové proteiny jsou transportovány do apikální nebo bazolaterální membrány různými mechanismy;

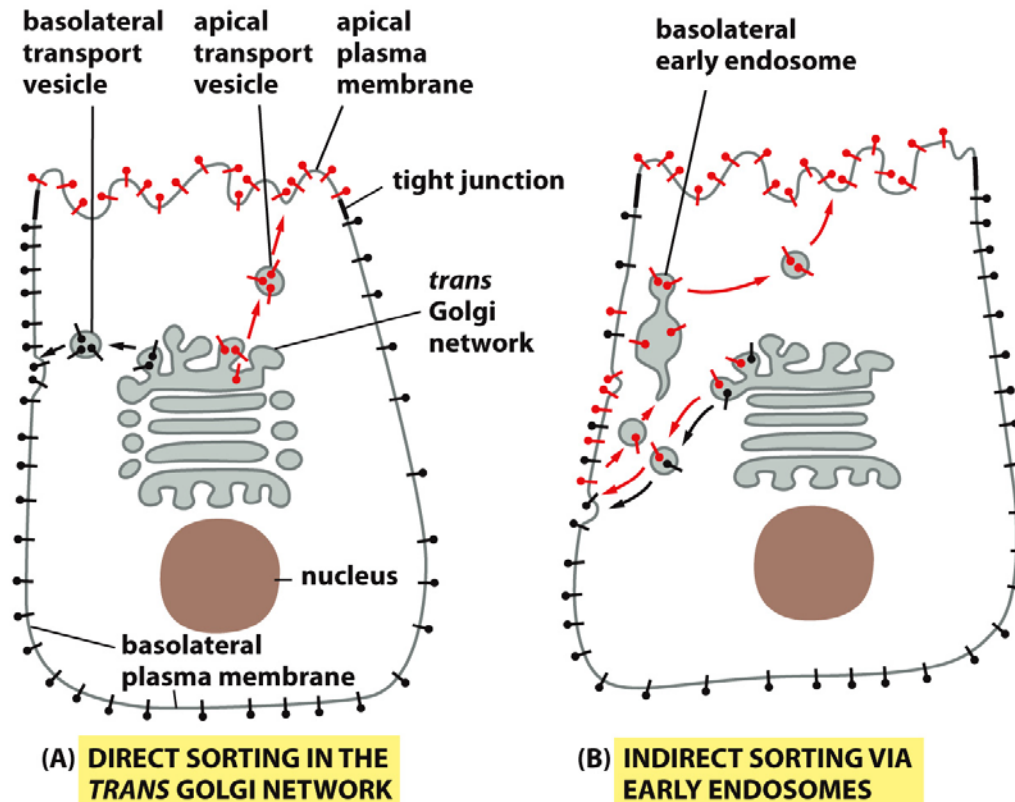
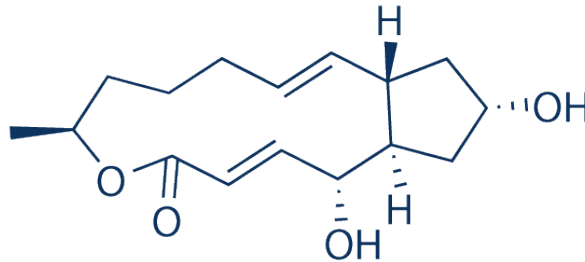


Figure 13-71 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

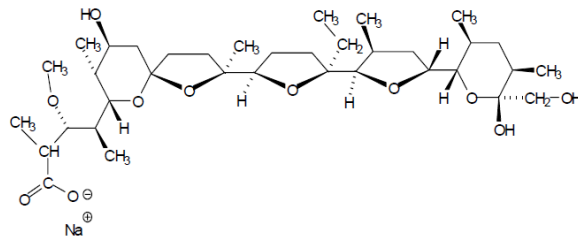


Studium transportu – specifické inhibitory

- ▶ pro studium funkce transportu můžeme využít specifické inhibitory – např. **brefeldin A** – blokuje transport z ER do GA prostřednictvím nepřímé inhibice; vede ke zhroucení GA do ER a zablokování dalšího transportu; inhibuje Arf1-guanine nucleotide exchange factor (GEF);



- ▶ inhibitory acyl-CoA:cholesterolacyltransferázy – blokují tvorbu COPII vezikulů, stimuluji retrotransport z GA do ER;
- ▶ **monensin** – narušuje strukturu GA a inhibuje vezikulární transport;



- ▶ využití nejen ve výzkumu ale i např. v protinádorové terapii;



Degradace proteinů – 2 základní dráhy – proteazómy vs. lysozómy

- ▶ štěpení proteinů – součást kontroly kvality, odbourávání nadbytečných proteinů, regulační mechanismus – aktivace vs. inaktivace; životnost většiny proteinů – 1 – 2 dny, ale některé jsou degradovány velmi rychle (hodiny), zatímco jiné mohou přežít > půl roku - rok (histony, proteiny jaderných pórů);
- ▶ specializované proteázy vs. kompletní degradace peptidů/proteinů a recyklace AA;
- ▶ úplná degradace proteinů se odehrává v **proteazómech** a **lysozómech**;
- ▶ **proteazóm** – velmi abundantní buněčná proteáza – může tvořit až 1% celkového proteinu v buňce;

What is the turnover time of proteins through active degradation?

we denote the number of amino acids per cell by N_{aa}

$$(e.g. for HeLa cell, N_{aa} \approx 3 \times 10^6 \frac{\text{proteins}}{\mu\text{m}^3} \times 3000 \frac{\mu\text{m}^3}{\text{cell}} \times 400 \frac{\text{aa}}{\text{protein}} \approx 4 \times 10^{12} \frac{\text{aa}}{\text{cell}})$$

≈ 1% of proteome mass is proteasomes

$$\text{number of proteasomes} \approx \frac{0.01 \times N_{aa}}{20,000 \text{ aa/proteasome}} \approx 0.5 \times 10^{-6} N_{aa} \text{ proteasomes/cell}$$

molecular mass of proteasome ≈ 2.4 MDa ≈ 20,000 aa

proteasome deg. rate ≈ 5 proteins/min ≈ 0.1 protein/s ≈ 40 aa/s

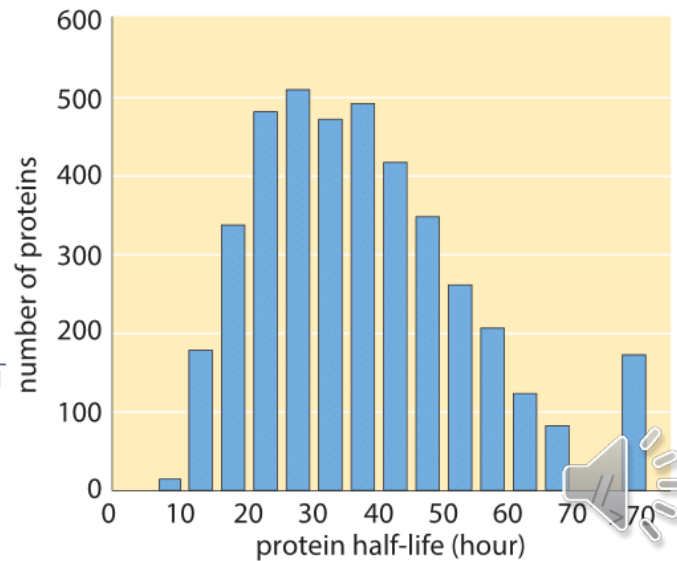
$$\text{total deg. rate} \approx 40 \frac{\text{aa}}{\text{s} \times \text{proteasome}} \times 0.5 \times 10^{-6} N_{aa} \frac{\text{proteasomes}}{\text{cell}} \approx 20 \times 10^{-6} N_{aa} \frac{\text{aa}}{\text{s} \times \text{cell}}$$

$$\text{turnover time} \approx \frac{\text{number of aa per cell}}{\text{total deg rate}} \approx \frac{N_{aa} \text{ aa}}{N_{aa} \times 20 \times 10^{-6} \text{ aa/s}} \approx 0.5 \times 10^5 \text{ s} \approx \text{1 day}$$

i.e. it would take all the proteasomes working at full speed about one day to degrade all of the proteome.

Milo et al., *Cell Biology by the Numbers*, New York, Garland Science, 2016

(B) *H. sapiens* non-dividing HeLa cell line



Proteazóm

- ▶ v jádře i cytoplasmě; je také součástí systému, který umožňuje degradaci nesprávně složených proteinů po jejich exportu z ER;
- ▶ rozpoznává **polyubikvitinované** proteiny;
- ▶ ubikvitinace umožňuje velmi přesnou regulaci degradace proteinů;
- ▶ skládá se z **centrálního válce** (aktivní proteázy) a na jeho konci jsou umístěny komplexy proteinů (**unfoldase ring** – AAA proteiny) umožňující rozbalení proteinu (spotřeba ATP) dojde k jeho nasměrování jako řetězce do dutiny válce, kde je štěpen na velmi krátké peptidy;

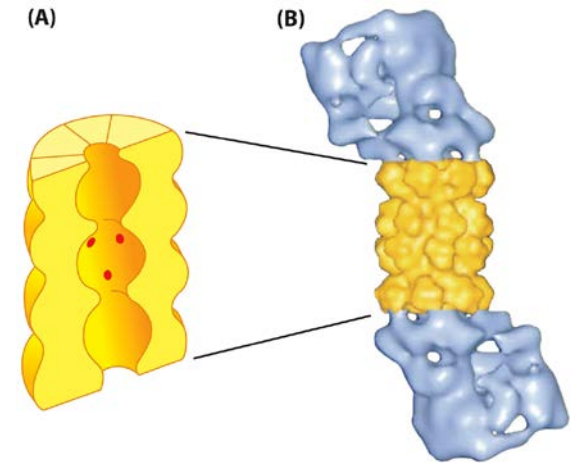


Figure 6-83 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

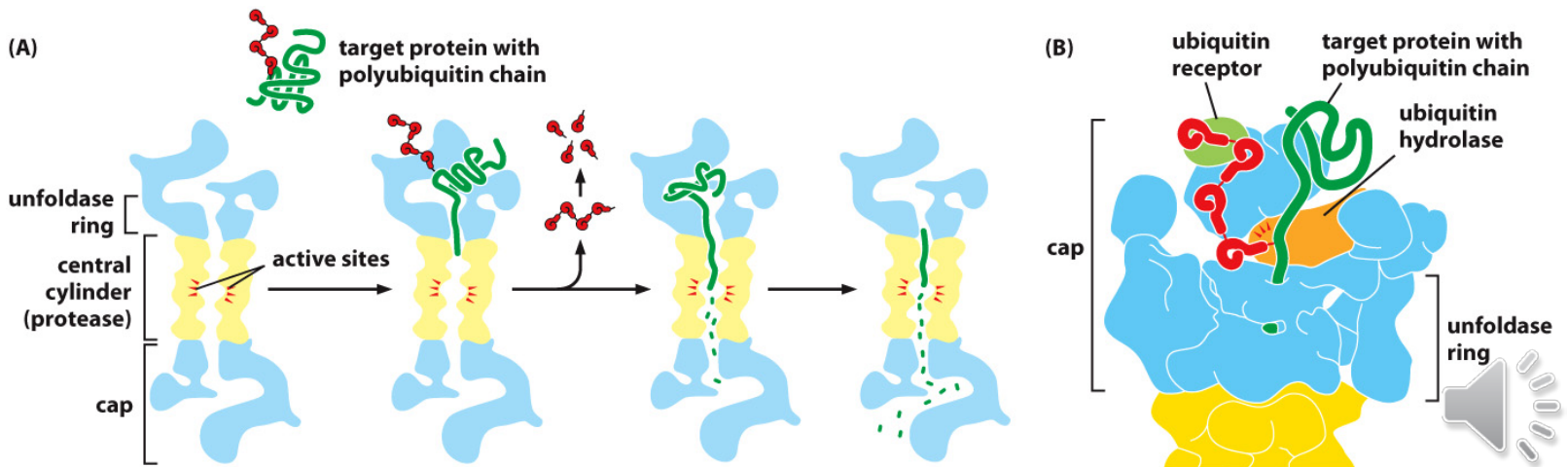
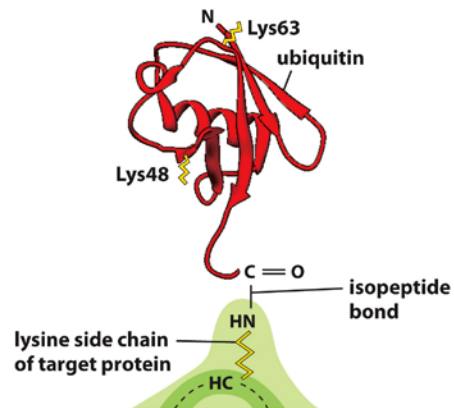


Figure 6-84 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Ubikvitinace – regulace degradace proteinů

- ▶ polyubikvitinace je součástí typu modifikací připojících jednoduchý peptid – ubikvitin – ke struktuře proteinů (i další - SUMO, NEDD);
- ▶ charakter ubikvitinace určuje osud proteinu;

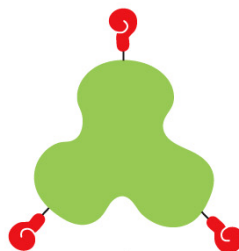


MONOUBIQUITYLATION



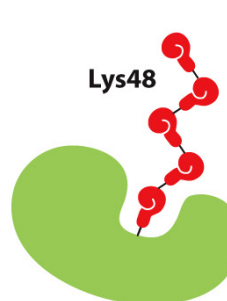
histone regulation

MULTIUBIQUITYLATION

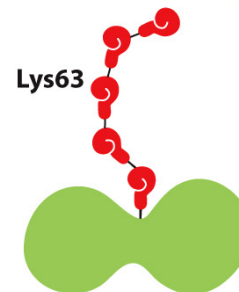


endocytosis

POLYUBIQUITYLATION



proteasomal degradation



DNA repair

Figure 3-69b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Polyubikvitinace – regulace degradace proteinů

- ubikvitinace** zahrnuje několik kroků - vazba ubikvitinu na Cys v **E1** proteinu (enzym aktivující ubikvitin)– jeho následný přenos na **E2** (enzym konjugující ubikvitin), který vytvoří komplex s ubikvitin ligázou (**E3**) – v savčích buňkách existuje několik set různých typů těchto komplexů – **navázání ubikvitinu na strukturu proteinu**;

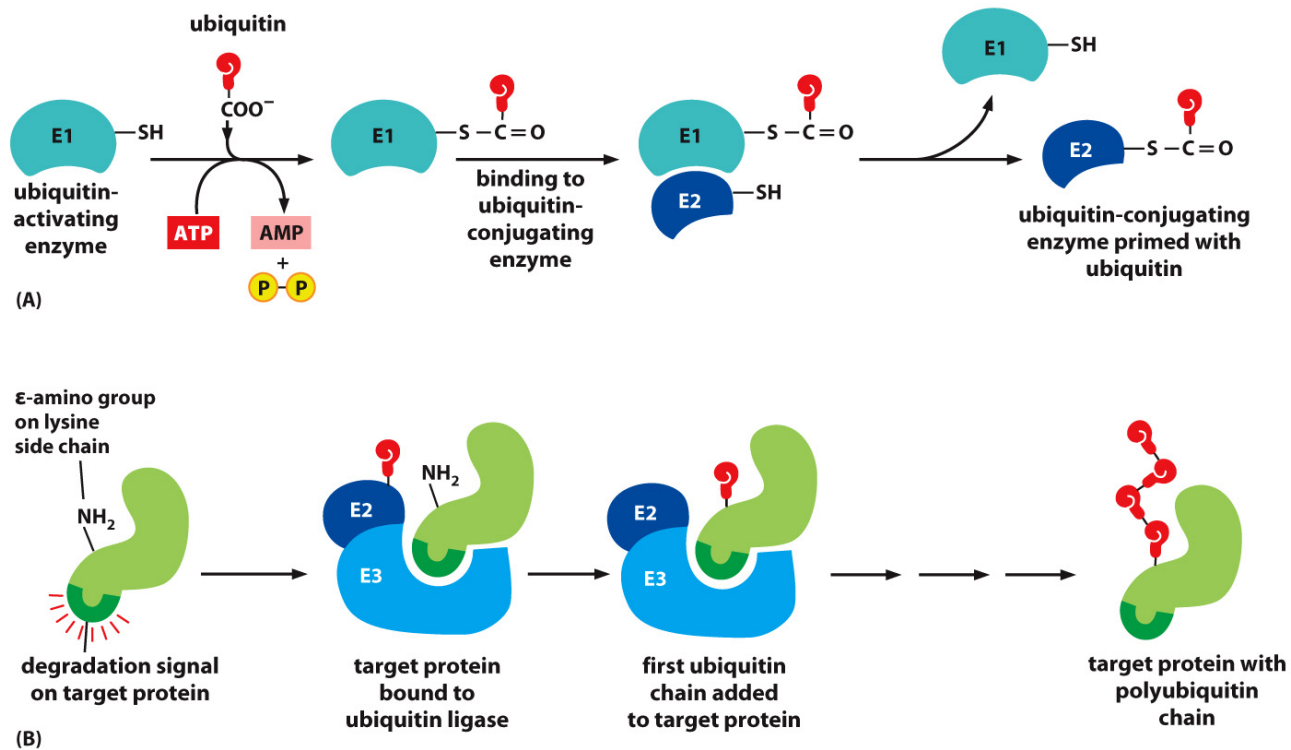


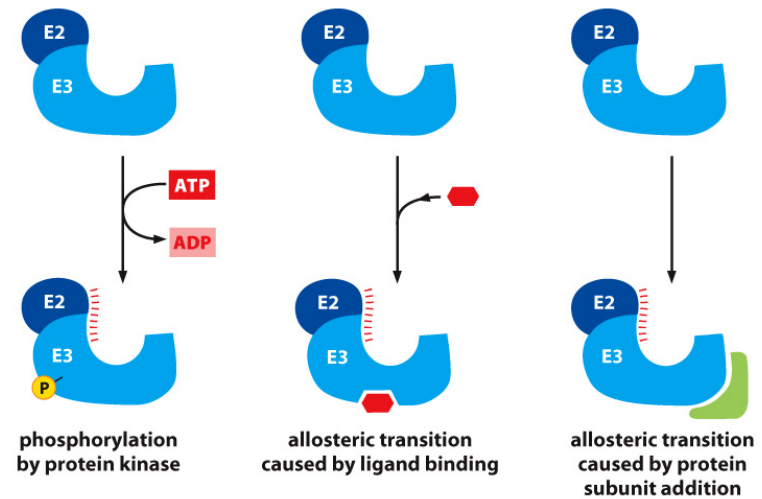
Figure 3-70 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Proteazóm slouží nejen k degradaci nesprávně složených či poškozených proteinů

- specifická regulace řady proteinů s velmi krátkým poločasem života – **regulační úloha**;
- příklad – cykliny – APC komplex;
- ubikvitinace je kontrolována buď **kontrolou aktivity komplexů ubikvitin ligáz nebo změnou struktury proteinu určeného k degradaci**;
- cca 80% proteinů nese potenciální degradační signál – acetylace N-konce – předpokládá se, že u stárnoucích či poškozených proteinů dojde k odhalení tohoto signálu – následuje jeho degradace;

(A) ACTIVATION OF A UBIQUITIN LIGASE



(B) ACTIVATION OF A DEGRADATION SIGNAL

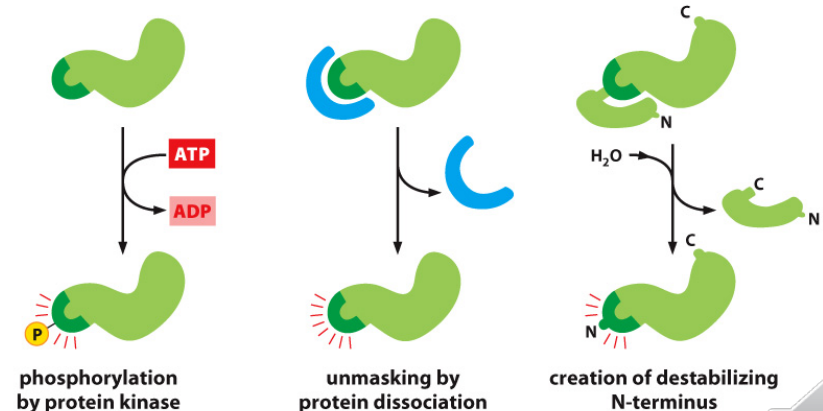


Figure 6-86 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Recyklace proteinů vs. jejich degradace v lysozómech

- ▶ endocytóza a lysozomy regulují hladinu povrchových membránových proteinů;
- ▶ proces regulovaný ubiquitinací – **monoubikvitinace** nebo **multiubikvitinace** – v endozómu poté proteiny, které jsou součástí ESCRT – endosome sorting complex required for transport – rozpoznají ubiquitinované proteiny a zablokuje jejich recyklaci na membránu – degradace;

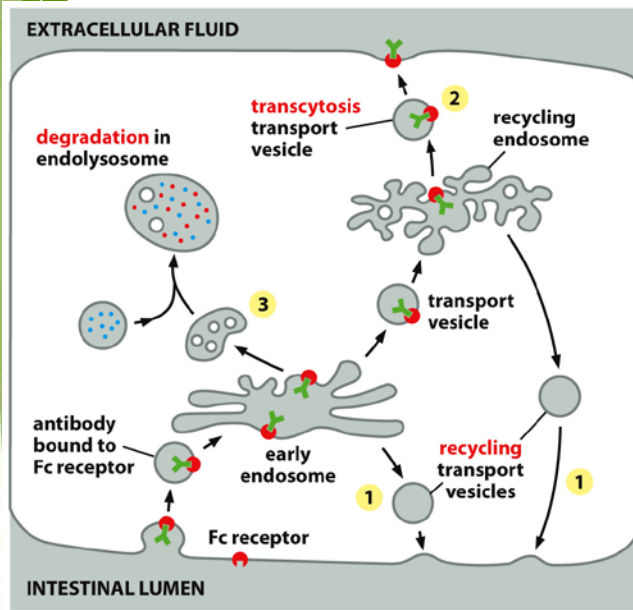


Figure 13-58 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

- ▶ endozomy tedy hrají důležitou roli v signální transdukcí a kontrole buněčného metabolismu – umožňují např. kontrolovat buňkám příjem glukózy prostřednictvím sekvestrace glukózových transportérů v recyklujících endozómech nebo kontrolovat hladinu povrchových receptorů, např. některých receptorových tyrozin kináz;

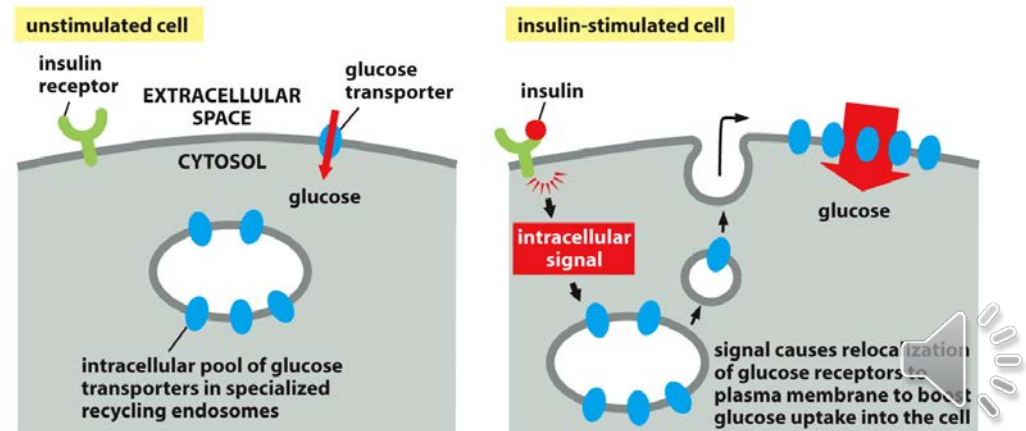


Figure 13-59 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

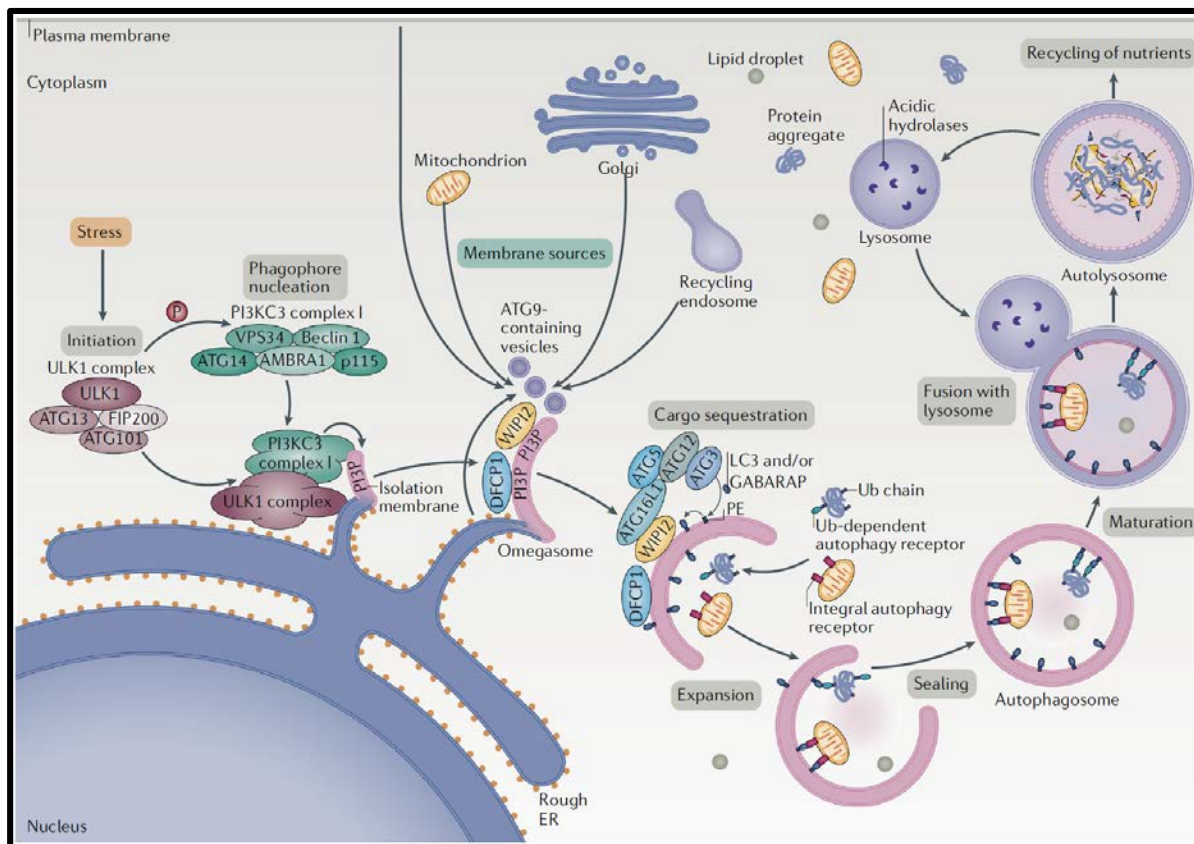
Autofagie

- ▶ proces degradace buněčného materiálu v lysozómech je také označován jako **autofagie**;
- ▶ termín zavedl objevitel lysozómů a peroxizómů, a nositel Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství za rok 1974, Christian de Duve, již v 60. letech – dlouhou dobu však tento buněčný proces nevzbuzoval velkou pozornost; teprve Yoshinori Ohsumi (Nobelova cena 2016) identifikoval první tzv. „autophagy-related genes (ATGs) – prudký rozvoj výzkumu v posledních letech;
- ▶ buňky degradují nejen endogenní membránové proteiny pohlcené **endocytózou** ale i další vnitřní buněčné struktury v průběhu **autofagie**;
- ▶ buňky využívají mechanismus autofagie k odstraňování proteinů i organel – v průběhu růstu, diferenciaci i v reakci na stres;
- ▶ autofagie může být **nespecifická (neselektivní)** – např. při hladovění, ale může sloužit i ke **specifické selektivní degradaci určitých organel** nebo pravděpodobně i proteinových komplexů;
- ▶ **autofagie hraje důležitou obrannou roli v udržování homeostázy buněčného prostředí** - narušení kontroly autofagie je spojeno s rozvojem **onemocnění** (nádory, onemocnění imunitního systému, neurodegenerativní poruchy, či obecně proces stárnutí);



Proces autofagie

- ▶ proces **autofagie** zahrnuje:
 - ▶ tvorbu **fagoforu** ve specifické oblasti ER, tzv. omegazómu (vysoký obsah PI3P); dojde k navázání organel/proteinů, které budou degradovány prostřednictvím autofagie;
 - ▶ buněčné membrány poté přispívají k **elongaci autofagozómu**, který je posléze uzavřen; po odstranění ATG proteinů (zrání autofagozómu) dojde k jeho **fúzi s lysozómem** a **degradaci pohlceného materiálu** kyselými hydrolázami.



Otázky k zamyšlení:

- ▶ Jaká je struktura eukaryotického ribozómu, jak probíhají základní kroky translace?
- ▶ Jak probíhá proces skládání proteinů, jaká je při něm úloha tzv. chaperonů?
- ▶ Jaké jsou typické post-translační modifikace proteinů a jakou mohou hrát roli v jejich funkci?
- ▶ Jak je kontrolován přesun proteinů do cílových organel?
- ▶ Jakým způsobem jsou transportovány proteiny do mitochondrií?
- ▶ Jak probíhá transport proteinů do endoplazmatického retikula a jak mohou být začleněny do membrány?



K zamyšlení:

- ▶ Jak probíhá skládání a glykosylace proteinů v endoplazmatickém retikulu?
- ▶ Jaká je úloha Golgiho aparátu v glykosylaci a transportu proteinů?
- ▶ Jaké jsou rozdíly mezi konstitutivní a regulovanou sekreční dráhou?
- ▶ Jak probíhá degradace proteinů v proteazómech a lysozómech; jakou roli hraje ubikvitinace?
- ▶ Úloha endozómů v signalizaci?
- ▶ Co to je autofagie?



Příští přednáška:

- BUNĚČNÝ METABOLISMUS
- základní dráhy energetického metabolismu buňky a dynamická podstata jejich regulací – glykolýza, citrátový cyklus a oxidativní fosforylace, pentózový cyklus, glukoneogeneze,
- mitochondriální metabolismus a jeho regulace na úrovni buňky a mitochondrií; struktura a dynamika mitochondrií;
- zásoby energie - syntéza a degradace glykogenu, syntéza a degradace mastných kyselin v kontextu živočišné buňky;
- metabolické dráhy ve specializovaných buněčných typech a v patologii;

