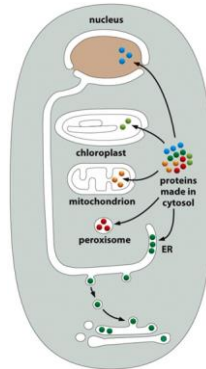
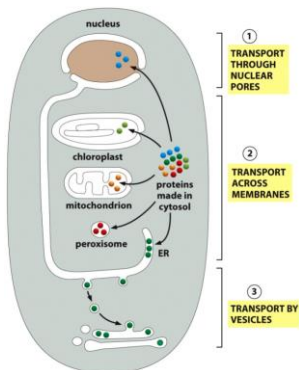


# Cielená distribúcia proteínov, úpravy a ich degradácia

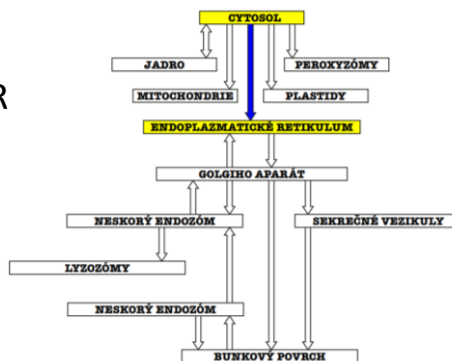


RNDr. Michaela Zigová, PhD.

- Proteosyntéza:
  - a) Voľné ribozómy
  - b) Ribozómy viazané na ER
- Distribúcia na cieľové miesta



## Syntéza a triedenie proteínov v bunke



# Sekrécia proteínov

## Sekrécia:

- a) **Konštitučná sekrécia** – prebieha nepretržite, v ER a GA
  - sekrečné bielkoviny sa nezahusťujú a vezikuly sú transportované do určitej oblasti plazmalémy
- b) **Regulovaná sekrécia** – bielkoviny sa uskladňujú, zahusťujú, uvoľnené sú až na nejaký podnet (napr. hormonálny)

## Signalizácia pre transport bielkovín:

1. **Signalizačná sekvencia** – krátke úseky AMK, určujú transport proteínov do jednotlivých bunkových štruktúr
2. **Signalizačná konformácia** -sekvencie AMK v proteíne, navzájom interagujú, tvoria trojrozmerný štruktúrny motív → oblasť interakcií sa nazýva **signálna škvrna**
3. **Topologická signalizácia** = oligosacharidové reťazce sa viažu na bielkoviny a slúžia ako **molekulová adresa** (signál) pre transport z ER alebo GA na miesto svojej funkcie
  - **Translokázy** - katalyzujú prechod proteínov cez membrány za spotreby energie
  - **Špecifická peptidáza** odštiepi vedúcu sekvenciu akonáhle je proteín správne translokovaný

## Transport u eukaryontov

- Rozloženie náboja, polarity a sekundárna štruktúra signálnej sekvencie, skôr ako samotná sekvencia AMK, riadi translokáciu do príslušnej organely alebo membrány
- Syntéza sekrečných a membránových proteínov prebieha za súčasnej translokácie cez membránu ER

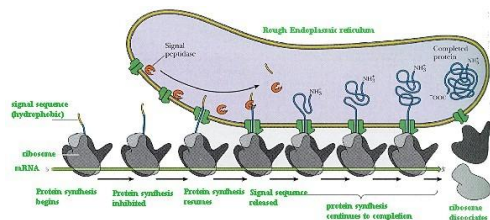
## Chaperóny

- Proteíny, ktoré zodpovedajú za správne priestorové usporiadanie novovzniknutých bielkovín (zbalenie resp. rozbalenie); zabraňujú predčasnemu zbaleniu; zabraňujú intermolekulárnym interakciám ešte nezbalených proteínov
- Výskyt: eukaryotické bb, baktérie, mitochondrie
- Preproteiny sa vážia na chaperony aby nedošlo k jejich skládání před translokací

## Kotranslačná translokácia

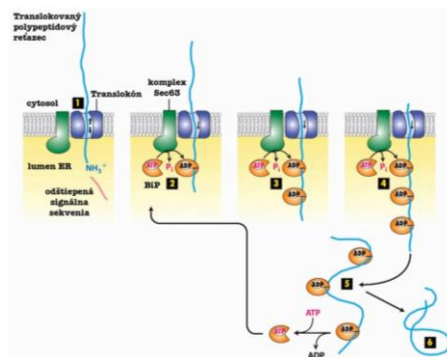
- Potrebné:

1. **ATP a inzerčná signálna sekvencia**- špecifická sekvencia 16-30 hydrofóbných AMK na **N-termine** vznikajúceho polypeptidu
2. Väzba **SRP proteínu** na sig. sekvenciu a transport translačného komplexu k membráne ER
3. rozpoznanie **SRP-receptorom** – polypeptid je prenášaný do ER cez kanál (**translokón - komplex proteínov v membráne, ktorý umožňuje prenos proteínov do membrány alebo cez ňu**).
4. odštiepenie signálnych sekvencií z polypeptidu **signalázami**
5. uvoľnenie proteínu **do lúmenu ER** a rozpad a uvoľnenie proteosyntetického aparátu do cytoplazmy
6. uzavretie translokónu, konformácia peptidu po prechode membránou, niektoré proteíny zostanú súčasťou membrány a konformujú sa v nej (**stop transferázová sekvencia**- proteín je integrálnou súčasťou)



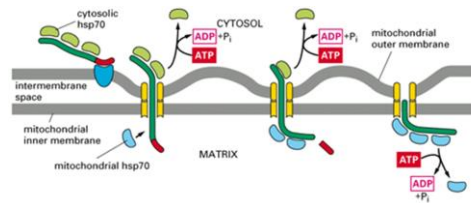
## Postranslačná translokácia

- Sekrečný proteín je syntetizovaný v cytoplazme a až po ukončení translácie je nasmerovaný k **membráne ER**
- **Signálnou sekvenciou** interaguje proteín s **translokónom**
- S využitím energie sa na vstupujúcu bielkovinu viažu molekuly **chaperónu BiP**:
  - a) zabraňuje spätnému posunutiu bielkoviny do cytoplazmy
  - b) stabilizuje štruktúru proteínu v ER



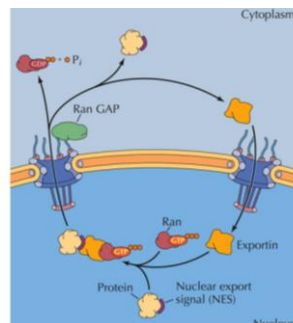
## Transport bielkoviny do mitochondrií

- Proteíny obsahujú **signálne úseky** so striedajúcimi sa zvyškami **bázických a hydrofóbných AMK**.
- Na bielkoviny sa viažu **v cytoplazme chaperóny Hsc 70** (nezvinutý stav bielkoviny), ktoré za **hydrolýzy ATP** vtahujú molekulu do matrixu mitochondrie
- Pri transporte z cytoplazmy do mt matrix sa proteín sg sekvenciou naviaže na **receptor vo vonkajšej membráne**, vonkajšia membrána sa **priloží k vnútornej** a proteín **prestúpi cez obe** naraz.
- Po odštiepení signálnej sekvencie **matrixovou proteázou** a uvoľnení Hsc70 vznikne zrelý proteín
- Zakotvenie v membráne mitochondrie je tiež možné - **stop-transferázová sekvencia**
- Transport proteínov do **chloroplastov** je podobný ako u mitochondrií



## Distribúcia jadrových proteínov

- **selektívne importované do jadra**
- označené **jadrovými lokalizačnými signálmi** 6-8 AMK (bohaté na lyzín, arginín, prolín) na **C-konci**, na ktoré sa v cytoplazme viaže 1/ viac **cytosolových proteínov (importíny)**
- pomáhajú nasmerovať jadrový proteín k **pórovému komplexu v jadrovej membráne**.
- transport vyžaduje **hydrolýzu a ATP**
- proteín sa uvoľní a importín sa vracia do cytoplazmy

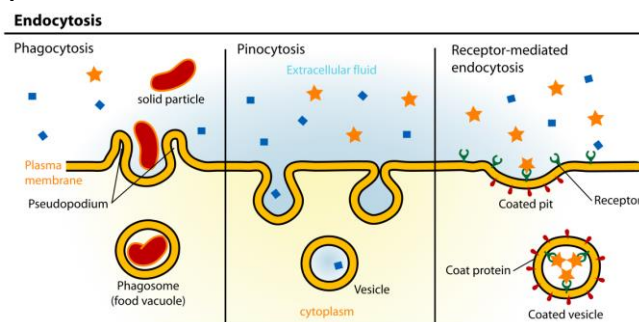


## Transport bielkovín do peroxizómov

- majú špecifickú signálnu sekvenciu (**Ser-Lys-Leu**) na **C-konci**, po importe **nie je vyštiepená**
- po naviazaní na receptory sú bielkoviny translokované cez membránu peroxizómu
- cez membránu peroxizómu sa môžu translokovať aj zvinuté molekuly bielkovín

## Transport proteínov do bunky

- Princíp usmerňovania sa uplatňuje aj pri procese príjmu proteínov z mimobunkového priestoru **endocytózou** sprostredkovanou receptormi v membráne

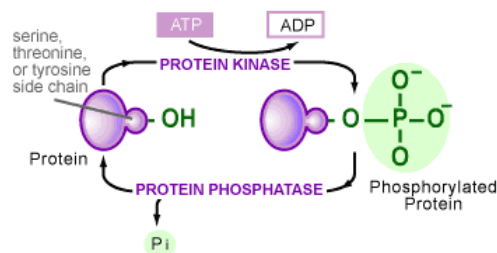


# Úpravy proteínov

- V prokar. aj eukar bunkách
- 1. **kotranslačné úpravy (ešte počas priebehu proteosyntézy)**- deformylácia metionínu, odštiepenie metionínu alebo viac AMK z N-konca, chemická modifikácia bočných reťazcov (hydroxylácia a fosforylácia, tvorba disulfidových väzieb)
- 2. **posttranslačné úpravy** (reverzibilné a ireverzibilné modifikácie)
  - **R:** fosforylácia, acetylácia, adenylácia, uridylácia, ADP ribozylácia, metylácia a oxidácia –SH skupín
  - najrozšírenejšia: fosforylácia (proteínkinázy)
  - **I:** pripojenie určitých podjednotiek alebo molekúl iných látok (biotín)ku vznikajúcemu bielkovinovému reťazcu
  - Môže dôjsť aj k odštiepeniu väčších úsekov peptidového reťazca
  - Medzi posttranslačné mechanizmy patrí aj **tvorba kvartérnej štruktúry** a zostavovanie proteínov do **nadmolekulových komplexov**

## Fosforylácia proteínov

- najrozšírenejšia reverzibilná modifikácia proteínov
- Zabezpečujú **proteínkinázy** aktivované extracelulárnymi alebo intracelulárnymi signálmi napr. hormónmi, rastovými faktormi.....
- Dochádza k **zmene konformácie** molekuly a tým aj k aktivácii enzýmov
- Defosforyláciu katalyzujú **proteínfosfatázy**

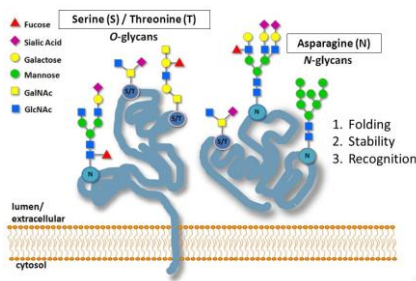


# Glykozylácia

- Pripojenie **oligosacharidového reťazca**:
- a) na serín/treonín = **O-glykoproteíny**
- b) na asparagín = **N-glykoproteíny**

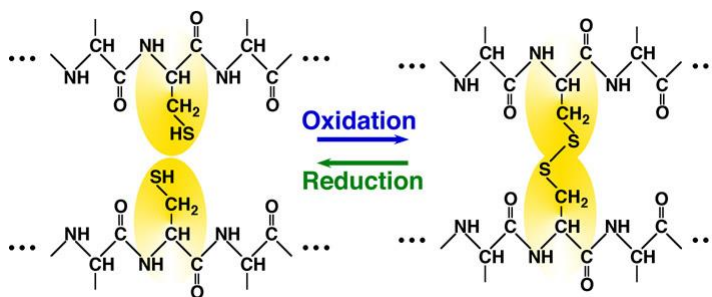
## Naviazanie sacharidov:

- smerovací signál pri transporte bielkovín na miesta funkcie
- stabilizujú konformáciu bielkovín (správne zvinutie)
- zvyšujú rozpustnosť
- chránia proteíny pred účinkom proteáz
- fungujú ako antigény



## Tvorba disulfidových väzieb (mostíkov)

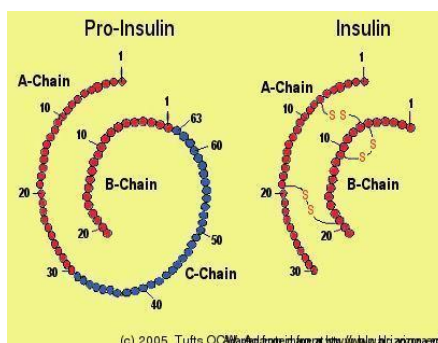
- tvorbu katalyzuje **disulfidová izomeráza**, ktorá je prítomná v lúmene ER
- Väzba S-S cysteínu vzniká na rôznych miestach reťazca
- V prítomnosti redukčných činidiel dochádza k rozpadu S-S mostíkov





## Zostrih proteínov (proteolytické štiepenie)

- K štiepeniu peptidového reťazca dochádza vplyvom **proteáz** (trypsín)
- Baktérie a nižšie eukaryonty podliehajú **autokatalytickému štiepeniu**
- Napr. **inzulín** vzniká z neaktívneho proinzulínu
- odštiepením peptidu C
- spojením reťazcov A a B
- disulfidovými väzbami



## Skladanie proteínov (folding)

- priestorové skladanie- hneď po transporte nascentného proteínu- E výhodné
- a) **Samoskladanie (selfassembling)**
- b) Zbalenie pomocou **chaperónov a chaperóninov**, ktoré sú nachádzajú v lúmene ER, v mitochondriách a v cytoplazme
- 2 hlavné typy chaperónov:

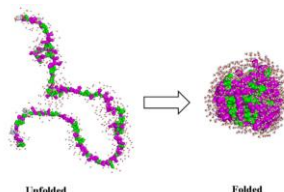
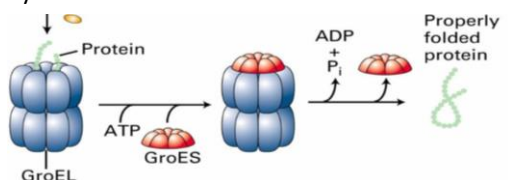
1. **Hsp70 (BiP)**- Naviazanie BiP na úsek peptidu a naviazanie lektínov (kalnexín a kalretikulín) na oligosacharidové reťazce podporuje zvinutie
2. **Hsp60** – katalyzuje aktívne skladanie proteínu

**Chaperonín:** napr. **GroES-GroEL komplex:**

GroEL – je tvorený z dvoch valcovitých podjednotiek

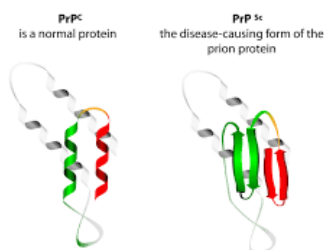
GroES – tvorí viečko komplexu

- Nascentný proteín sa viaže na vnútornú stenu valca za hydrolýzy ATP
- Dochádza k zmenám štruktúry proteínu a až po zbalení sa uvoľní z GroES-GroEL systému



## Nesprávne zvinuté bielkoviny

- zle zbalené proteíny môžu byť dôsledkom mutácii v génoch
- akumulácia veľkého množstva zle zbalených proteínov vedie k tvorbe zhlukov (**amyloid**), k poškodeniu a zániku bunky (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, priónové ochorenia- CJD, BSE )
- akumulujú sa v ER viazané na chaperóny BiP a kalnexín
- pri akumulácii nesprávne zbalených proteínov = **zvýšená expresia génov kódujúcich chaperóny**
- kľúčovú úlohu má proteín **Ire1** viazaný na šaperón BiP



## Degradácia proteínov

- Biologický poločas cytosolových proteínov je rôzny
- Rozhoduje o tom ich N-koncová aminokyselina. (Met, Gly, Ala, Ser, Thr a Val poločas > 20 hod; Pro, Leu, Phe, Asp, Lys a Arg niekoľko min).

### Mechanizmy degradácie:

- **lyzozómový a nelyzozómový ATP dependentný systém**

1. Lyzozómy- u eukaryontov (GA)

### Odbúravanie:

a) **neselektívne**

b) **selektívne** prostredníctvom **Prp73** proteínu (na základe špecifických sekvencií proteínov- prebieha v pečeni, obličkách pri hladovaní)

## 2. Nelyzozómový systém

- **Špecifická degradácia proteínov**- normálnych aj abnormálnych (zachovanie rovnováhy)
- **Reguluje metabolizmus buniek a kontroluje bunkový cyklus**
- **mechanizmus založený na pripojení ubikvitínu**
- Abnormálny, prebytočný proteín s **pripojeným ubikvitínom- citlivejší na aktivitu proteolytických enzýmov**
- Ubikvitín sa pripája pomocou špecifických enzýmov a pri využití **ATP**.
- označené proteíny degradujú veľké **ATP- dependentné proteázové komplexy- proteazómy** (početné v jadre a cytoplazme)- proteazóm **20S, 26S**
- **20S - rozbaľuje polypeptidy**, ktoré majú byť rozložené mimo lyzozóm (účinnok reverzného chaperónu)
- **26S - ATP dependentné zmeny konformácie polypeptidu**, substrát sa štiepi na **malé peptidy**, ktoré sa uvoľnia z proteazómu a nakoniec sú odštiepené molekuly ubikvitínu

Ďakujem za pozornosť