

# Vnitrobuněčné oddíly a transport mezi nimi

# Buněčné kompartmenty

Zajištění separace a podíl na organizaci průběhu chemických reakcí dvěma způsoby:

- soustředění enzymů ke katalýze určitého sledu reakcí do jednoho proteinového komplexu (např. syntéza DNA, RNA, proteinů)
- soustředění metabolických dějů do buněčných oddílů ohraničených membránou

# Výhody kompartmentalizace

- v buňkách probíhá mnoho protichůdných chemických procesů, jejich **oddělení zabrání chaosu**
- **vytvoření chemického mikroprostředí**, které je vhodné pro daný typ chemických dějů (snížení difúze substrátů, obsah iontů, pH)
- **oddělení potenciálně nebezpečných rozkladných dějů** (hydrolytické enzymy - lysozomy, oxidativní enzymy - peroxizomy)
- **dělbá práce mezi organelami**

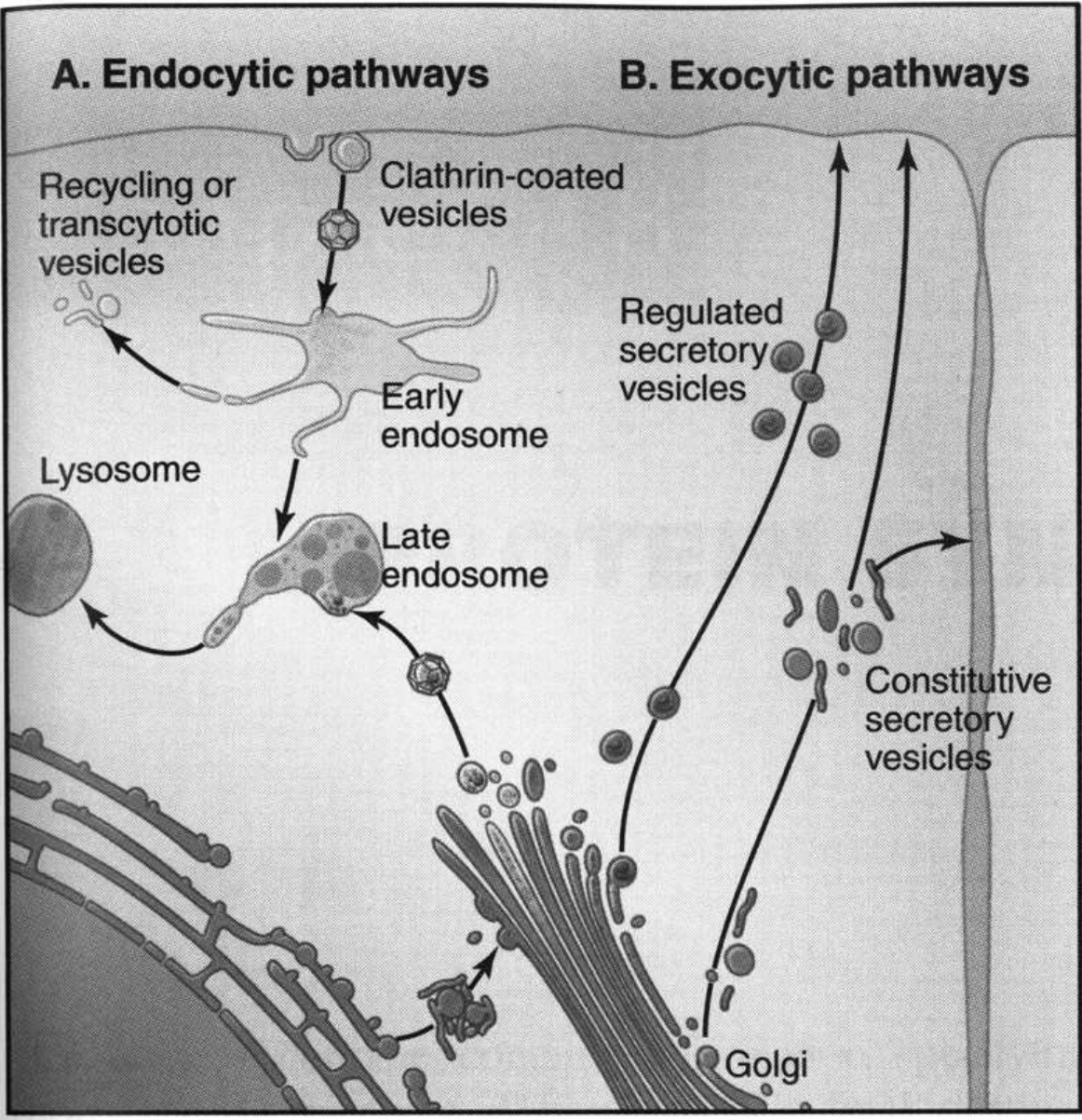
# Organely mají často monopol na výkon určité funkce

- Endoplazmatické retikulum: syntéza složek membrán a lipidů
- Lysozomy: degradace proteinů
- Mitochondrie: výroba chemické energie

Dělbba práce má mnoho výhod, ale také záludností, především z hlediska koordinace, nutnosti biosyntézy organel, třídění proteinů pro různé destinace apod.

# Sekreční a endocytické dráhy

- buněčné oddíly nejsou autonomní, ale slouží celé buňce: integrace, koordinace
- buňka disponuje mechanismy pro transport materiálů mezi oddíly a skrze membránu, která je obklopuje
- funkční propojení některých organel probíhá v logickém sledu pochodů (dráha, „pathway“)
- **sekreční (exocytická) dráha** koordinuje biosyntézu organel a zajišťuje vylučování molekul do mimobuněčného prostoru
- **endocytická dráha** se podílí na příjmu a zpracování signálů z vnějšího prostředí



# Vezikulární transport

- transport proteinů a lipidů mezi organelami
- zajišťuje správné umístění těchto molekul uvnitř nebo vně buňky

# Na transportu a skládání proteinů do správné konformace se podílejí chaperony

- usnadňují skládání nově syntetizovaných nebo denaturovaných proteinů
- vážou hydrofobní zbytky polypeptidů, brání agregaci proteinů

## 2 třídy chaperonů:

1. Proteiny **Hsp70** a jejich regulátory
2. **Válcovité chaperoniny**



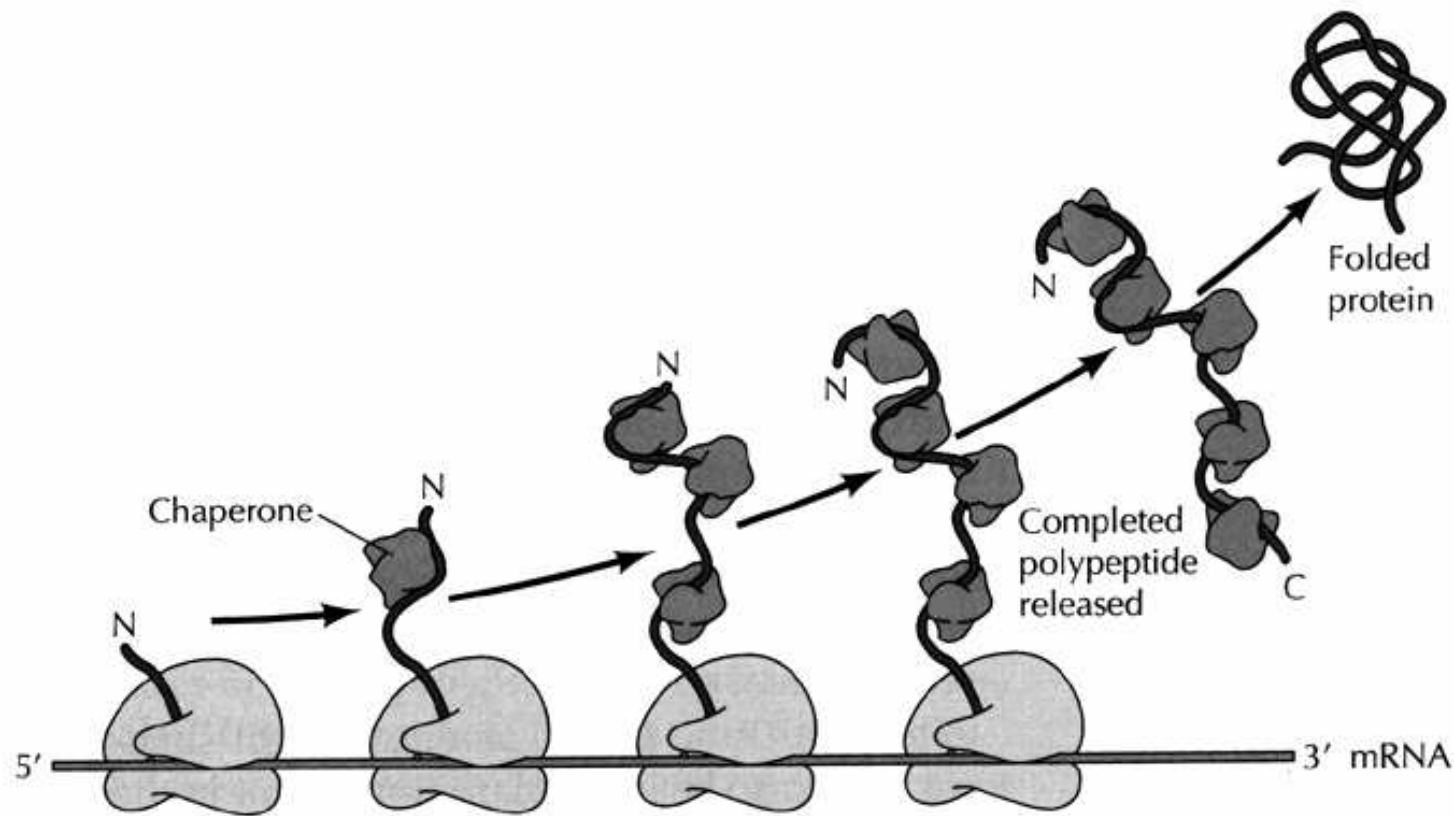
# Hsp70

- „heat-shock proteins“
- tvořeny buňkou vystavenou stresu
- stabilizují částečně složené polypeptidy a napomáhají jejich správnému složení

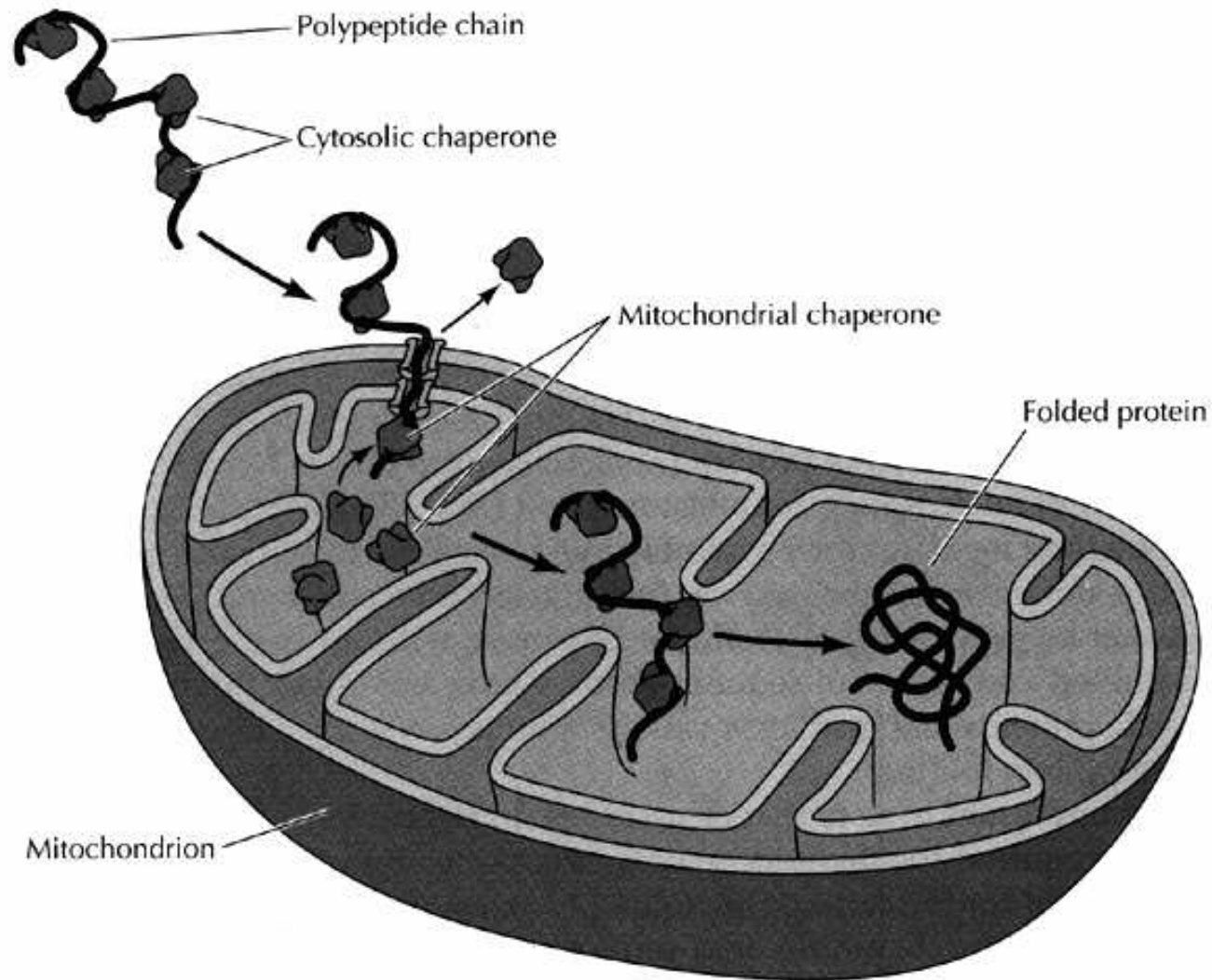
## Vážou se na:

- chybně poskládané proteiny
- nově vznikající polypeptidy na ribozomech

# Působení chaperonů při translaci



# Působení chaperonů při transportu proteinů



# Struktura a funkce bakteriálního Hsp70 (DnaK)

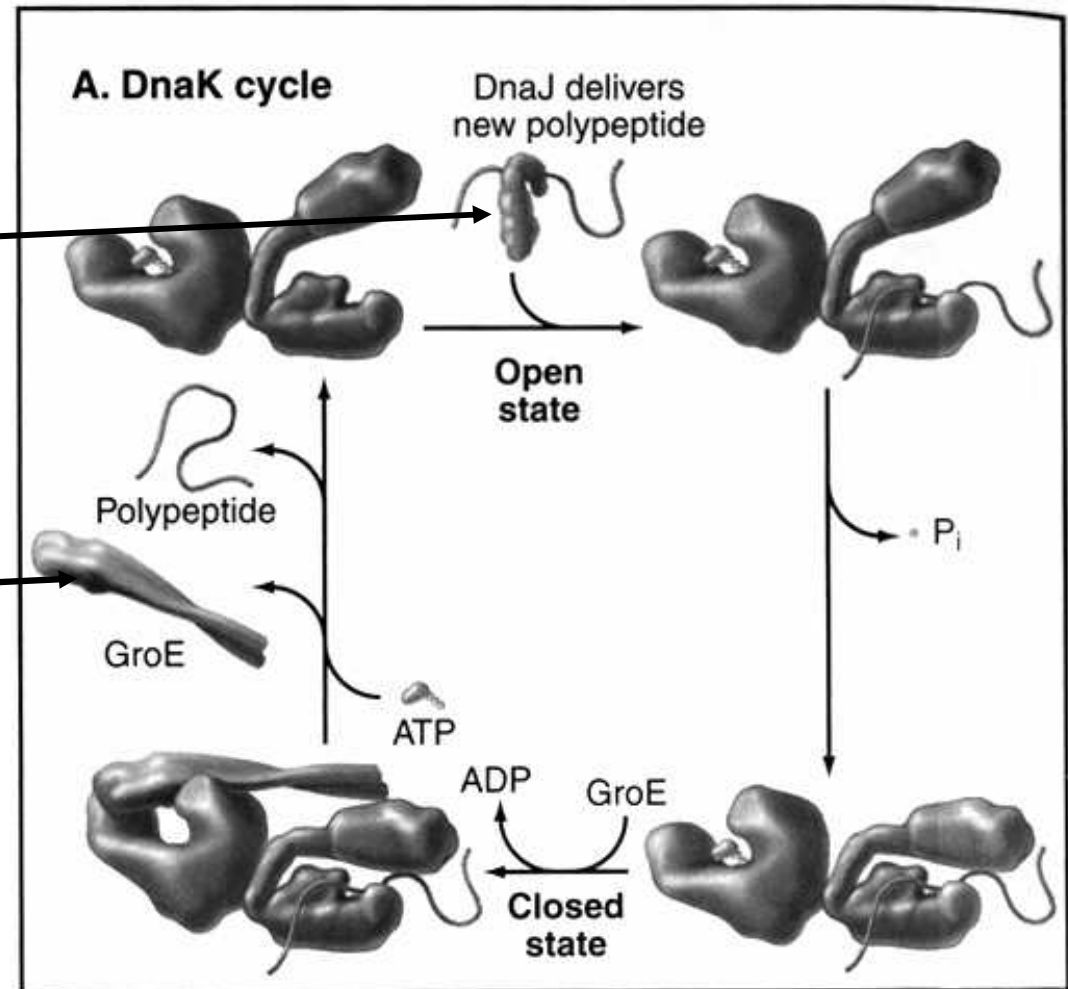
- N-konec: doména pro vazbu peptidu
- C-konec: doména pro vazbu ATP

Přítomnost **ADP** na DnaK napomáhá spojení DnaK s nesloženým peptidem

Vazba **ATP** napomáhá uvolnění složeného peptidu

# Funkce podpůrných proteinů Hsp40 (DnaJ) a GroE

- **DnaJ**: cytosolický protein, přináší nesložený polypeptid k DnaK a stimuluje jeho vazbu hydrolyzou ATP
- **GroE**: stimuluje uvolnění ADP. Vázaný peptidu a GroE se uvolní po další vazbě ATP

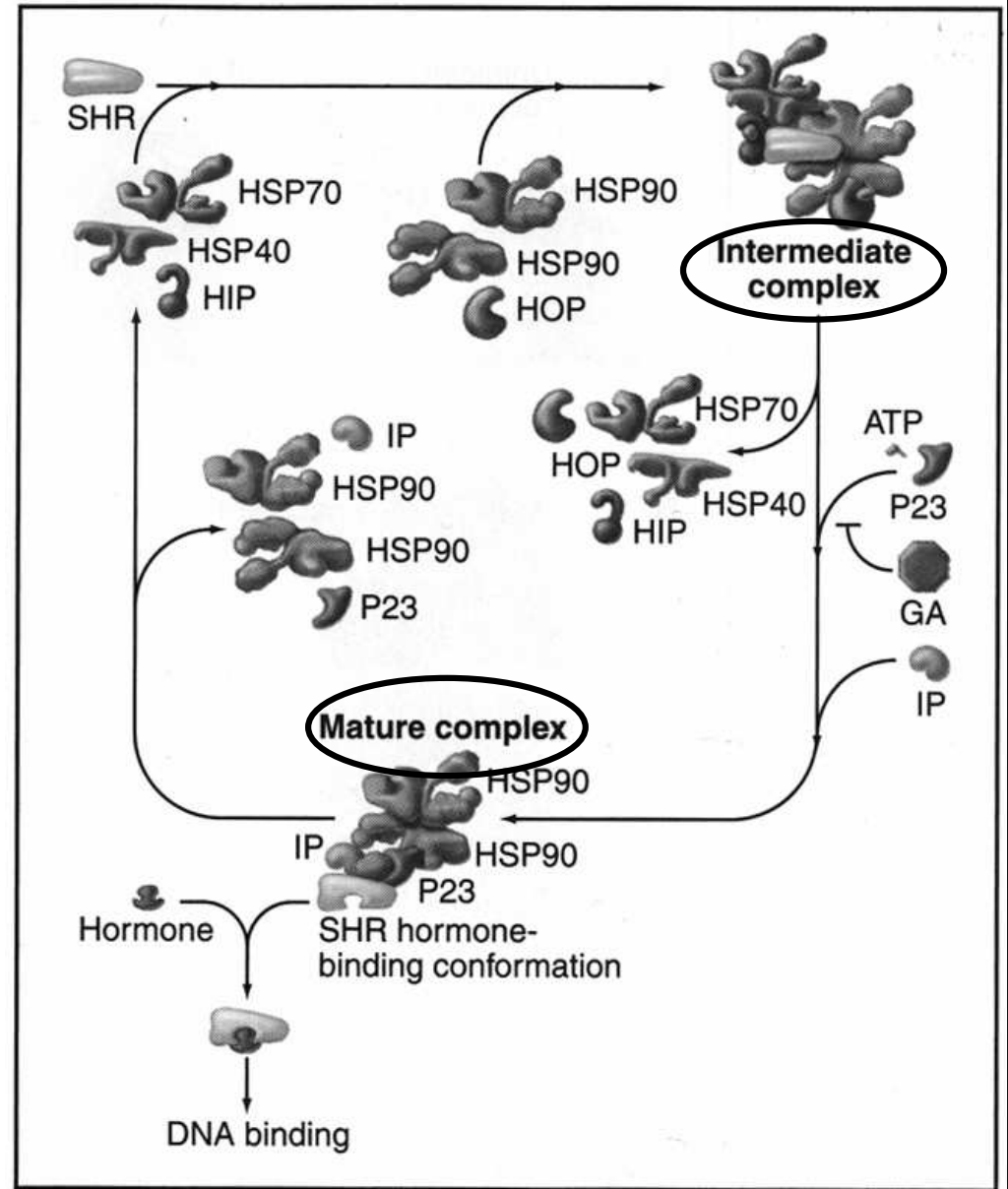


# Hsp70 u savců

- existuje řada proteinů s doménou J podobných DnaJ
- vyhledávají specifické substráty
- mají vnitřní aktivitu zajišťující výměnu nukleotidů a uvolnění peptidů (není třeba ekvivalent GroE)

# Hsp90

- podíl na správném skládání důležitých signálních molekul, např. receptorů pro steroidní hormony (SHR)
- nejdříve se k receptoru váže **Hsp70** a **Hsp90** a vzniká „intermediární komplex“
- Po vytěsnění Hsp70 vzniká zralý komplex **Hsp90 / receptor**, který udržuje receptor ve správné „otevřené“ konformaci pro vazbu ligandu
- navázaný ligand vytěsňuje Hsp90 a umožní translokaci komplexu do jádra

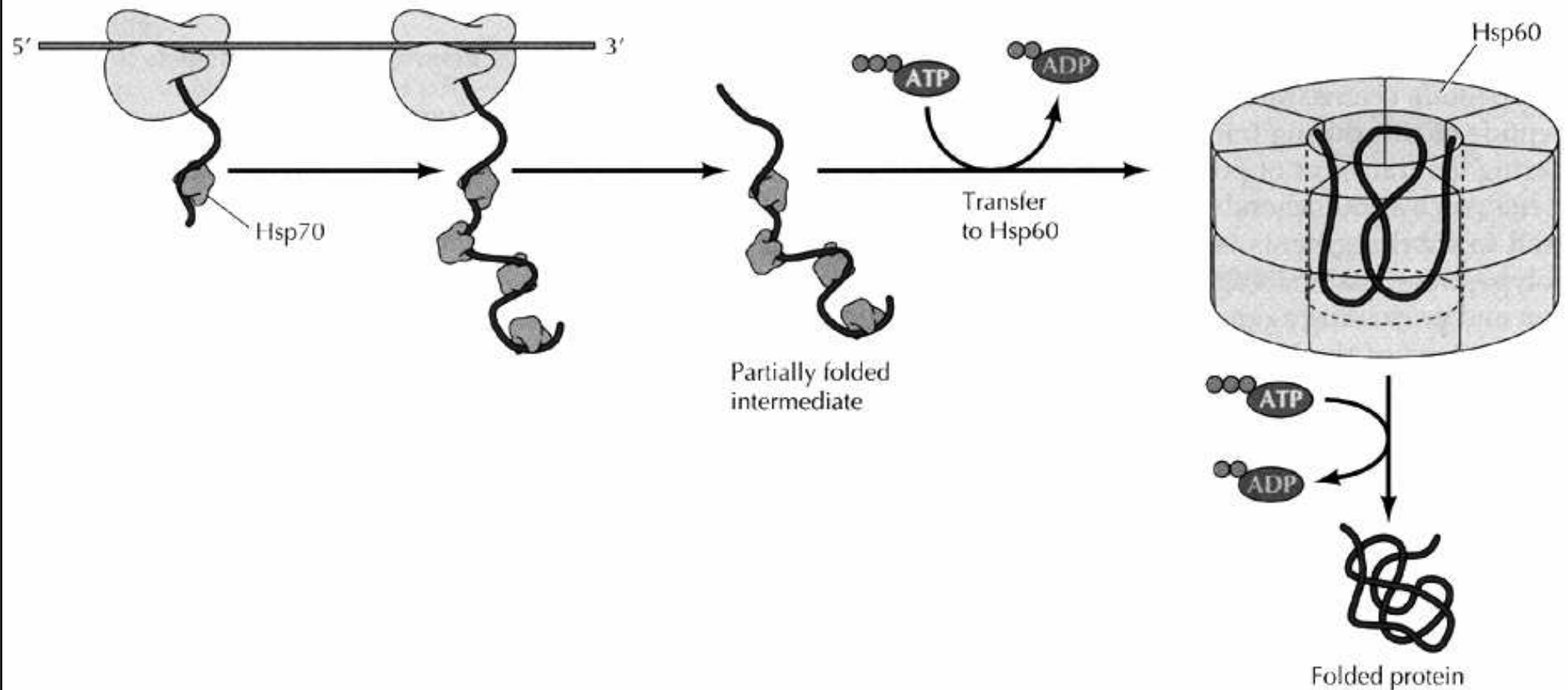


# Chaperoniny (Hsp60)

- válcovité částice zapojené do skládání proteinů
- umožňují skládání nově vznikajícím a denaturovaným proteinům tím, že jim poskytují prostor oddělený od cytoplazmy
- 85% nově tvořených proteinů se skládá spontánně nebo s pomocí Hsp70, zbytek potřebuje asistenci chaperoninů



# Hsp70 a Hsp60 se často uplatňují postupně

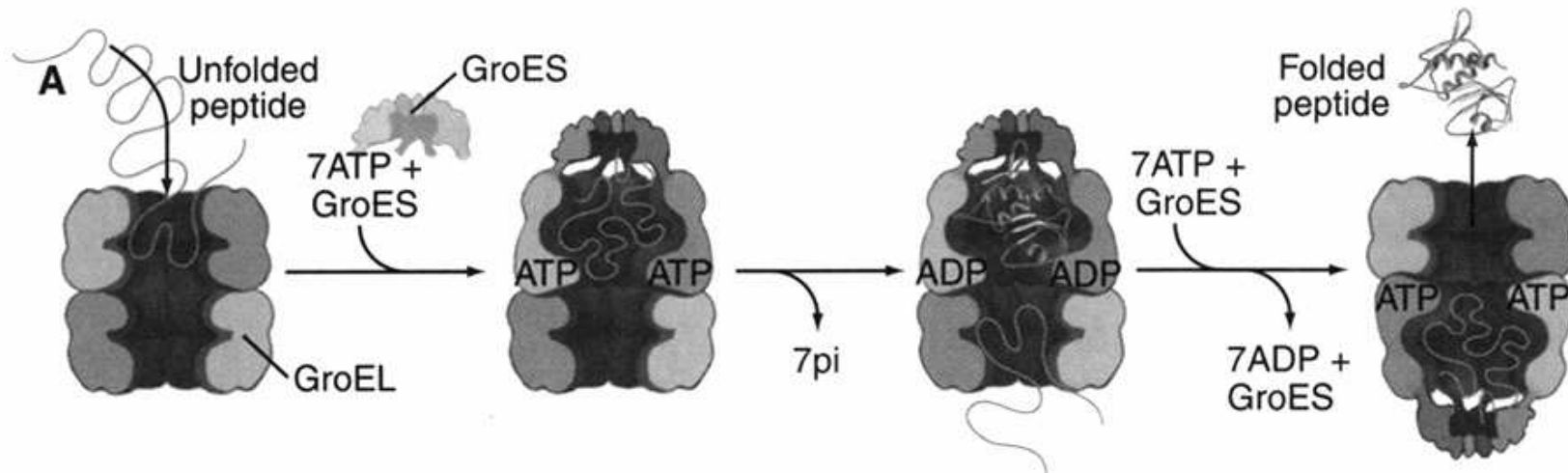


# Chaperoniny GroEL/GroES u *E. coli*

- podíl na post-translačním skládání vznikajících proteinů u bakterií
- struktura: plášť válce (**GroEL**) obklopující dutinu a „poklička“ (**GroES**)
- GroEL tvoří dva kruhy složené ze sedmi podjednotek (obdobná struktura u mitochondrií - Hsp60/Hsp10, chloroplastů - Cpn60/Cpn10, eukaryotických chaperoninů - TriC)

# Funkce chaperoninů GroES/GroEL

- nesložené polypeptidy se vážou k hydrofobním zbytkům na vnitřní stěně válce GroEL
- ATP se váže ke každé podjednotce jednoho z kruhů, který obklopuje polypeptid
- změna konformace vedoucí k zvětšení vnitřního prostoru a k vazbě GroES
- hydrolýza ATP na kruhu obklopujícím polypeptid+ vazba ATP a GroES na spodní kruh způsobí disociaci horního GroES a otevření dutiny
- složený polypeptid dutinu opouští, zatímco neúplně složené intermediáty mohou znovu vázat GroEL a proces skládání opakovat



## U mitochondrií a chloroplastů se uplatňují systémy obdobné GroEL/ GroES

Nové polypeptidy se po translokaci do organely nejprve asociují s Hsp40 a Hsp70:

- schopnost skládání je zachována
- zajištění přenosu polypeptidu do chaperoninového komplexu pro dokončení procesu skládání

# Odlišnosti ve využití systémů skládání polypeptidů u prokaryot a eukaryot

## Eukaryotické buňky:

- tvoří větší proteiny, obsahující různé domény oddělené spojovacími oblastmi („hinge-regions“)
- využívají především ko-translačního způsobu skládání proteinů s využitím systémů Hsp70/Hsp40 (dominantní úloha posttranslačních mechanismů u prokaryot)

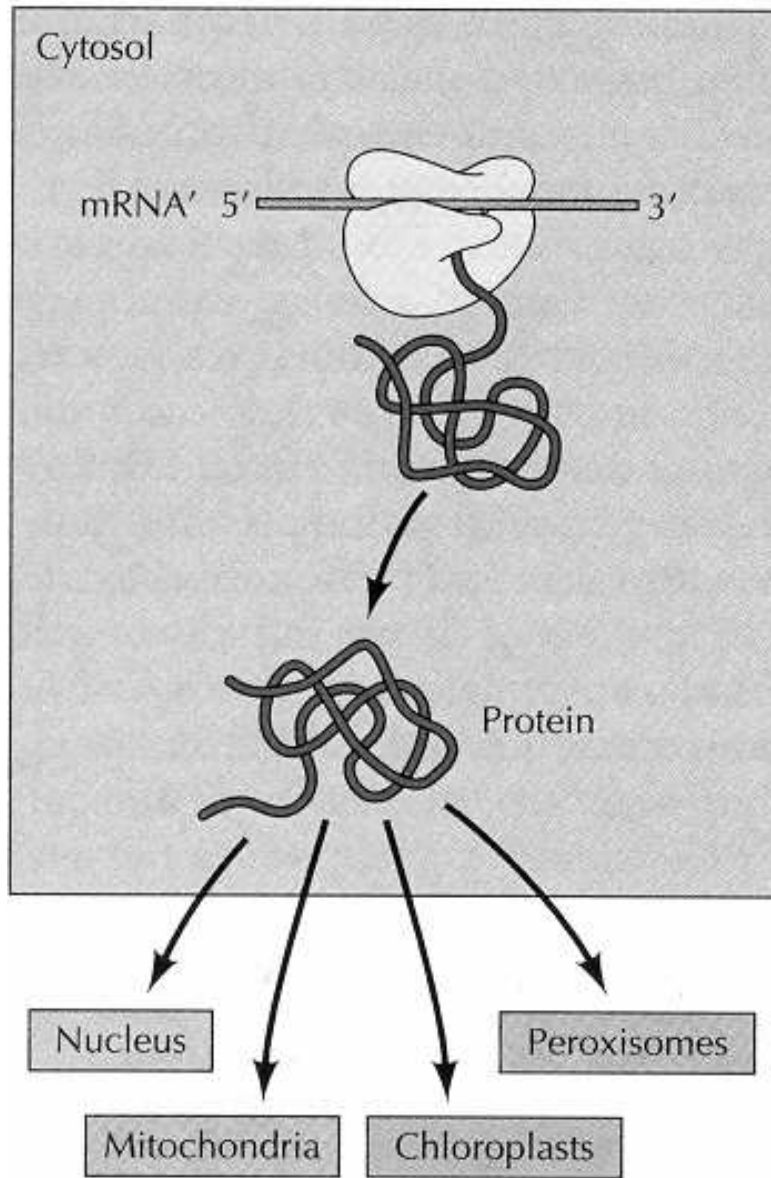
*Table 7.2* Molecular Chaperones

| <b>Protein family</b> | <b>Chaperone proteins</b> |   |
|-----------------------|---------------------------|---|
|                       | <b>Prokaryotes</b>        | <b>Eukaryotes</b>   |
| Hsp70                 | DnaK                      | Hsc73 (cytosol)<br>BiP (endoplasmic reticulum)<br>mHsp70 (mitochondria)<br>ctHsp70 (chloroplasts) |
| Hsp60                 | GroEL                     | Hsp60 (mitochondria)<br>Cpn60 (chloroplasts)  |
| Hsp90                 | HtpG                      | Hsp90 (cytosol)<br>Grp94 (endoplasmic reticulum)  |
| TRiC                  | TF55                      | TRiC (cytosol)  |

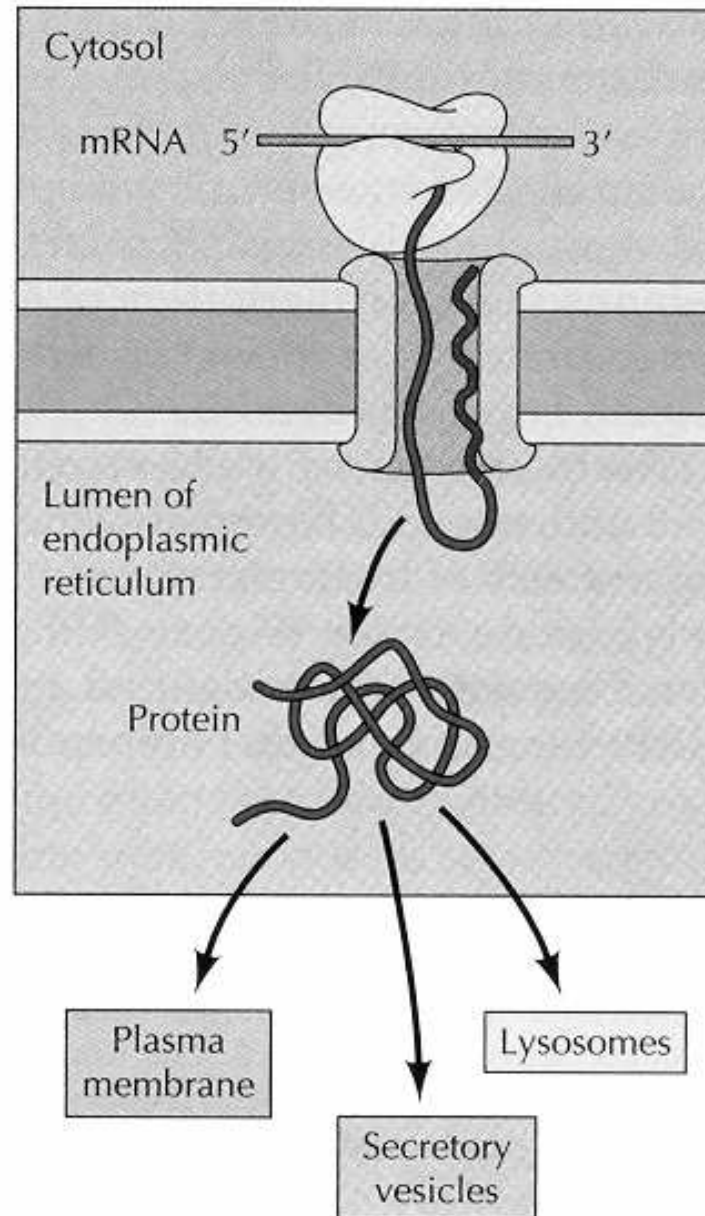
# Třídění proteinů

- organely se v eukaryotické buňce zvětšují a dělí
- růst organel je důsledkem přidávání nových molekul lipidů a proteinů (membránových i rozpustných)
- proteiny a lipidy se do organel dostávají buď **přímo z cytozolu** (mitochondrie, chloroplasty, peroxisomy, vnitřek jádra) nebo **nepřímo přes ER** (Golgiho aparát, lysozomy, endozomy, jaderná membrána)

### Free ribosomes in cytosol



### Membrane-bound ribosomes





# Přímý vstup proteinů do membránových organel z cytosolu

- syntéza proteinů na ribozomech v cytosolu (pouze malý počet proteinů je syntetizován na ribozomech mitochondrií a chloroplastů)
- import do organel je určen přítomností adresové sekvence
- *adresová sekvence* je pořadí aminokyselin uvnitř proteinu, která určuje do jaké organely se protein má dopravit
- absence adresové sekvence znamená, že protein má zůstat v cytosolu

# Adresová sekvence

- 15-60 aminokyselin
- pro ER nazývána *signální sekvence*
- často (ne vždy) odstraněna z hotového proteinu
- nezbytná a postačující podmínka pro směrování proteinu do příslušné organely
- adresové sekvence pro stejné cílové místo se mohou lišit (úloha fyzikálních vlastností - hydrofobicita, umístění nabitých aminokyselin)

## Experimenty:

- odstraněním adresové sekvence z proteinu ER umístíme bílkovinu v cytozolu
- začleněním signální sekvence do cytozolového proteinu způsobíme nasměrování proteinu do ER

---

**Tabulka 14-3 Některé typické adresové sekvence**

---

| <b>Funkce signálu</b>  | <b>Příklad adresové sekvence</b>   |
|------------------------|--|
| Import do ER           | <sup>+</sup> H <sub>3</sub> 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- |
| Zadržení v lumen ER    | -Lys-Asp-Glu-Leu-COO <sup>-</sup>  |
| Import do mitochondrií | <sup>+</sup> H <sub>3</sub> 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 do jádra        | -Pro-Pro-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-  |
| Import do peroxisomů   | -Ser-Lys-Leu-  |

---

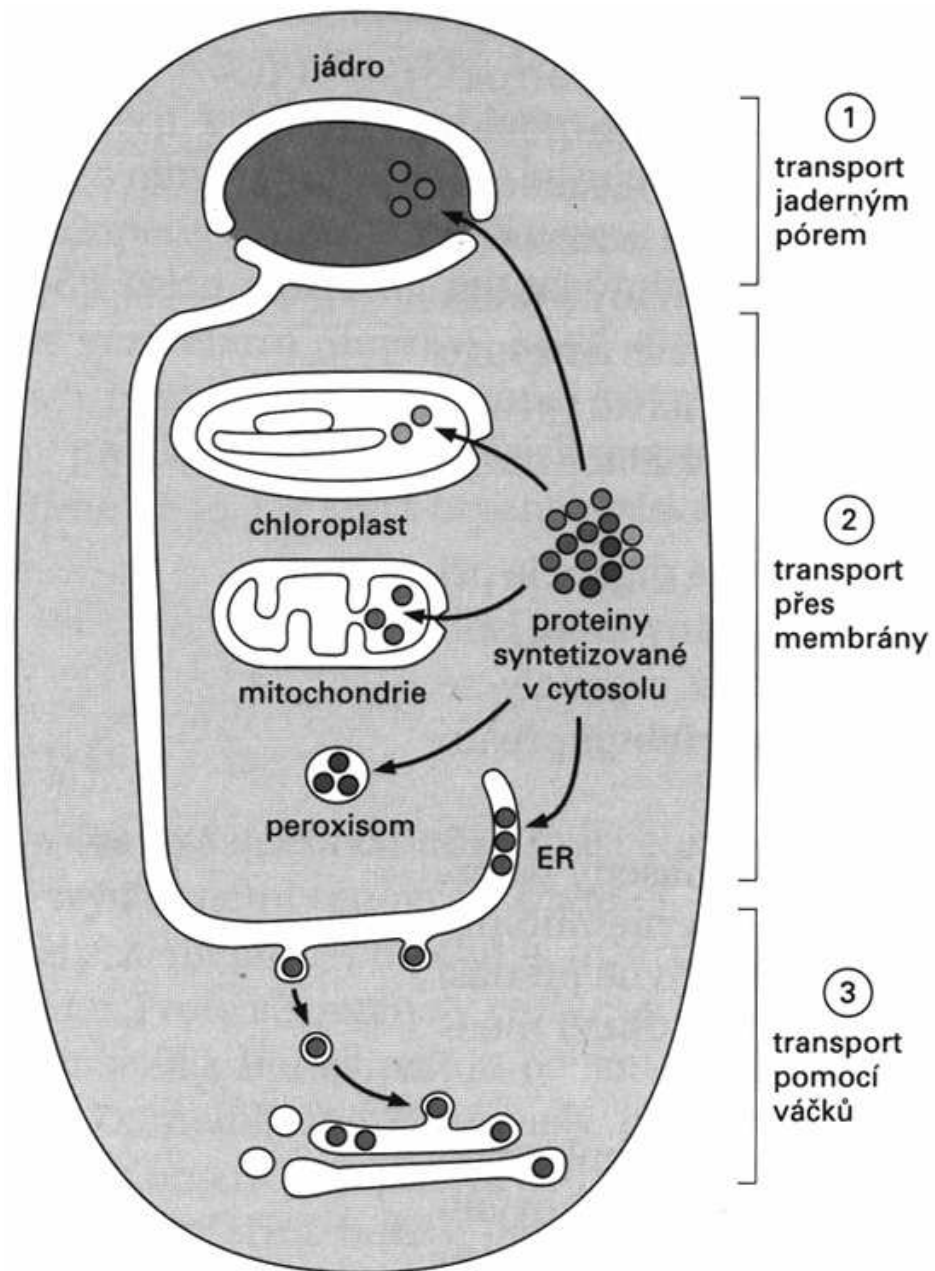
Kladně nabité aminokyseliny jsou ukázány *červeně*, záporně nabité aminokyseliny jsou vyznačeny *zeleně*. Rozsáhlý úsek hydrofobních aminokyselin je uzavřen ve *žlutém* poli. <sup>+</sup>H<sub>3</sub>N znázorňuje N-konec proteinu (amino-konec), COO<sup>-</sup> ukazuje C-konec proteinu (karboxylový konec).

---

# Tři mechanismy importu proteinů do membránových organel

- membrána není pro hydrofilní molekuly propustná
  - nutný přísun energie
1. použití **jaderných pórů** (transport přes jadernou membránu)
  2. použití **proteinových translokátorů** (transport do ER, mitochondrií, chloroplastů, peroxisomů)
  3. použití **transportních váčků** (transport z ER)

# Hlavní mechanismy importu proteinů do organel

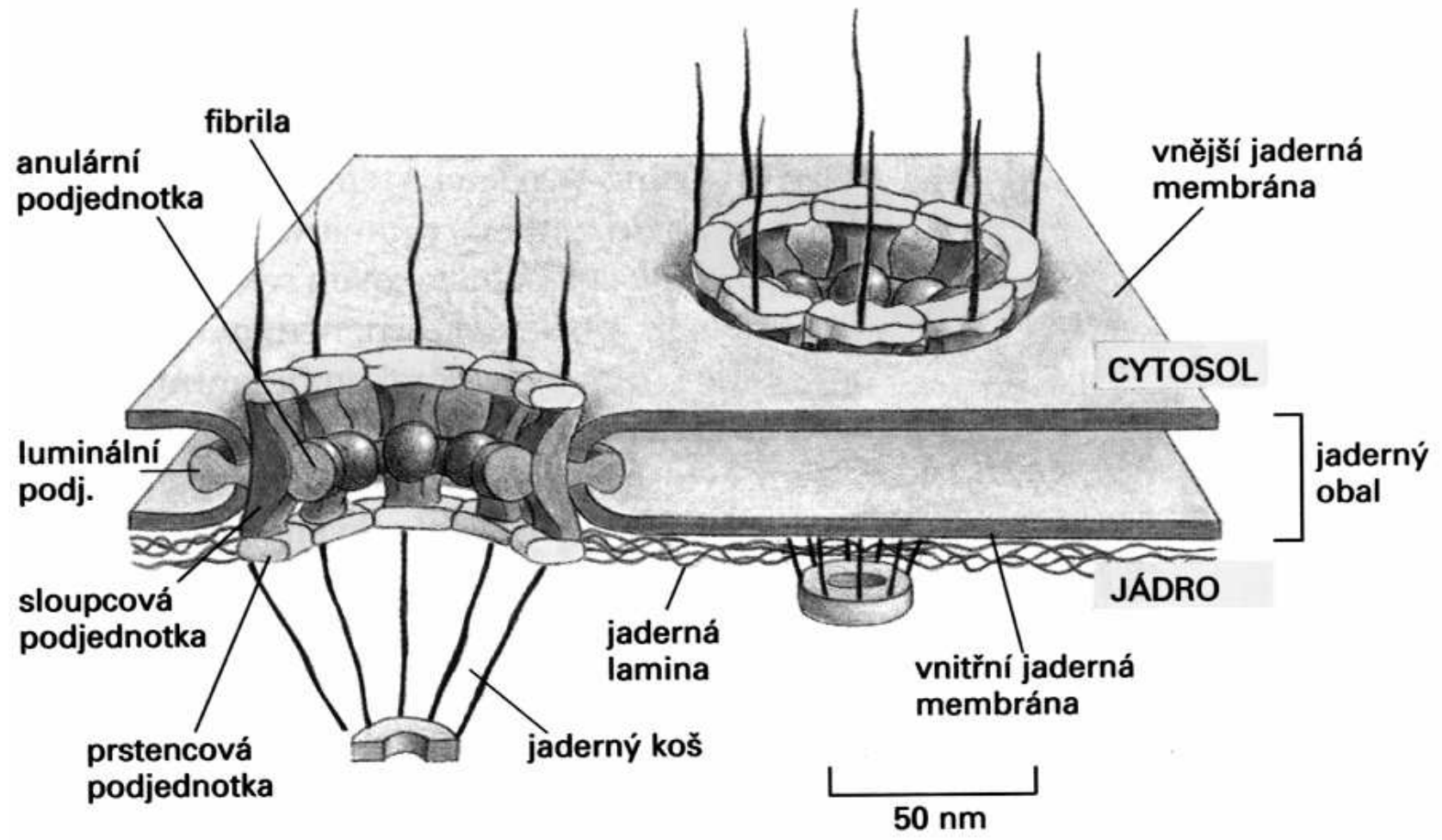


# Transport jadernými póry

- pór prostupuje vnější i vnitřní jadernou membránou
- funguje jako selektivní branka, která aktivně přenáší specifické makromolekuly a zároveň umožňuje volnou difúzi menších molekul
- transport póry je obousměrný:
  - z cytozolu přicházejí proteiny určené jádru
  - z jádra cestují molekuly RNA a ribozomální podjednotky skládané v jádře
- molekuly mRNA, které nedokončily sestřih nejsou exportovány (kontrola kvality)

# Struktura jaderného póru

- komplexní, tvoří jej více než 100 proteinů
- obsahuje jeden nebo více kanálů naplněných vodou (umožnění volného průchodu pro malé molekuly rozpustné ve vodě)
- větší molekuly (RNA, proteiny) a makromolekulární komplexy nemohou póry přecházet bez zvláštního třídícího signálu (tzv. jaderný lokalizační signál)





# Transport do jádra probíhá ve dvou krocích

## 1. krok:

- nevyžaduje ATP/GTP
- proteiny obsahující jadernou adresovou sekvenci se vážou k jadernému póru, ale neprocházejí jím
- adresová sekvence je rozeznána cytosolickým receptorem (prototypový receptor - **importin**), který se váže k jadernému póru

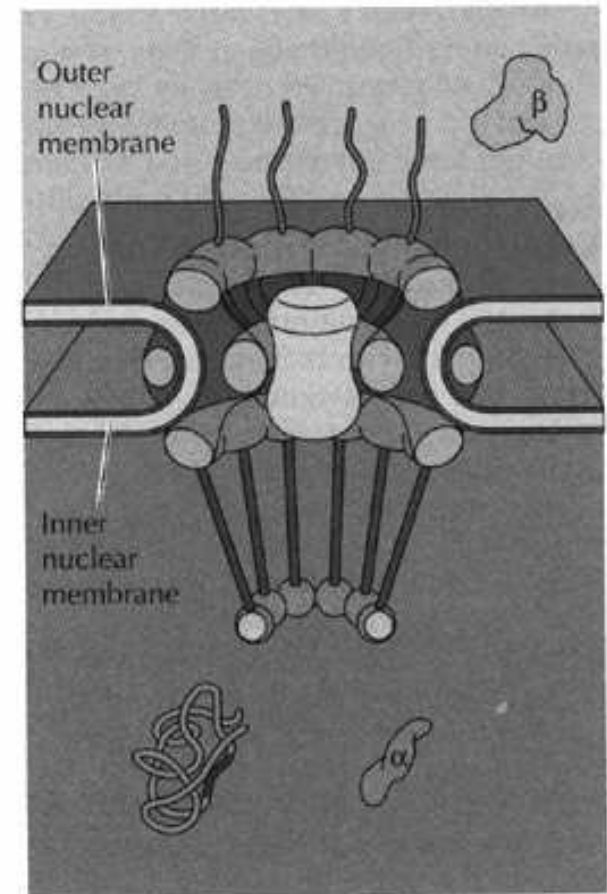
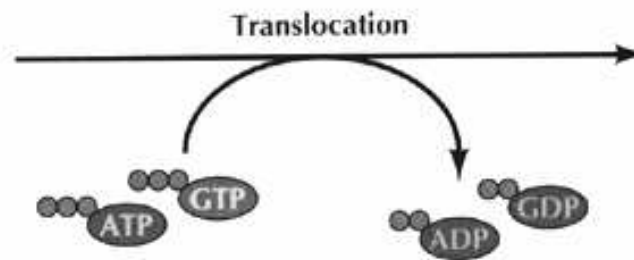
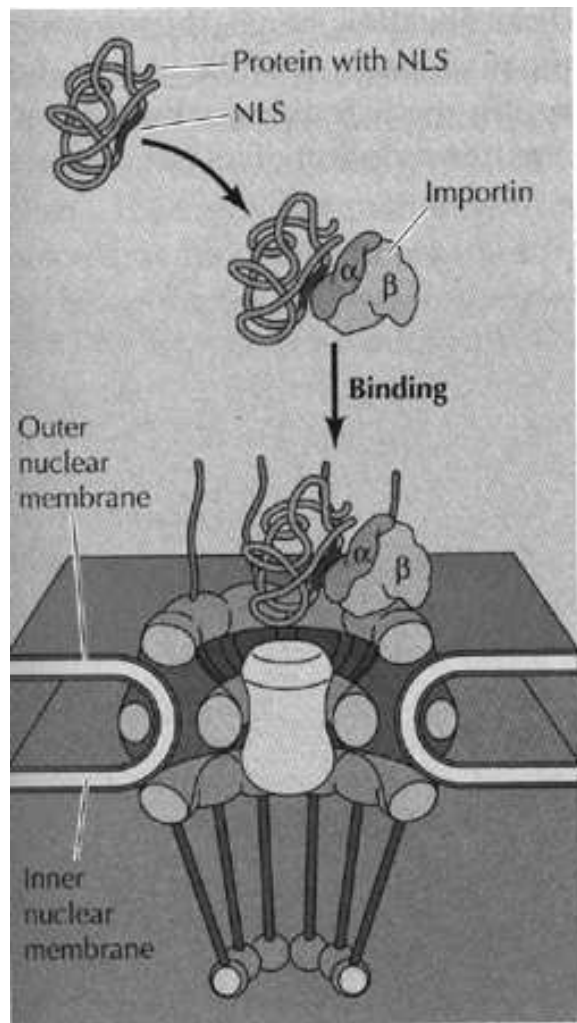
Importin má 2 podjednotky:

- $\alpha$  importin váže jadernou adresovou sekvenci
- $\beta$  importin zajišťuje spojení s komplexem póru

# Transport do jádra probíhá ve dvou krocích

## 2. krok:

- vyžaduje ATP nebo GTP
- vlastní translokace jaderným pórem
- importin  $\alpha$  je translokován společně se substrátem
- importin  $\beta$  se v průběhu translokace odděluje



# Regulace importu do jádra

- jeden ze způsobů řízení aktivity jaderných proteinů
- transkripční faktory fungují jen v jádře, zabránění importu jim nedovolí vykonávat svou funkci

## Jeden z mechanismů:

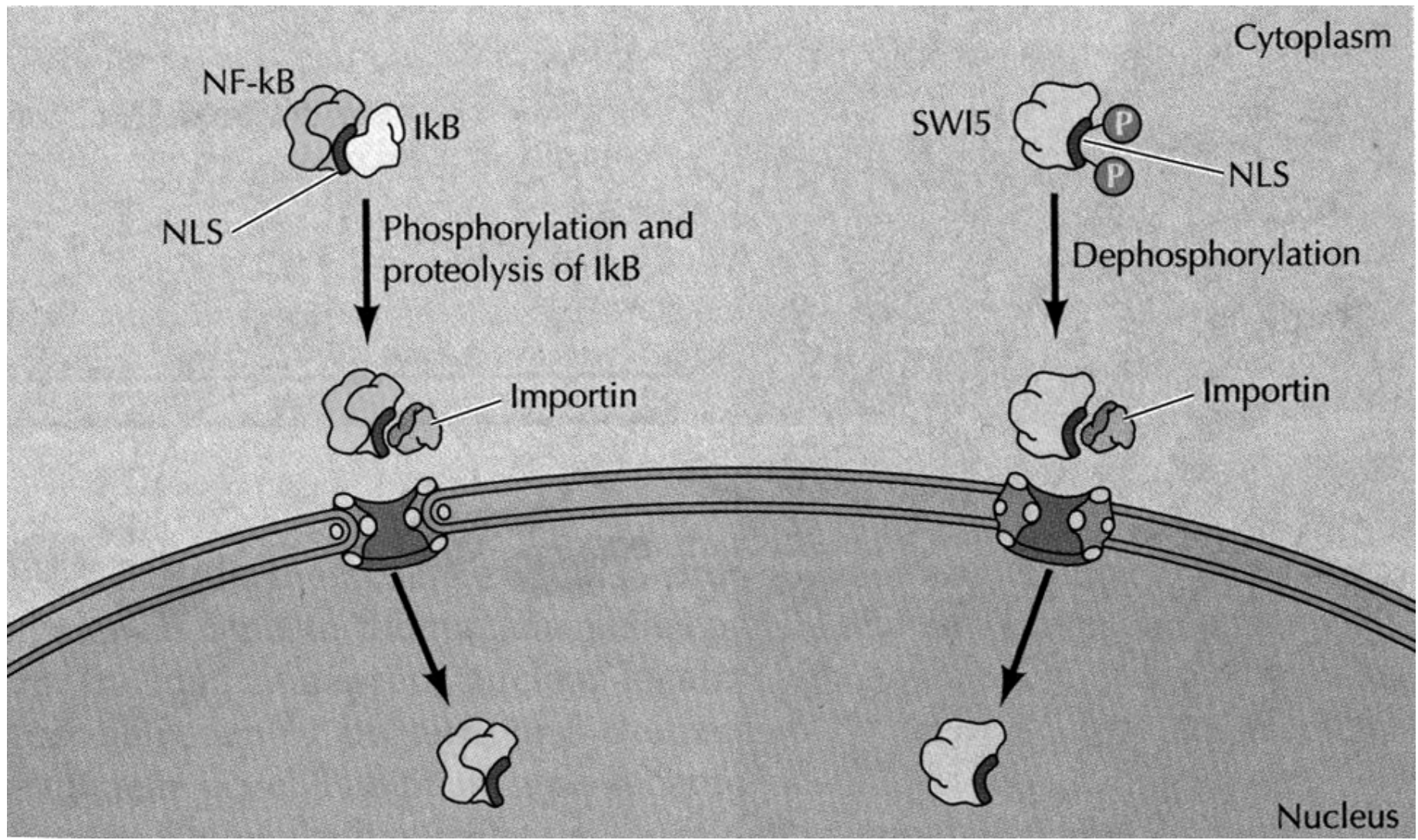
- v cytoplazmě se tyto faktory spojují s regulačními proteiny, které jim pokryjí jadernou adresovou sekvenci
- protein zůstává v cytoplazmě, dokud není regulační protein odstraněn

# Regulace NF $\kappa$ B

- transkripční faktor
- aktivuje transkripci genů pro lehké řetězce k imunoglobulinů v B lymfocytech
- v nestimulovaných buňkách je NF $\kappa$ B vázán v komplexu s inhibičním I $\kappa$ B, v této formě nemůže být translokován (zamaskování adresové sekvence)
- ve stimulovaných buňkách se I $\kappa$ B fosforyluje a následně degraduje proteolýzou (ubiquitin/proteazom), NF $\kappa$ B je translokován do jádra, aktivace transkripce

# Regulace SWI5

- transkripční faktor u kvasinek
- translokace je přímo řízena fosforylací
- SWI5 je translokován do jádra jen v určité fázi cyklu, kdy je defosforylován
- po zbytek cyklu zůstává v cytoplazmě ve fosforylované formě
- fosforylace nastává na aminokyselinových zbytcích v těsné blízkosti adresové sekvence



# Export RNA z jádra

- rRNA, tRNA, mRNA vzniká v jádře, ale pro expresi genetické informace je nutná jejich přítomnost cytoplazmě
- využívá jaderných pórů
- translokace membránou probíhá v komplexu s proteiny
- nutná energie



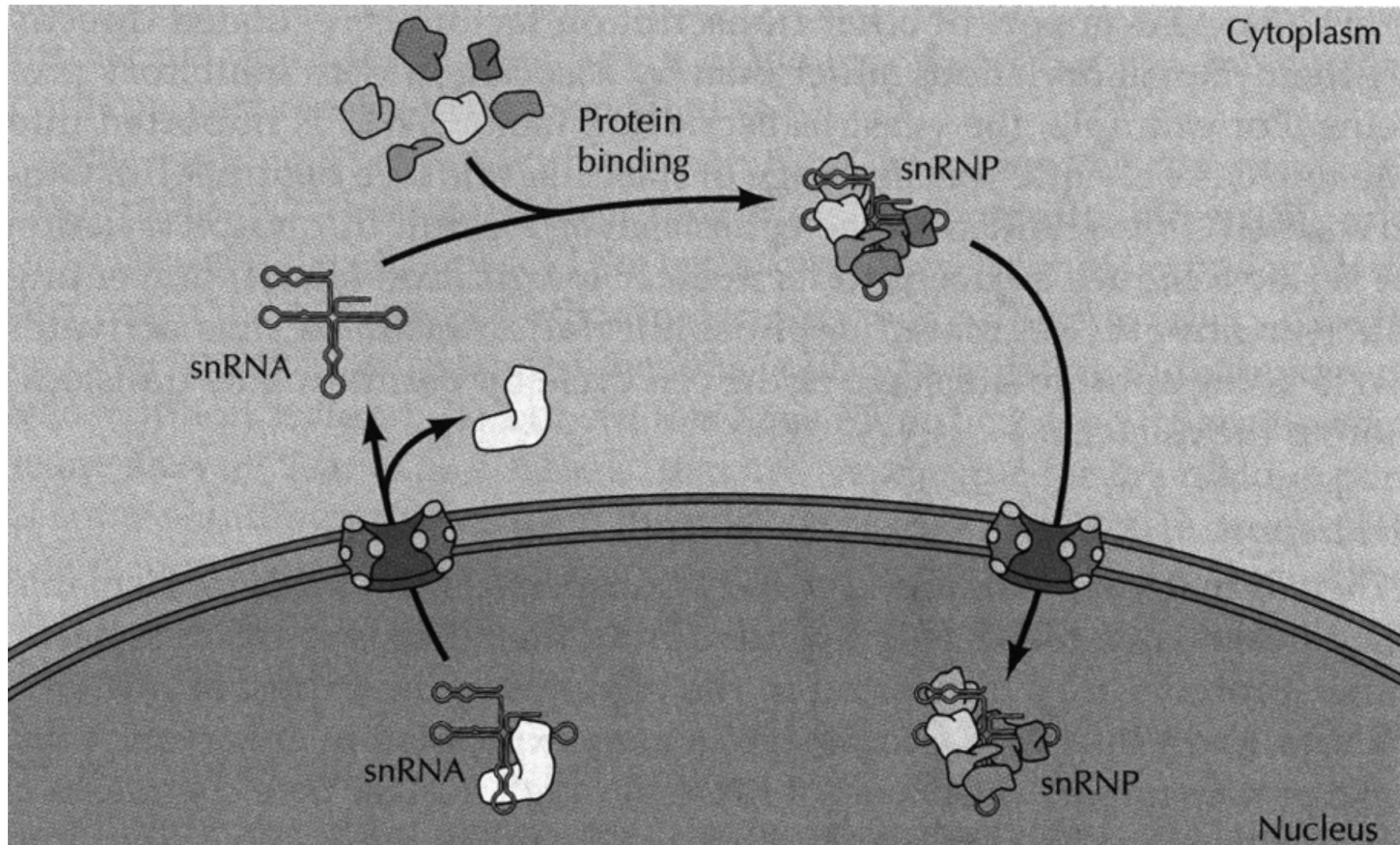
# Export RNA z jádra

- pre-mRNA a mRNA se spojuje s alespoň dvaceti proteiny (vzniká hnRNP)
- alespoň 1 z těchto proteinů obsahuje adresovou sekvenci pro export z jádra
- v jadérku vytváří rRNA spolu s ribozomálními proteiny komplexy
- do cytoplazmy jsou transportovány intaktní ribozomální podjednotky

# Transport snRNA

- funguje v jádře
- účast na sestřihu
- transport z jádra do cytoplazmy
- spojení s příslušnými proteiny (vznik funkčních komplexů)
- návrat do jádra

# Transport snRNA



# Proteinové translokátory

- umístěny v membráně, kde slouží pro přenos proteinů
- přenášený protein se musí rozvinout, aby se mohl protáhnout membránou
- fungují i u bakterií

# Vstup proteinů do mitochondrií a chloroplastů

- obě organely zaměřeny na syntézu ATP
- **vnitřní** a **vnější** membrána je u obou organel, chloroplasty mají navíc **thylakoidní** membránu
- vstup do organel určuje adresová sekvence na N-konci transportovaného proteinu
- přesun přes membránu probíhá ve zvláštních místech, ve kterých jsou vnitřní a vnější membrány ve vzájemném kontaktu
- během přenosu je protein rozvinut a adresová sekvence odstraněna
- transportu přes obě membrány a opětnému složení uvnitř organely napomáhají chaperony

# Import proteinů do mitochondrií

- nutný, protože mitochondriální genom nekóduje proteiny pro replikaci DNA, transkripci nebo translaci ani pro oxidativní fosforylaci
- tyto proteiny se dostávají do mitochondrií jako úplné polypeptidové řetězce
- probíhá buď přes jednu membránu do mezimembránového prostoru nebo do mitochondriální matrix přes obě membrány

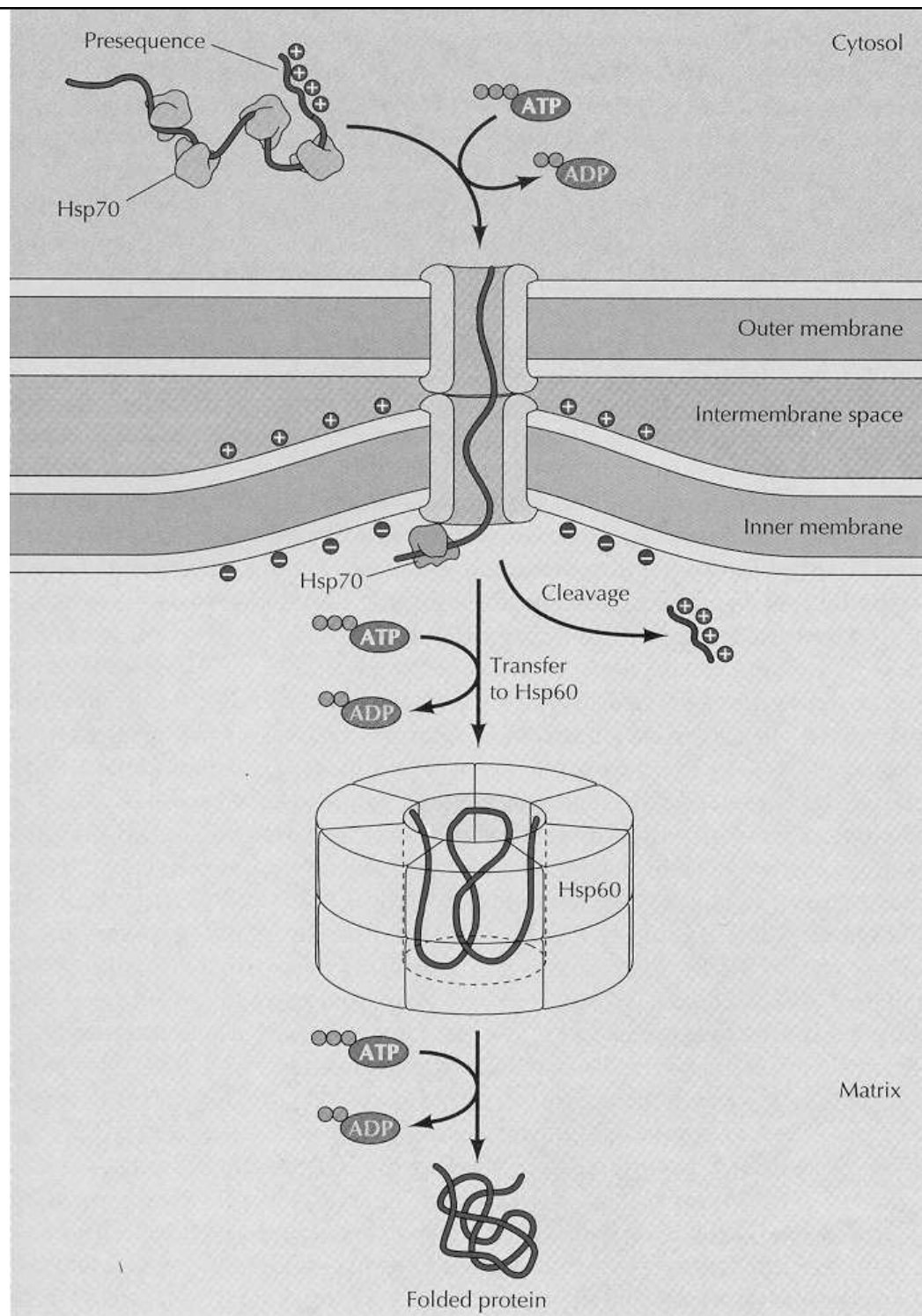
# Transport do mitochondriální matrix

- protein je nasměrován do mitochondrií N-koncovou sekvencí 15 - 35 AA (**presekvence**)
- presekvence se proteolyticky odstraňuje po dokončení transportu do mitochondrie

# Průběh translokace do mitochondrií

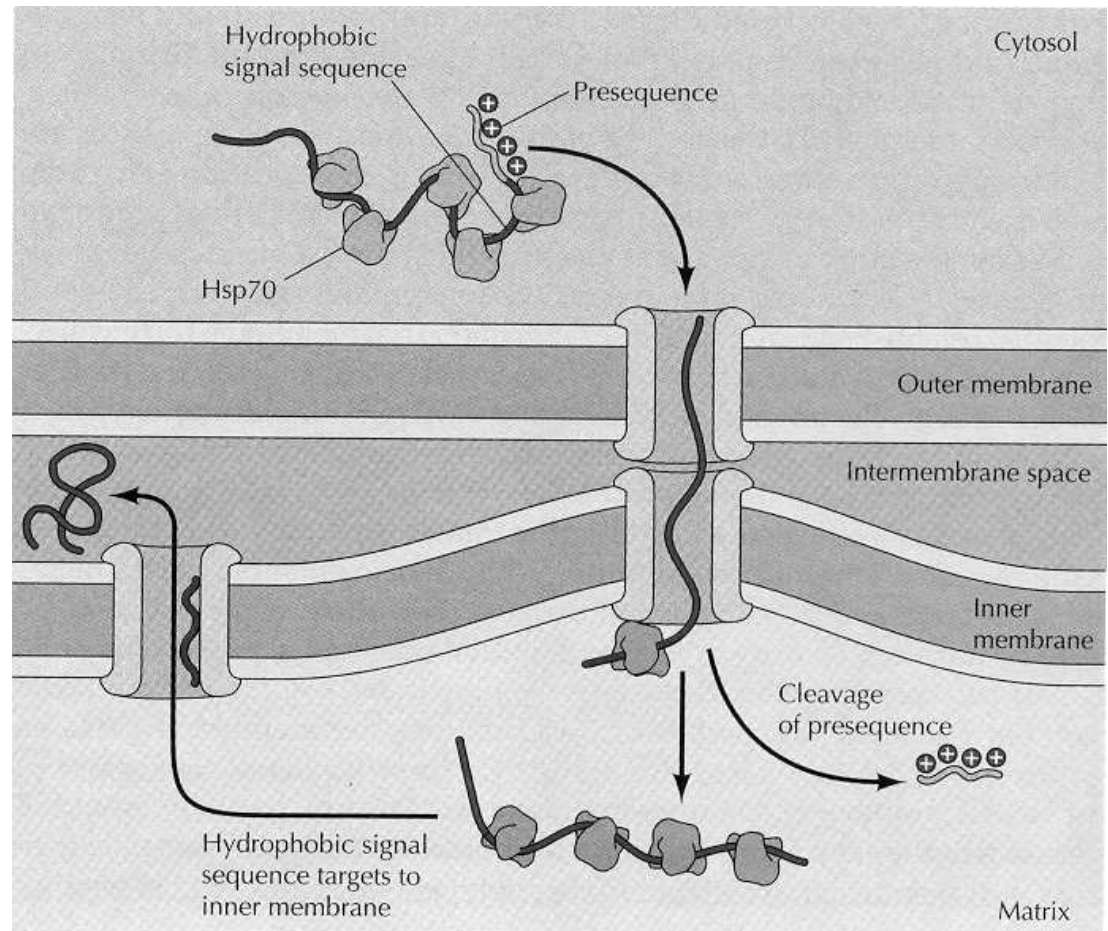
1. rozeznání adresových sekvencí (presekvencí) **receptory**, které proteiny nasměřují k povrchu mitochondrií
2. začlenění presekvencí do **proteinového komplexu**, který řídí translokaci vnější membránou
3. alespoň částečné **rozbalení** proteinů (účast **cytosolických chaperonů** rodiny Hsp70)
4. rozbalené řetězce procházejí vnější i vnitřní membránou v místech jejich těsného kontaktu
5. **translokace** vnitřní membránou vyžaduje přítomnost elektrochemického gradientu
6. **odštěpení adresové sekvence** (presekvence) matrixovou proteázou
7. **mitochondriální Hsp70** váže translokující řetězec na vnitřní straně membrány a napomáhá dokončení translokace
8. **mitochondriální Hsp60** napomáhá složení polypeptidového řetězce uvnitř mitochondrie
9. Průchod vnější i vnitřní membránou vyžaduje **ATP**





# Translokace do mezimembránového prostoru (konzervativní model)

- proteiny obsahují pozitivně nabitou adresovou sekvenci následovanou hydrofobní signální sekvencí
- adresová sekvence směřuje protein do matrix
- odstranění adresové sekvence v matrix obnaží hydrofobní signální sekvenci
- protein směřuje zpět přes vnitřní membránu
- hydrofobní signální sekvence je průběhu translokace odstraněna

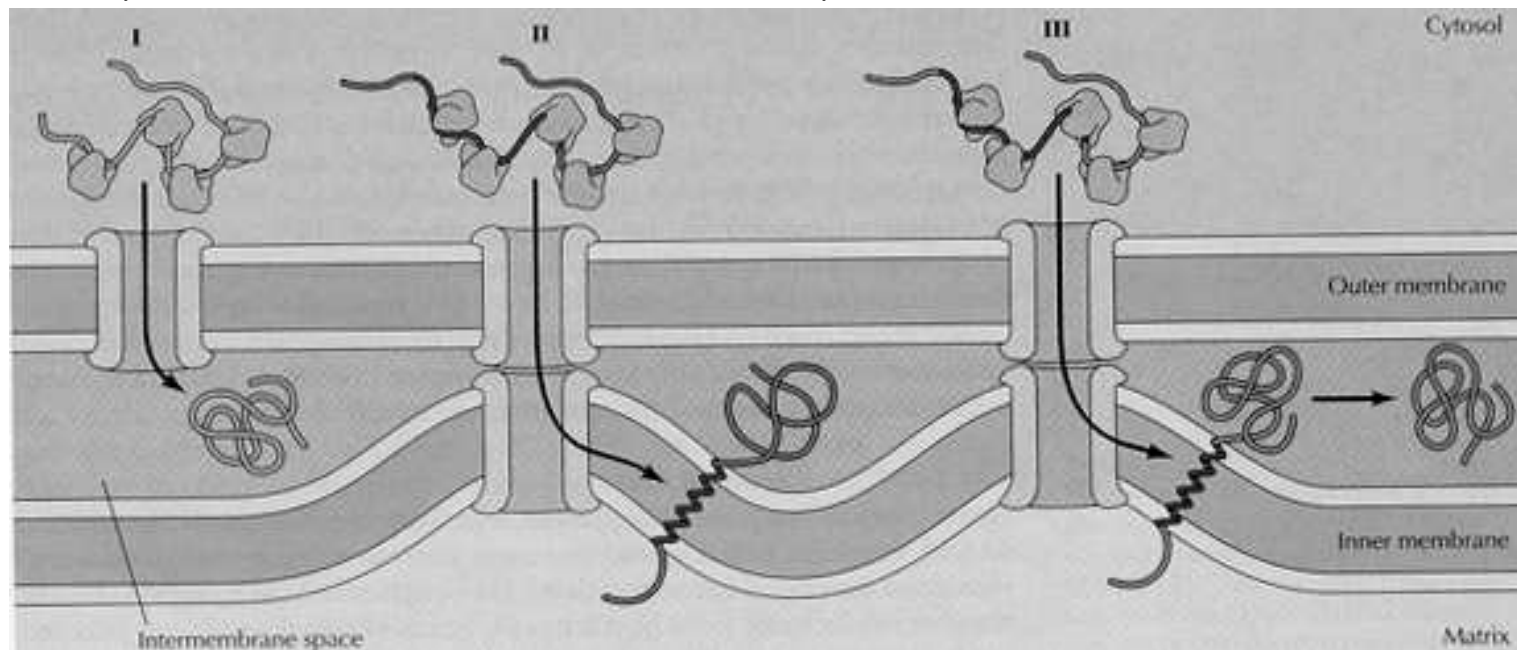


# Translokace do mezimembránového prostoru (nekonzervativní modely)

Nedochází k importu do matrix

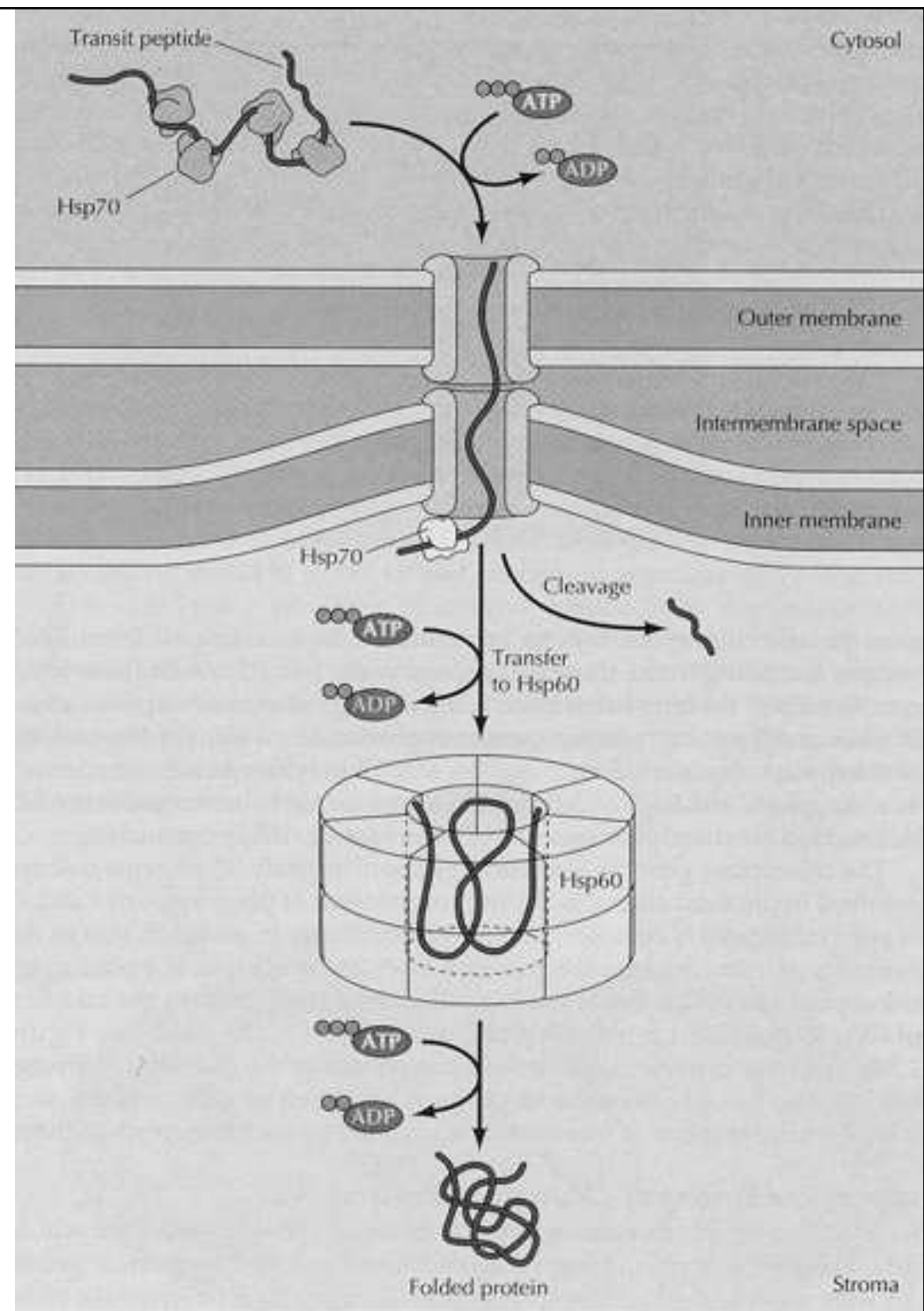
3 možné mechanismy:

1. Přímá translokace vnější membránou do mezimembránového prostoru (cytochrom c)
2. Přímá translokace vnější membránou následovaná začleněním proteinu do vnitřní membrány
3. Prostřednictvím sekvence zastavující přenos („stop-transfer sequence“) je translokace vnitřní membránou zastavena a protein je odštěpen do mezimembránového prostoru



# Transport do chloroplastů

- většina chloroplastových proteinů je syntetizována v cytoplazmě a následně transportována do chloroplastů v podobě hotových polypeptidů
- adresovou sekvenci tvoří 30-100 AA na N-konci, které jsou odštěpeny po dokončení translokace
- požadavek rozvinutí peptidů (účast chaperonů na obou stranách membrány a energie)
- adresové sekvence nejsou pozitivně nabitě
- není požadován elektrický potenciál napříč membránou



# Import proteinů do lumenu thylakoidů

1. import do stromatu

2. odštěpení adresové sekvence: obnažení hydrofobní signální sekvence

3. translokace přes thylakoidní membránu

