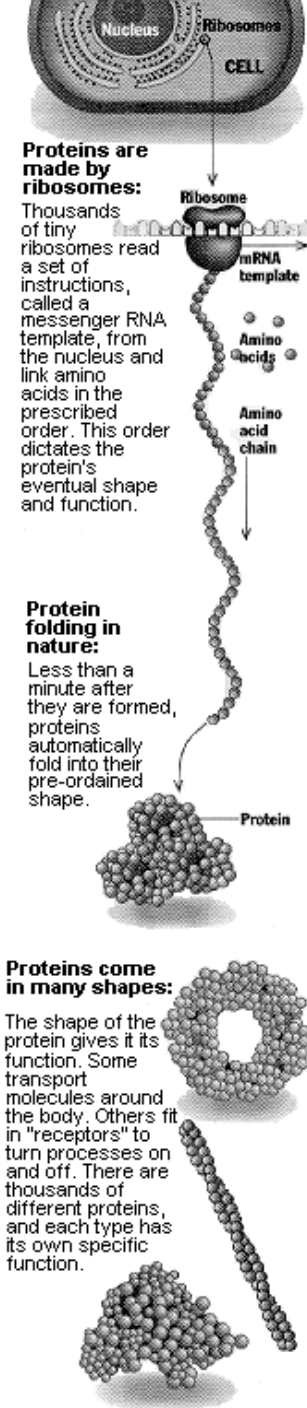


**Kierowanie białek do miejsc
przeznaczenia.
Zdarzenia potranslacyjne cd...**

NAJCZĘSTSZE POTRANSLACYJNE MODYFIKACJE BIAŁEK

- PROTEOLITYCZNE ROZSZCZEPIANIE
- WYCINANIE INTEIN
- MODYFIKACJE CHEMICZNE



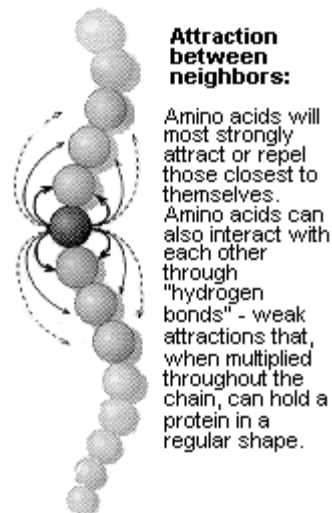
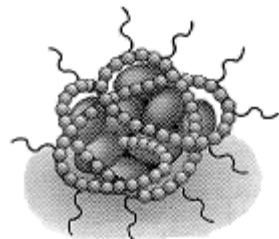
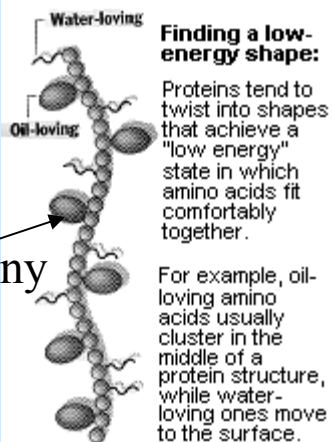
Sekwencja aminokwasów wyznacza strukturę drugorzędową białek

Jeszcze w trakcie syntezy a najpóźniej w minutę po zakończeniu translacji białka ulegają spontanicznemu fałdowaniu

Kształt białka jest ściśle związany z jego funkcją
Białka pełnią rolę wewnątrzkomórkowych transporterów, enzymów, regulatorów, receptorów błonowych.

Są wydzielane na zewnątrz komórki

PROTEIN FOLDING PRINCIPLES



Białka fałdują się spontanicznie aby uzyskać kształt wymagający jak najmniej energii do jego utrzymania.

Aminokwasy lipofilne zajmują pozycje rdzeniowe zaś aminokwasy hydrofilne układają się powierzchniowo

Struktura drugorzędowa białek jest stabilizowana wiązaniami wodorowymi pomiędzy aminokwasami

FAŁDOWANIE BIAŁEK

Rosnące łańcuchy polipeptydowe **NAJCZĘŚCIEJ** nie ulegają natychmiastowemu fałdowaniu ale wiążą się z białkami opiekuńczymi, które przez kilka minut utrzymują polipeptydy w stanie rozprostowanym

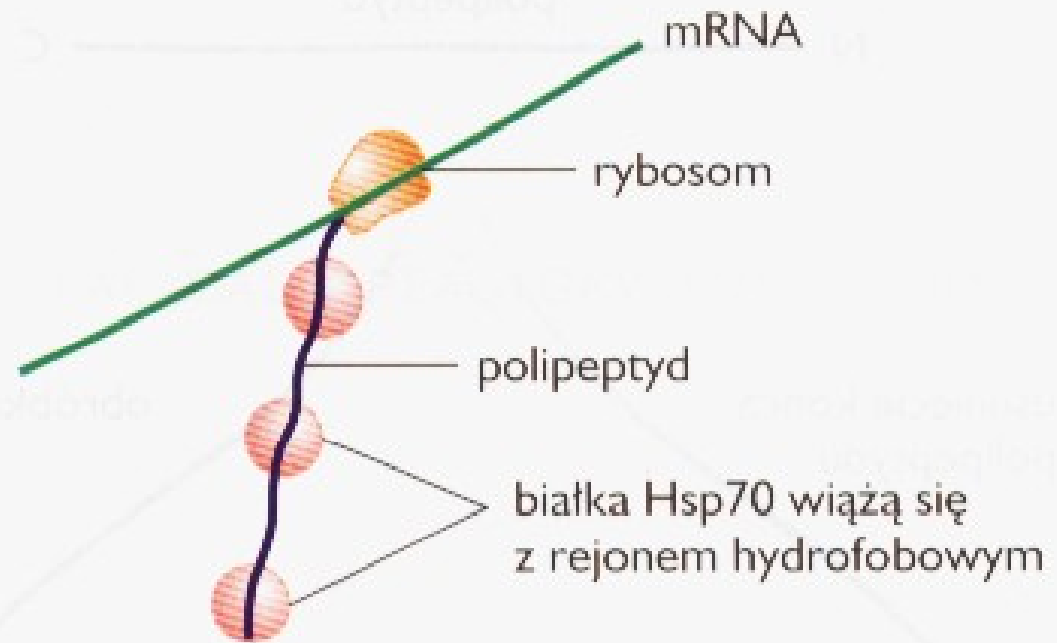
ATP-zależne białka szoku termicznego działają jako białka opiekuńcze (chaperony), które wiążą rosnące białka i kontrolują ich fałdowanie.

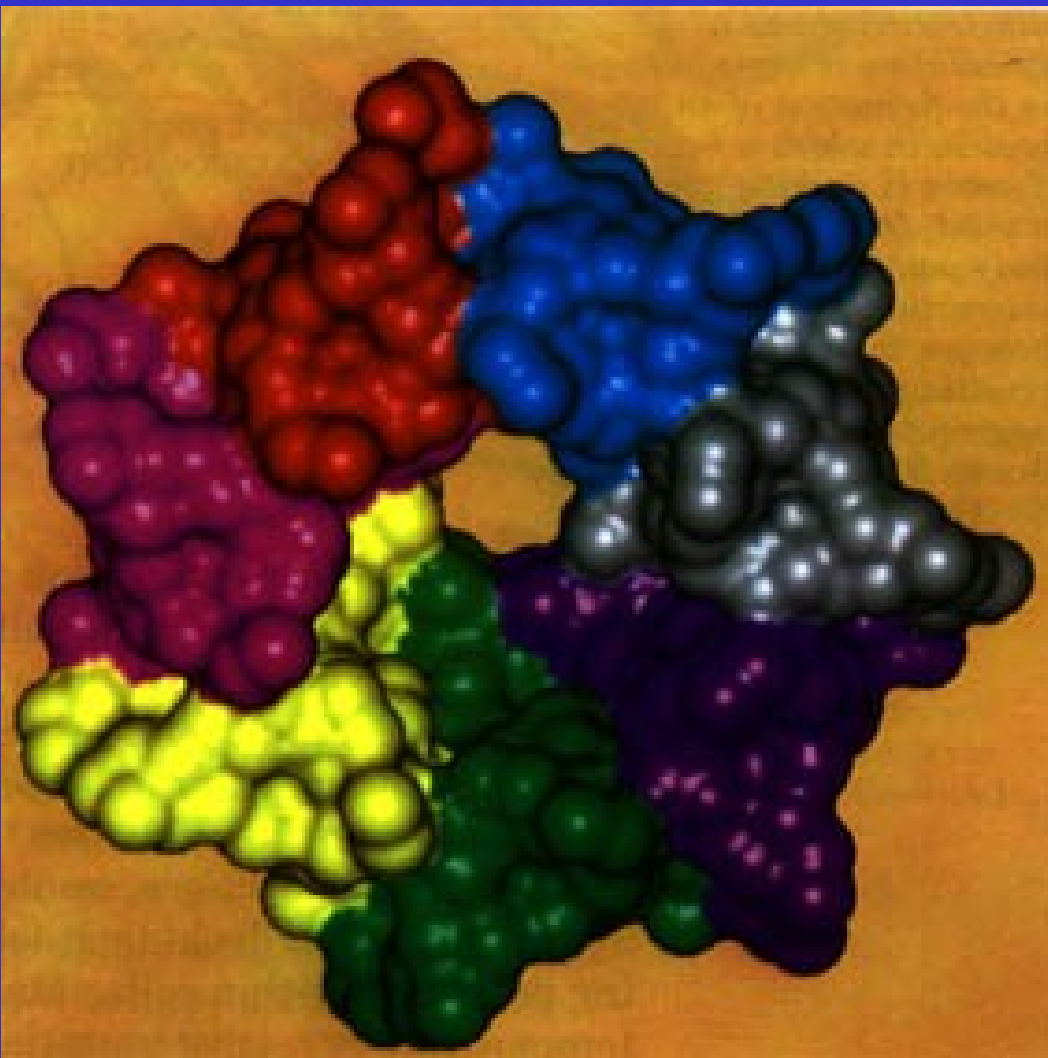
Chaperony są powolnie działającymi ATPazami.

Kompleks ADP-chaperon ma duże powinowactwo do niesfałdowanych polipeptydów a praktycznie żadne do białek natywnych.

Związanie segmentu niesfaldowanego peptydu z chaperonem jest sygnałem odłączenia ADP z katalitycznego miejsca chaperonu i wejścia w to miejsce ATP. Powstanie kompleksu ATP-chaperon powoduje uwolnienie segmentu peptydu.

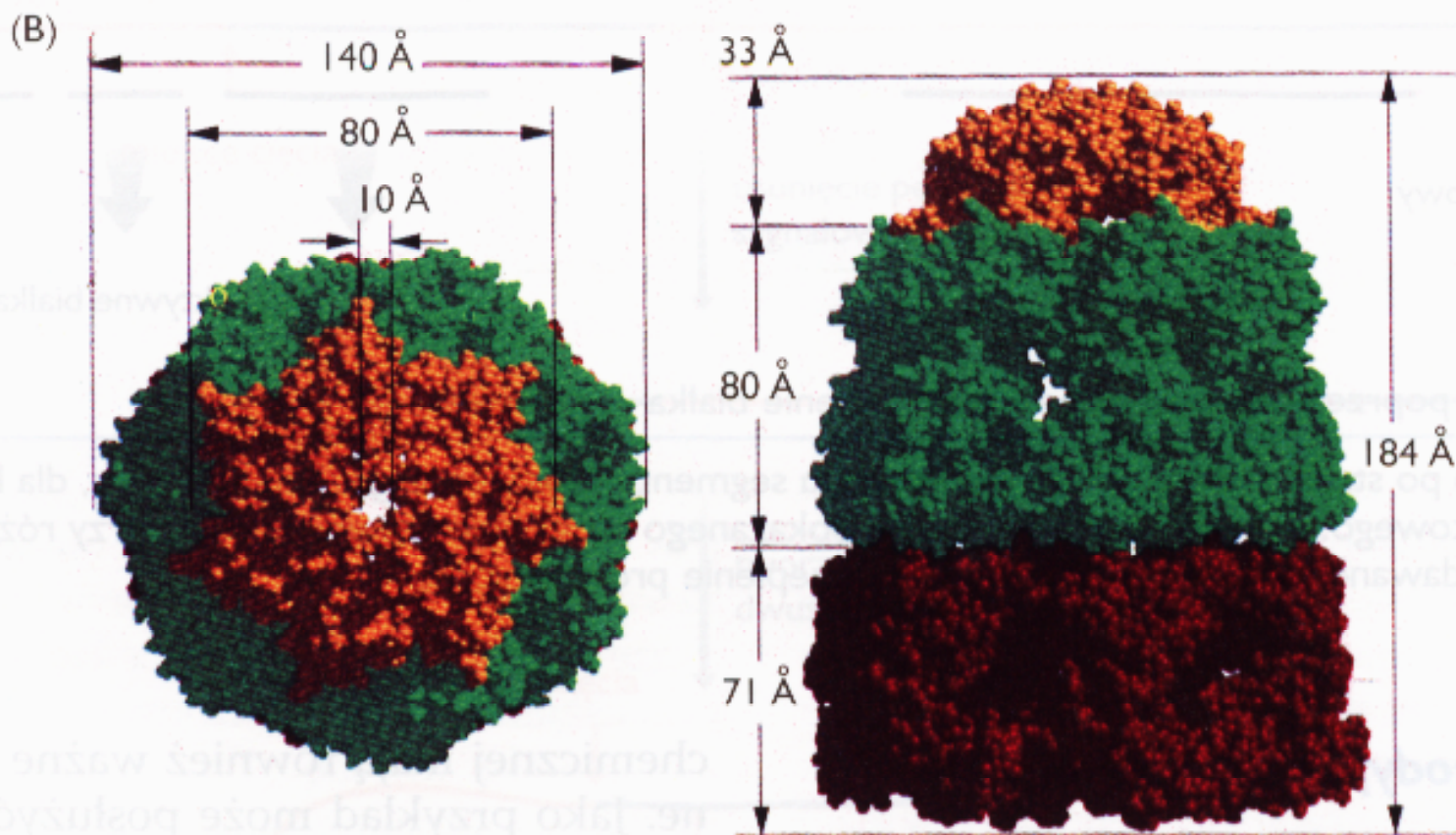
(A)



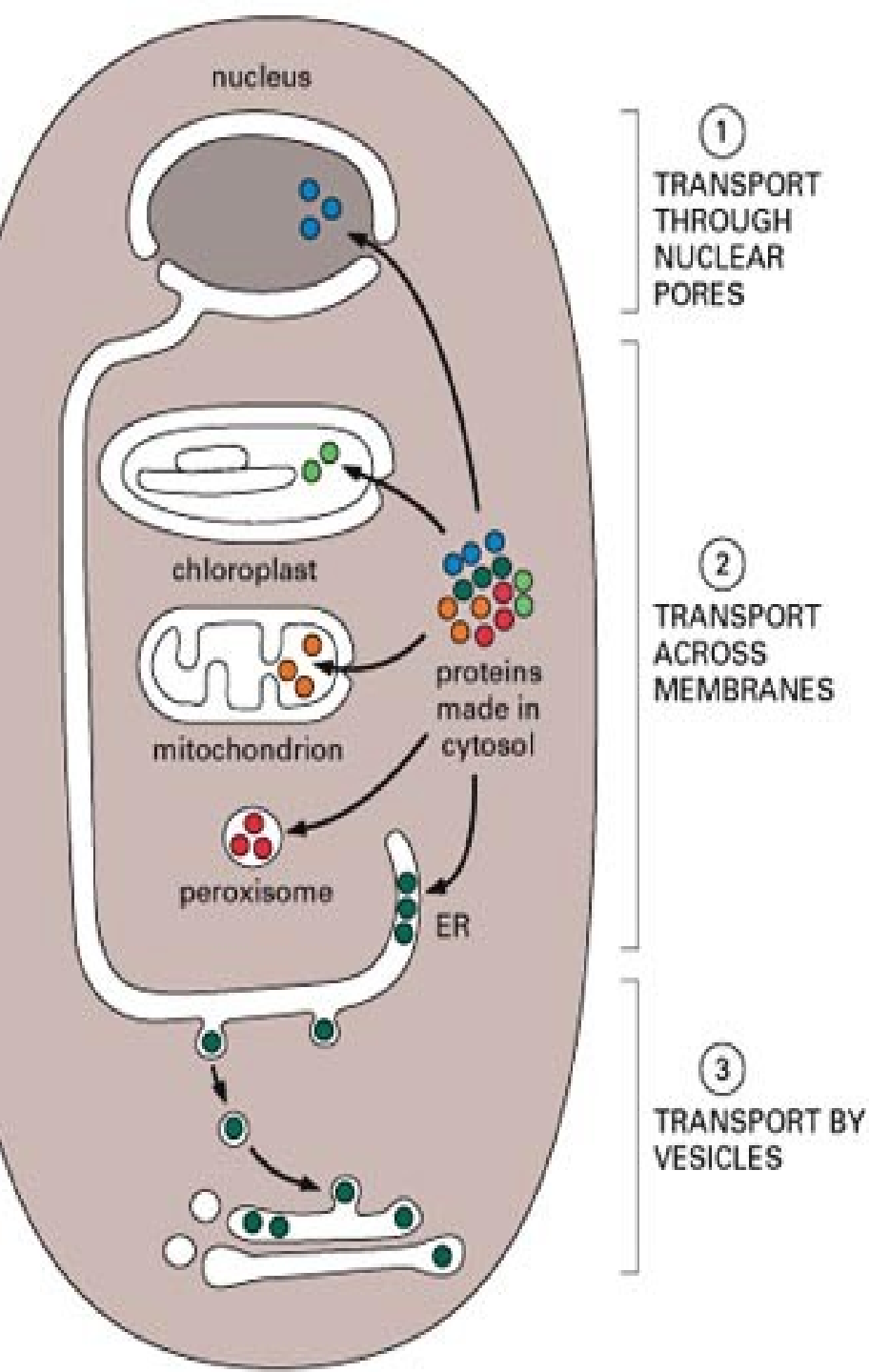


*Białka szoku cieplnego
pełniące funkcje*

*białek opiekuńczych
tworzą warstwowo
ułożone kompleksy złożone
z kilku podjednostek. W
centralnie położonym
otworze umieszczane jest
białko podlegające
fałdowaniu*



Białka opiekuńcze *E. coli*



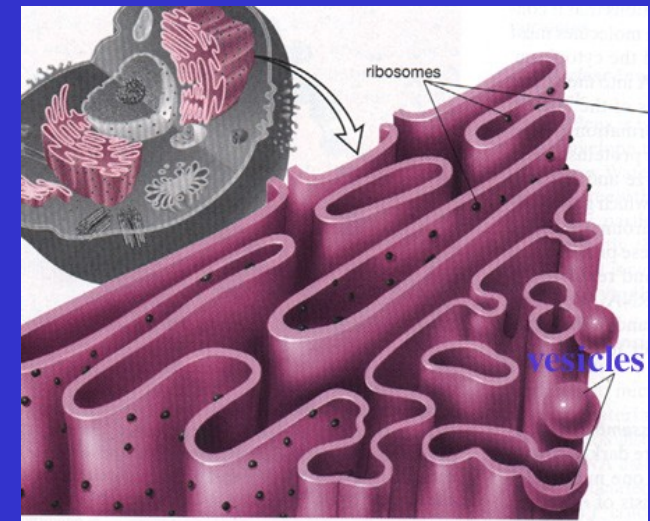
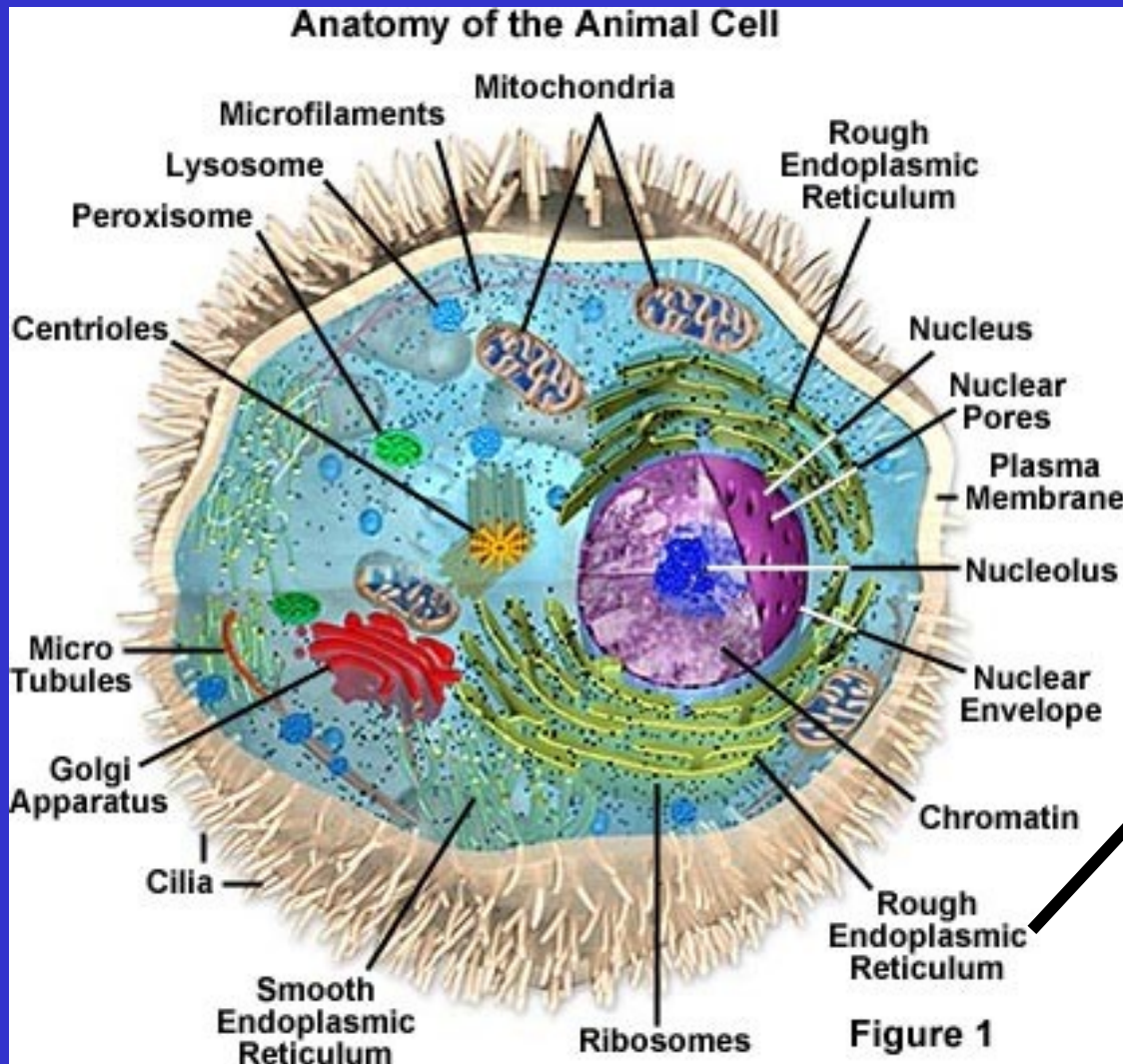
Białka mogą być przemieszczane do różnych organelli komórkowych przy pomocy:

transportu bramkowanego (jądro)

transportu transmembranowego (mitochondria, plastydy, retikulum endoplazmatyczne)

transportu pęcherzykowego (aparat Golgiego, lizosomy, endosomy, powierzchnia komórki)

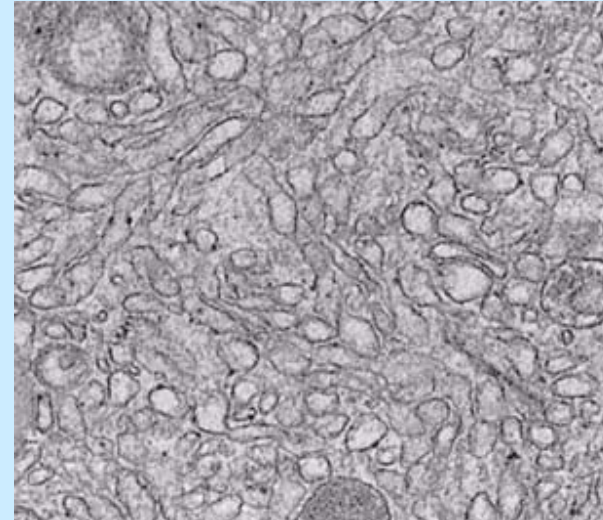
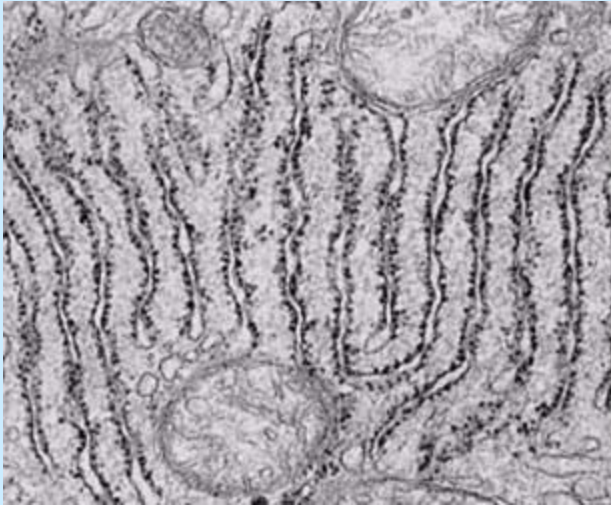
Udział struktur błonowych w modyfikacji białek



Siateczka
śródpłazmatyczna
szorstka

Siateczka śródplazmatyczna

- Najbardziej zróżnicowana morfologicznie, najobszerniejsza spośród wszystkich struktur błoniastych wewnątrz komórki
- 50 % wszystkich błon komórki
- Utworzona ze spłaszczonych zbiorników (cystern) oraz bogato rozgałęzionych rurek (tubul)



Przekrój poprzeczny przez siateczkę śródplazmatyczną:

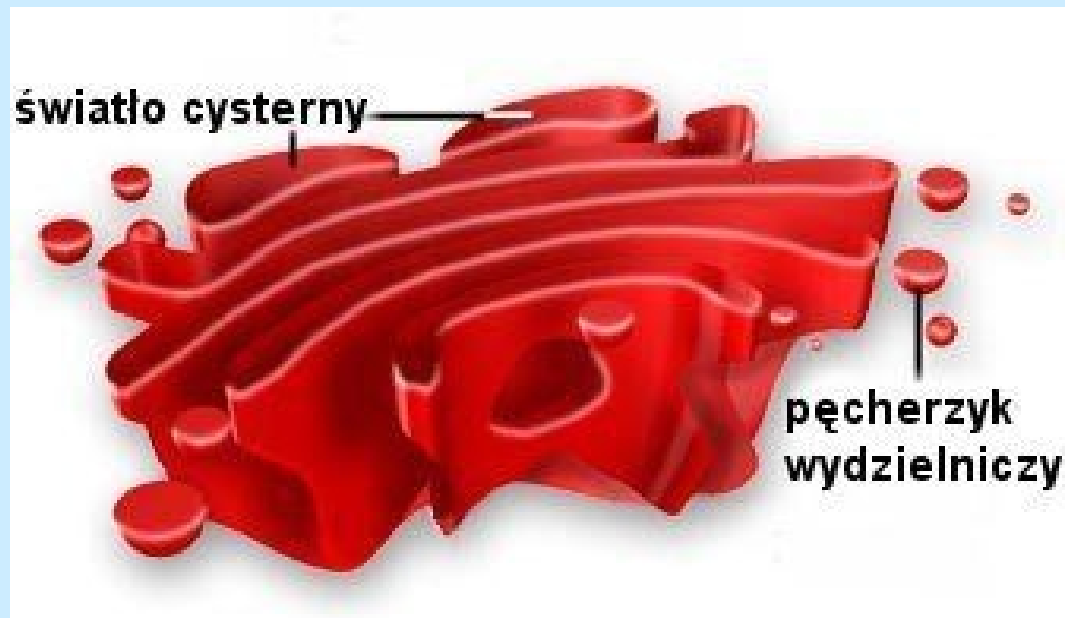
szorstką

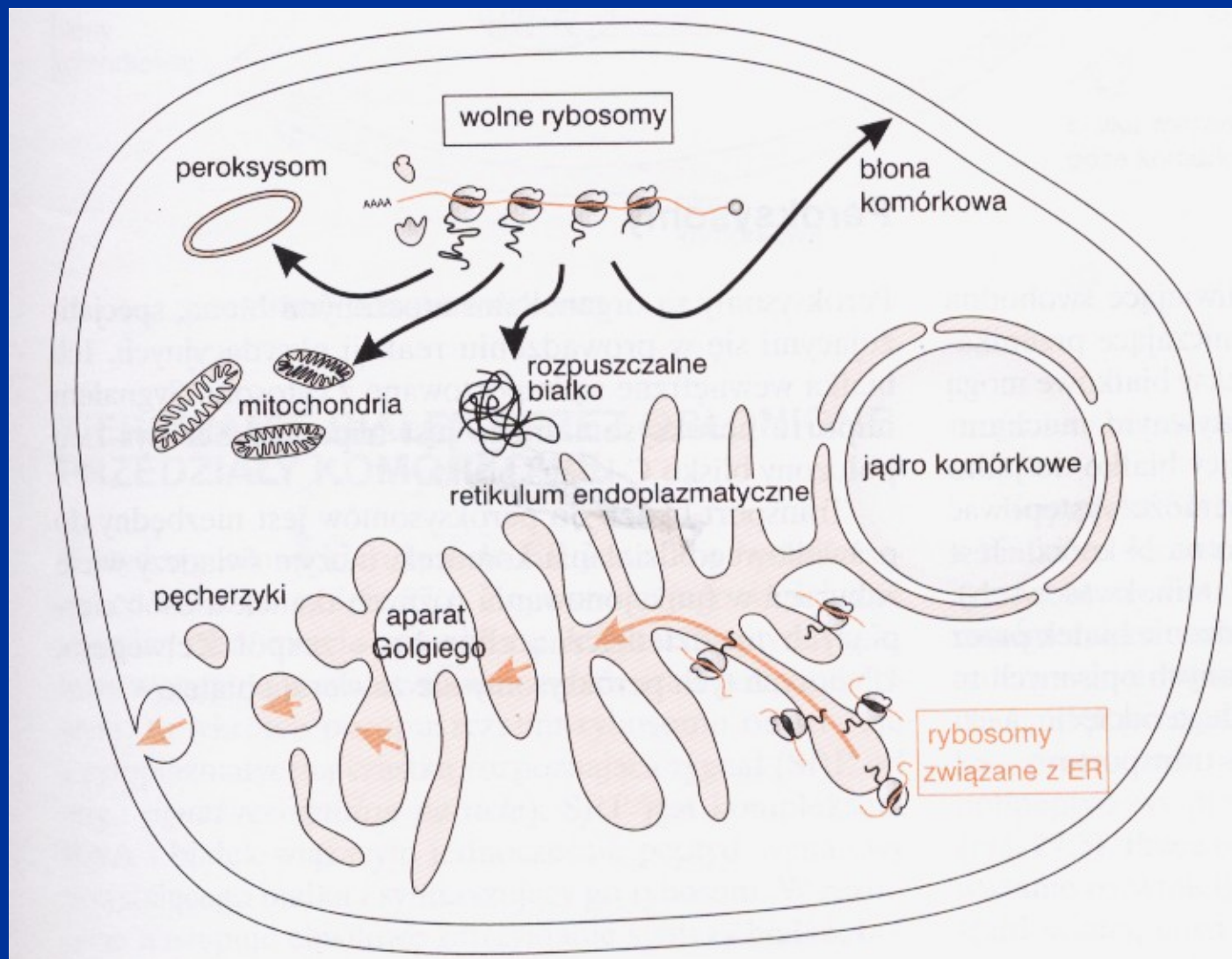
gładką

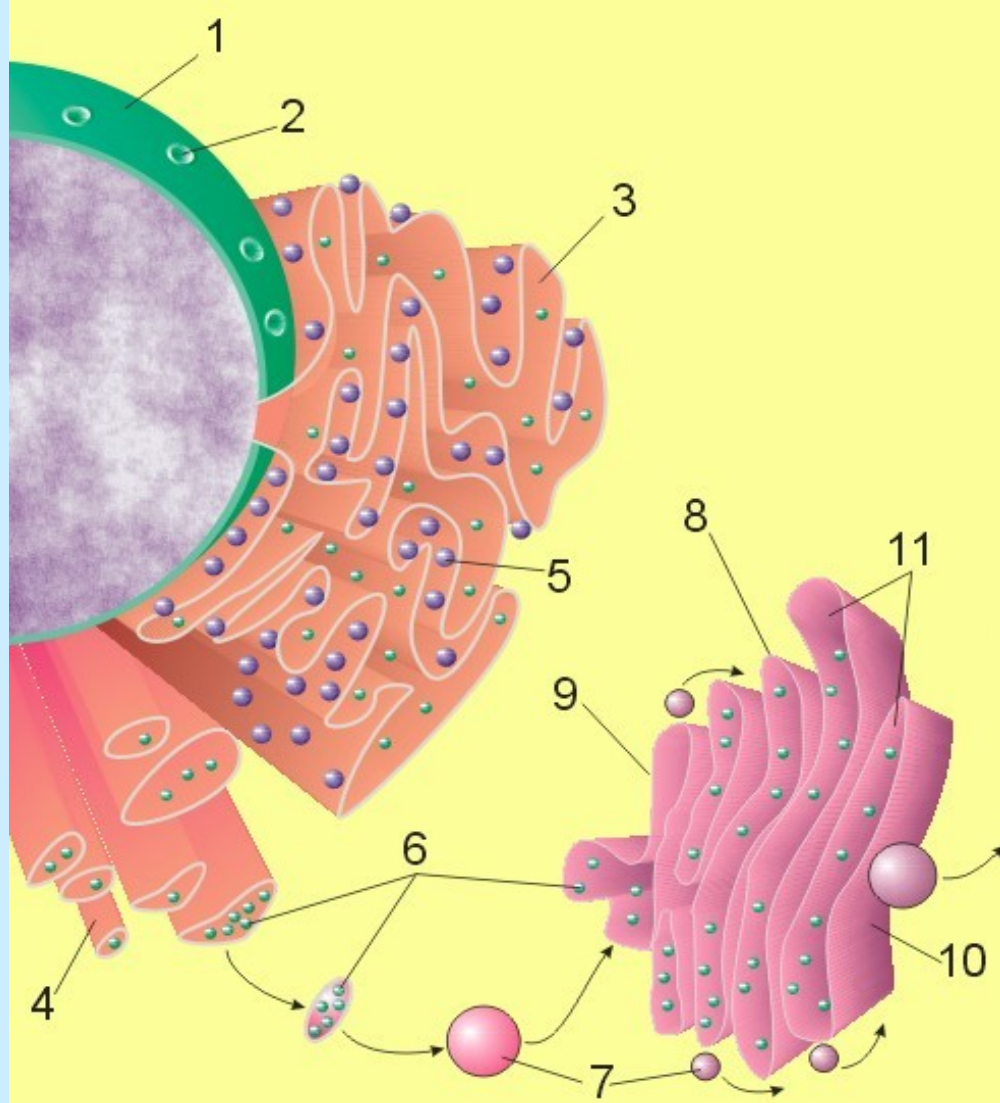
Najczęściej w postaci
cystern, z rybosomami na
swojej powierzchni

Najczęściej w postaci
tubul

Aparat Golgiego



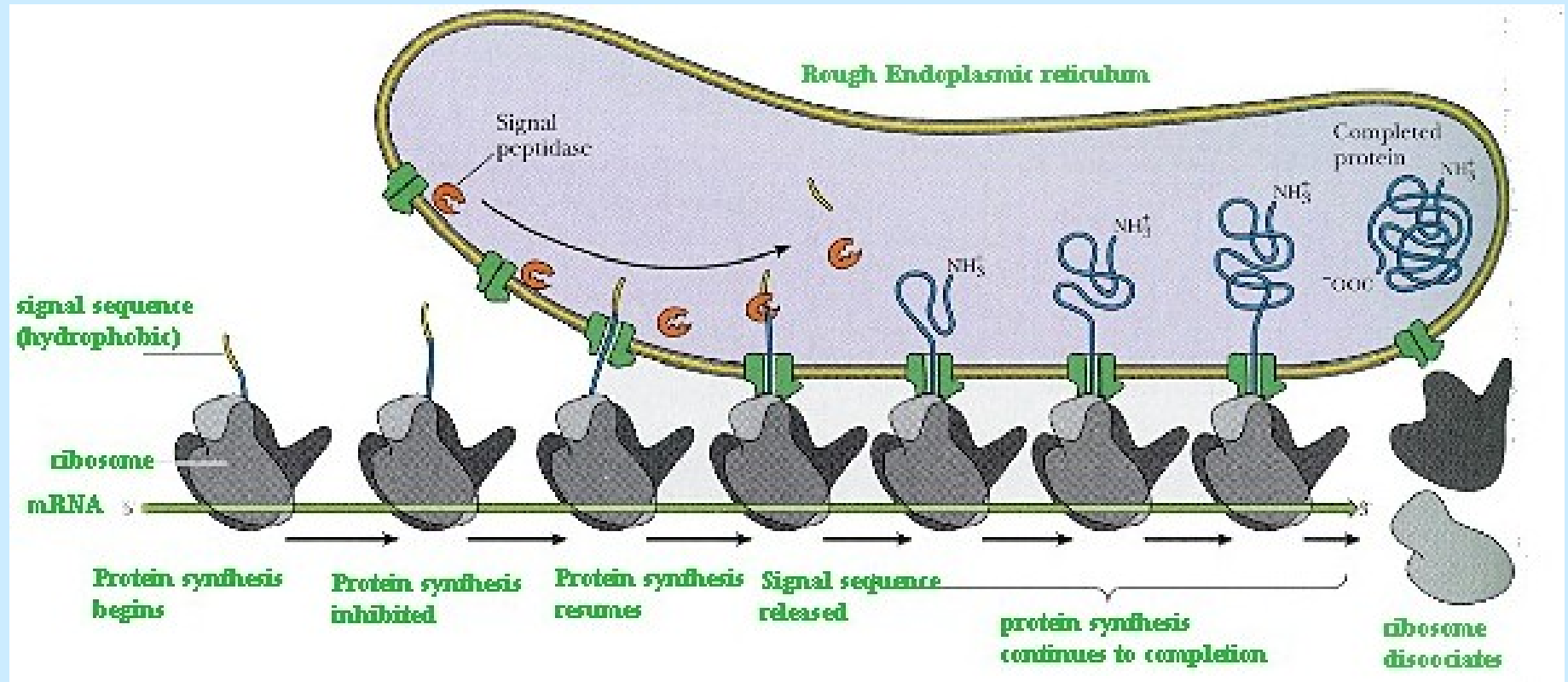




Schemat: Obraz jądra komórkowego, siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego.
 1 jądro komórkowe 2 Por jądrowy 3 Szorstka siateczka śródplazmatyczna (Rough endoplasmic reticulum - rER) 4 Gładka siateczka śródplazmatyczna(sER) 5 Rybosom na rER 6 Białka, które są transportowane 7 Pęcherzyk transportowy 8 Aparat Golgiego 9 Biegun cis aparatu Golgiego 10 Biegun trans aparat Golgiego 11 Cysterna aparatu Golgiego

KIEROWANIE BIAŁEK – jak to się dzieje, że białka trafiają do siateczki śródplazmatycznej, aparatu Golgiego?

- Powstające białka zawierają sygnały determinujące ich ostateczne umiejscowienie.
- W komórkach eukariotycznych decyzja o dalszych losach białka zostaje podjęta wkrótce po rozpoczęciu jego syntezy.
- Białka wydzielane i białka błonowe powstają na rybosomach związanych z siateczką śródplazmatyczną (ER).
- Rybosomy związane z błoną syntetyzują 3 główne klasy białek: białka wydzielane, białka lizosomalne i białka transbłonowe
- O translokacji białka poprzez błonę siateczki śródplazmatycznej decydują **sekwencje sygnałowe**, które w świetle ER są odcinane przez peptydazę sygnałową



KIEROWANIE BIAŁEK...

- O translokacji białka poprzez błonę retikulum endoplazmatycznego decydują **sekwencje sygnałowe**, które w świetle ER są odcinane przez peptydazę sygnałową
- **Cechy sekwencji sygnałowych:**
 - długość 13-36 reszt aminokwasowych
 - środek sekwencji sygnałowej przy końcu N stanowi odcinek silnie hydrofobowy
- w miejscu gdzie następuje odcięcie, reszta od strony końca N ma zazwyczaj mały, obojętny łańcuch boczny
- bakteryjne i eukariotyczne sekwencje sygnałowe są do siebie podobne

Inner membrane proteins

Phage fd, major coat protein

Met Lys Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu Val Pro Met Leu Ser Phe Ala [↓] Ala Glu --

cleavage site

Phage fd, minor coat protein

Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser [↓] Ala Glu --

Periplasmic proteins

Alkaline phosphatase

Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr Pro Val Thr Lys Ala [↓] Arg Thr --

Leucine-specific binding protein

Met Lys Ala Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala Ile Ser His Thr Ala Met Ala [↓] Asp Asp --

β -Lactamase of pBR322

Met Ser Ile Gln His Phe Arg Val Ala Leu Ile Pro Phe Phe Ala Ala Phe Cys Leu Pro Val Phe Ala [↓] His Pro --

Outer membrane proteins

Lipoprotein

Met Lys Ala Thr Lys Leu Val Leu Gly Ala Val Ile Leu Gly Ser Thr Leu Leu Ala Gly [↓] Cys Ser --

LamB

Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala [↓] Val Asp --

OmpA

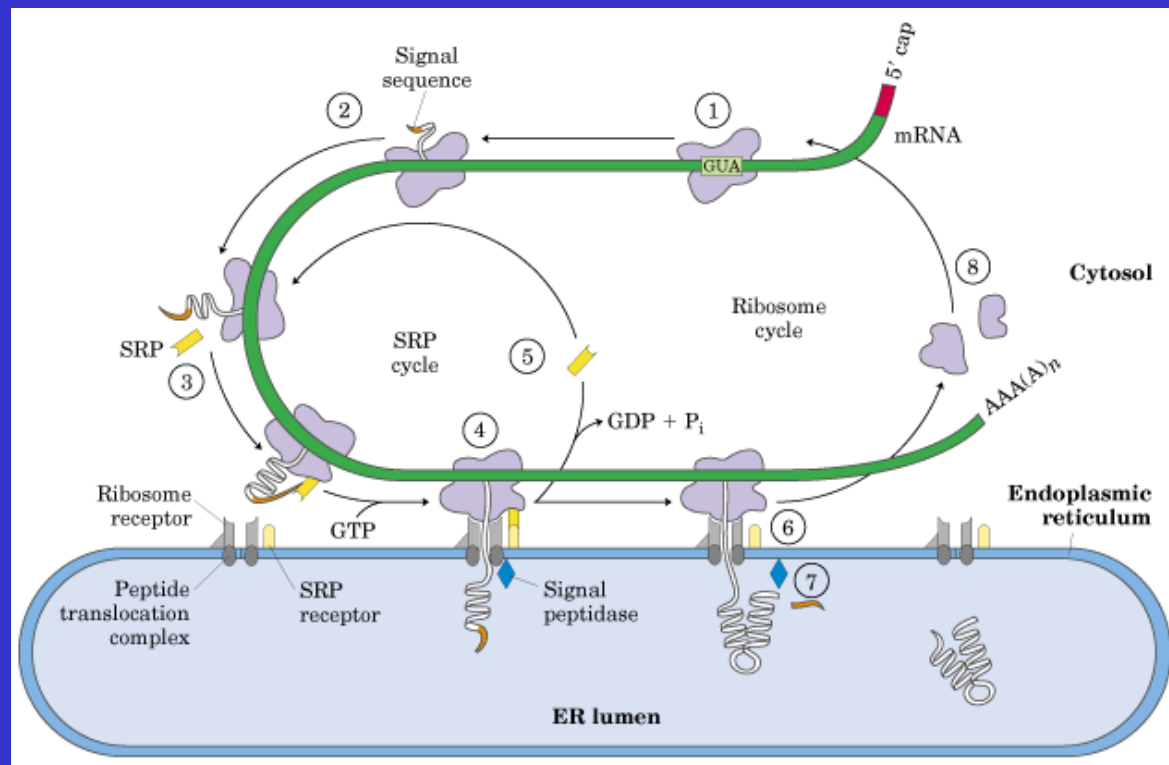
Met Met Ile Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala [↓] Ala Pro --

KIEROWANIE BIAŁEK...

- Białko cytozolowe może być skierowane do ER przez dołączenie do jego końca N sekwencji sygnałowej
- Łącznikiem sprzęgającym mechanizm syntetyzujący białko w cytozolu z mechanizmem odpowiedzialnym za translokację białka przez błonę ER jest rybonukleoproteina zwana “cząstką rozpoznającą sygnał - **SRP** (signal recognition particle)
- SRP wykrywa sekwencje sygnałowe i doprowadza rybosomy do błony ER.
- SRP ma masę 325 kDa i składa się z 300 nukleotydowej cząst. RNA o nazwie 7SL RNA i 6 różnych łańcuchów polipeptydowych.

KIEROWANIE BIAŁEK...

3. SRP wiąże się z rybosomem a następnie z receptorem SRP na ER (białko dokujące).
5. SRP działa katalitycznie, doprowadzające rybosomy zawierające sekwencje sygnałową do błony ER oraz zapobiega przedwczesnej elongacji i fałdowaniu się powstającego łańcucha, które to procesy przeszkadzałyby translokacji.



- ### 3. Cykl GTP-GDP uwalnia sekwencję sygnałową z SRP i następnie odłącza SRP od jego receptora

- 4. Forma GTP receptora silnie wiąże SRP, który rozluźnia swój związek z peptydem sygnałowym. Uwolniony peptyd sygnałowy natychmiast wiąże się z mechanizmem translokacji**

- 5. Rybosomy niosące sekwencje sygnałowe są wektorialnie kierowane do błony ER dzięki jednokierunkowości cyklu GTP-GDP**

KIEROWANIE BIAŁEK...

- **Mechanizm translokacyjny (translokon) jest oligomeryczną strukturą złożoną z błonowych białek integralnych i peryferycznych**
- **Bramkowanie kanałów przewodzących białka przez peptydy sygnałowe sprawia , że kanały otwierają się tylko wtedy, gdy rosnące białka są gotowe do translokacji**
- **Translokacja jest kierowana przez sekwencje sygnałowe i sekwencje zatrzymania translokacji (stop-transfer).**
- **Optymalnymi substratami dla translokacji poprzez błonę ER są rozfałdowane łańcuchy polipeptydowe**

FAŁDOWANIE BIAŁEK

Rosnące łańcuchy polipeptydowe po przejściu do światła retikulum nie ulegają natychmiastowemu fałdowaniu ale wiążą się z białkami opiekuńczymi, które przez kilka minut utrzymują polipeptydy w stanie rozprostowanym

ATP-zależne białka szoku termicznego działają jako białka opiekuńcze (chaperony), które wiążą rosnące białka i kontrolują ich fałdowanie.

KIEROWANIE BIAŁEK ..

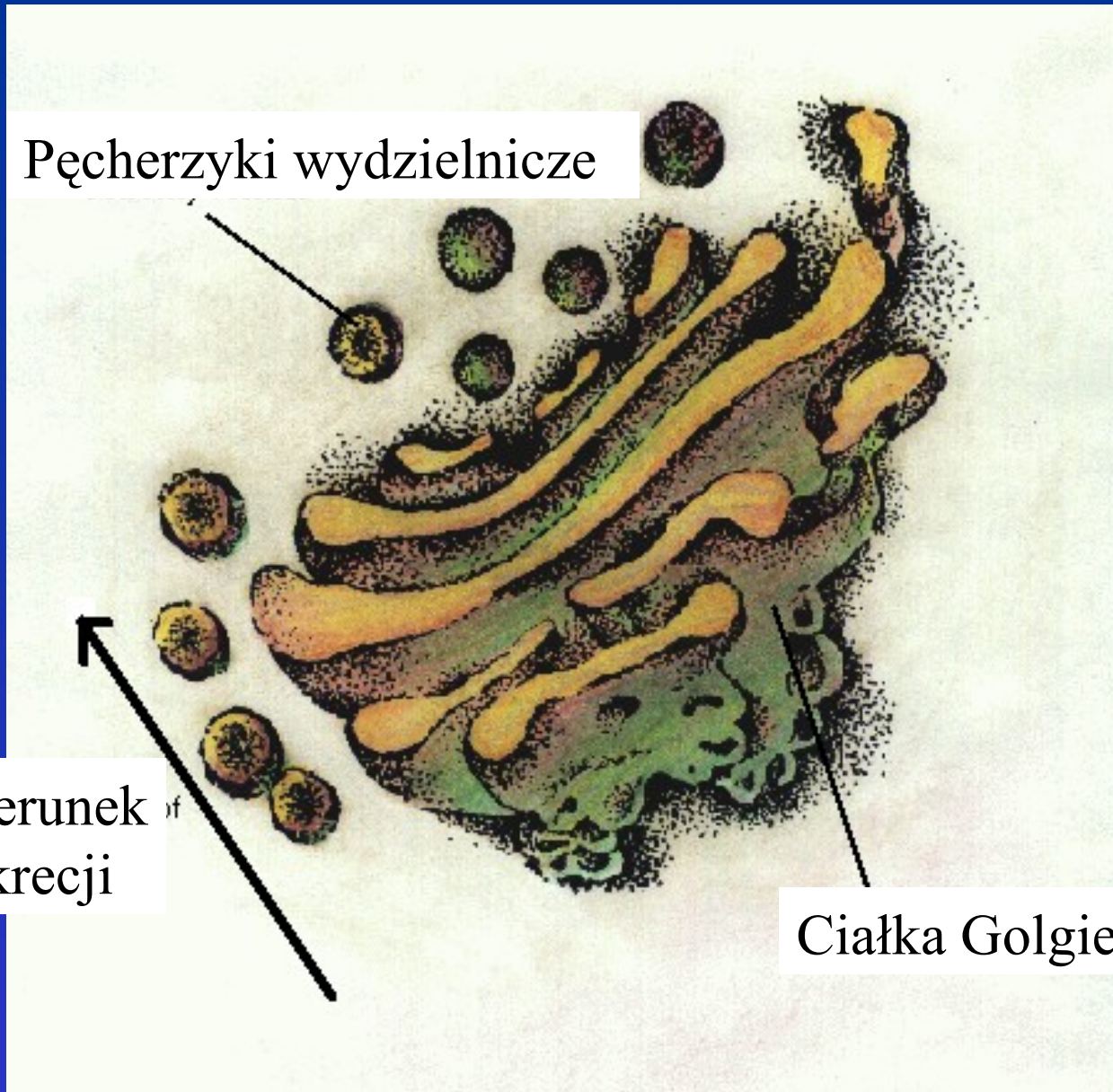
- Adresem kierującym białko do **lizosomu** jest mannozo-6-fosforan,
- Błona **aparatu Golgiego** zawiera receptory rozpoznające białka oznakowane m-6-f i tworzy pęcherzyki ulegające fuzji z pęcherzykami lizosomalnymi.
- **Białka prokariotyczne** przeznaczone do miejsc innych niż cytozol są umiejscowione na rybosomach związanych z błoną komórkową.

Pęcherzyki wydzielnicze

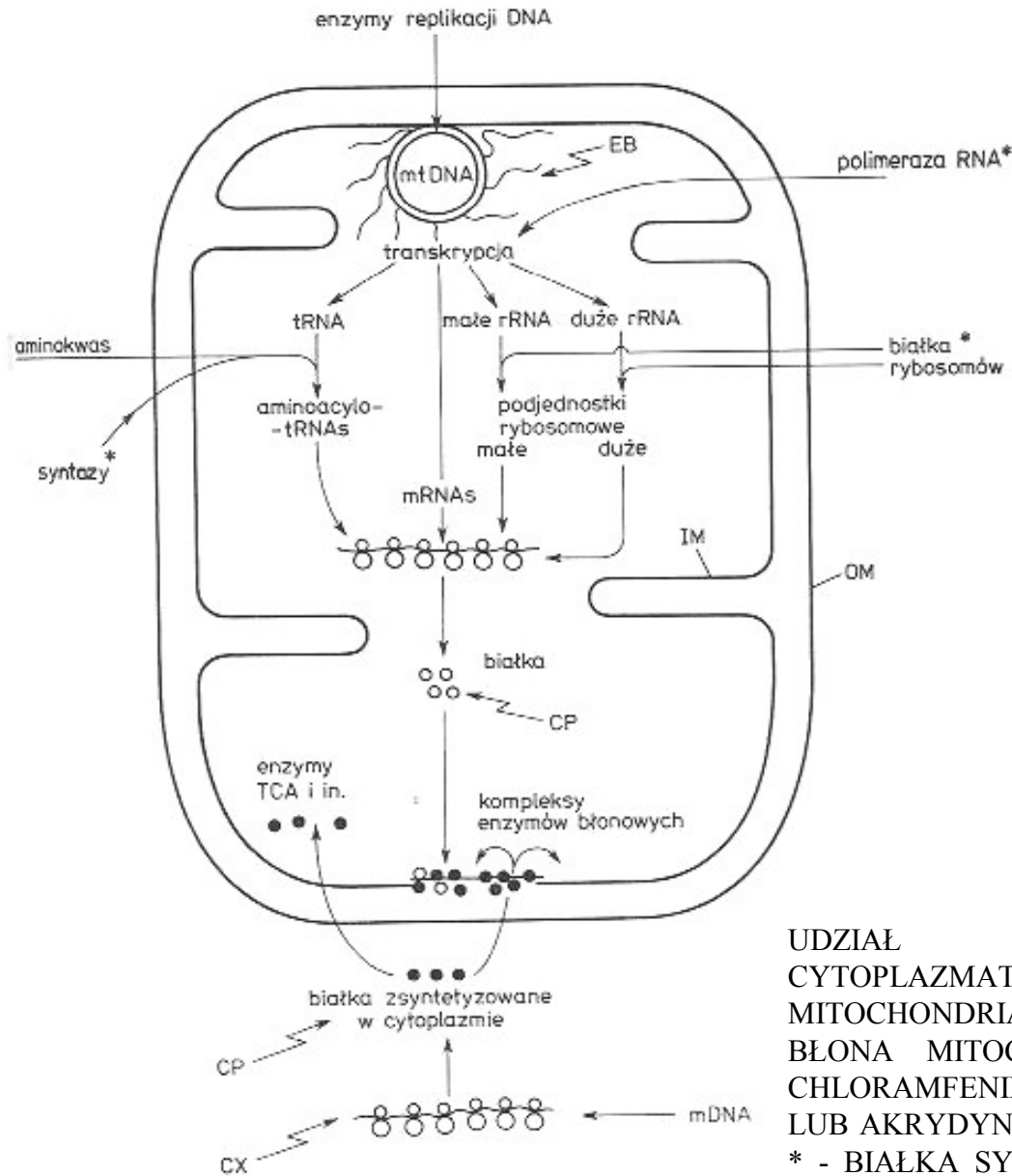
Kierunek
if
sekrecji

Ciała Golgiego

Aparat Golgiego (schemat)



Transport do mitochondriów



mtDNA koduje:

>wszystkie tRNA

>mt rRNA

>polipeptydowe
składniki mt
łańcucha transportu
elektronów i
syntetazy ATP

UDZIAŁ ELEMENTÓW MITOCHONDRIALNYCH I CYTOPLAZMATYCZNYCH W EKSPRESJI GENOMU MITOCHONDRIALNEGO. IM – WEWNĘTRZNA I OM ZEWNĘTRZNA BŁONA MITOCHONDRIALNA, CX – CYKLOHEKSAMID, CP – CHLORAMFENIKOL LUB ERYTROMYCINA, BR – BROMEK ETYDYNY LUB AKRYDYNY, TCA – CYKL KWAŚÓW TRÓJKARBOKSYLOWYCH, * - BIAŁKA SYNTETYZOWANE W CYTOPLAZMIE. (KAWIAK I WSP., 1995 PODSTAWY CYTOFIZJOLOGII)

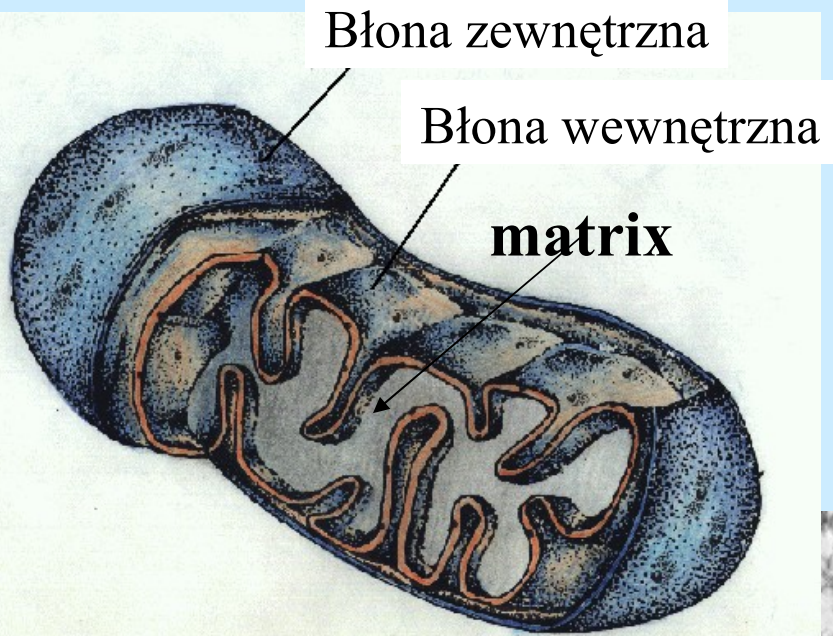
Większość białek mitochondrialnych jest syntetyzowana w cytozolu i importowana do tych organelli.

Import białek prekursorowych do matriks mitochondrialnej zachodzi z udziałem specjalnych białek, zarówno cytozolowych jak i zawartych w błonach mitochondrialnych i matriks.

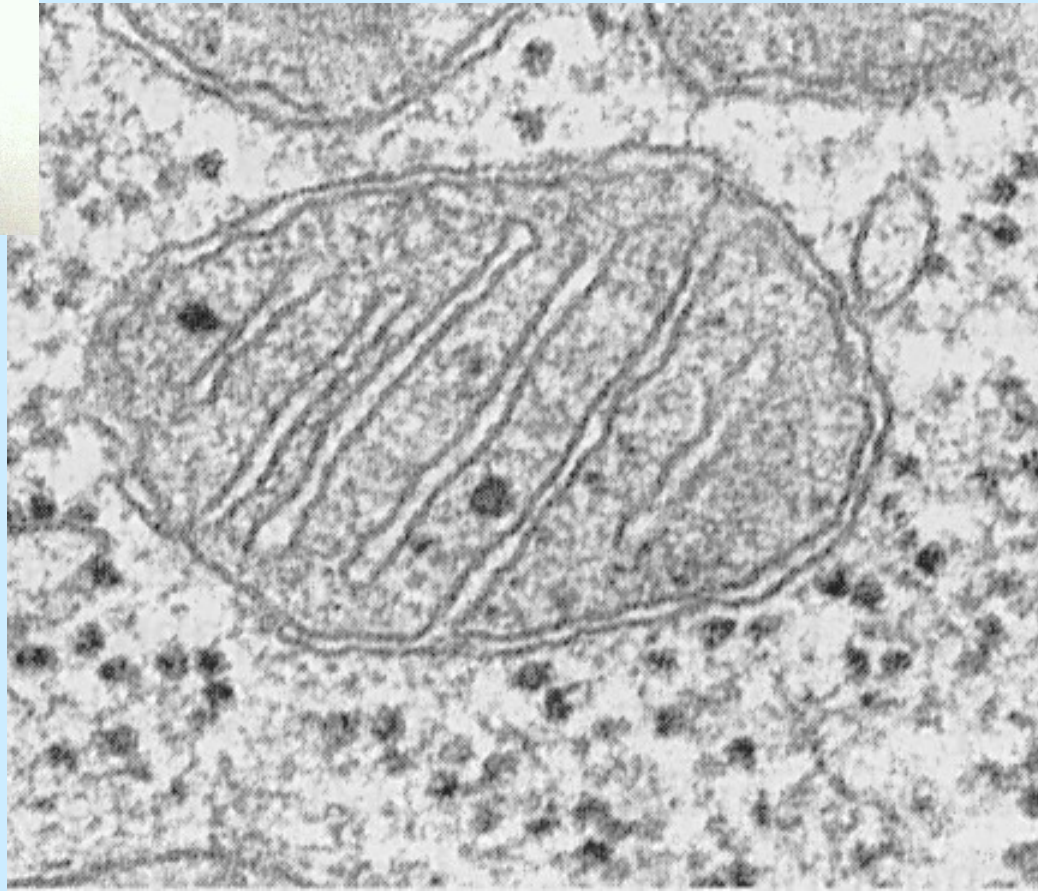
Białka całkowicie sfałdowane nie mogą wejść do mitochondriów. Stąd też kluczowa rola chaperonów, które utrzymują białka prekursorowe w stanie niesfałdowanym lub tylko częściowo sfałdowanym.

Chloroplasty również importują większość białek i sortują je zgodnie z informacją zawartą w pre-sekwencjach tych białek.

Mitochondrion (schemat)



Mitochondrion fot. ME



Białka mitochondrialne pochodzenia jądrowego

- Białka błonowe.
- Białka rozpuszczalne, które zapewniają transport elektronów, wytwarzanie gradientu protonowego, syntezę ATP, przebieg cyklu kwasów trójkarboksylowych i ekspresję genów.
- Białka umożliwiające transport metabolitów przez wew. błonę mitochondrialną (np.. translokazy nukleotydów adeninowych i przenośników metabolitów cyklu kwasów trójkarboksylowych).

Etapy syntezy importu białek do mitochondriów (chloroplastów)

1. Synteza białek na wolnych polisomach, w formie prekursorowej z charakterystyczną sekwencją sygnałową
2. Rozfałdowanie białek prekursorowych (ATP)
3. Specyficzne wiązanie się do receptorów na powierzchni zewnętrznej błony mitochondrialnej.
4. Przemieszczenie przez zewnętrzną lub obie błony i sortowanie do jednego z czterech przedziałów mitochondrialnych (błona zew., przestrzeń międzybłonowa, błona wew., matriks). Przemieszczanie dokonuje się w miejscach styku obu błon (miejsca kontaktowe) i jest zależne od potencjału błonowego wew. błony.
5. Skrócenie prekursora do formy ostatecznej lub pośredniej (białka kierowane do przestrzeni międzybłonowej) w matriks przez odcięcie sekwencji sygnałowej.
6. Podczas importu zachodzą: dodatkowe etapy dojrzewania, obejmujące kowalencyjne i niekowalencyjne modyfikacje (przyłączanie hemu, uformowanie centrów Fe-S) i zmiany konformacyjne.
7. Usunięcie sekwencji sortującej (koniec N białka po odcięciu sekwencji sygnałowej) białek kierowanych do przestrzeni międzybłonowej.
8. Sfałdowanie peptydów w strukturę funkcjonalną i często wytworzenie kompleksów z białkami kodowanymi przez mtDNA.

KIEROWANIE BIAŁEK DO PEROKSYSOMÓW

- **Peroksysomy są małymi przedziałami otoczonymi pojedynczą błoną, obecnymi w większości organizmów eukariotycznych.**
- **Organelle te zawierają oksydazy, które wytwarzają H_2O_2 oraz katalazy.**
- **U roślin podobne organelle zwane są glikozysomami.**
- **Peroksysomy i glikozysomy są pozbawione DNA. Rozpuszczalne białka znajdujące się w ich matriks importowane są z cytozolu .**
- **Sygnałem kierującym dla wielu białek peroksysomowych jest C końcowy tripeptyd : ser-lys-leu (SKL)**

KIEROWANIE BIAŁEK DO JĄDRA

Jądro komórek eukariotycznych otoczone jest osłonką jądrową zbudowaną z wewnętrznej i zewnętrznej błony jądrowej rozdzielonej przestrzenią perynuklearną.

Zewnętrzna błona jądrowa pozostaje w ciągłości z RE szorstkim a przestrzeń perynuklearna w ciągłości ze światłem RE.

Wszystkie białka zawarte w jądrze komórkowym syntetyzowane są w cytozolu przez wolne rybosomy. Polimerazy RNA, polimerazy DNA, białka histonowe, rybosomalne wchodzi do jądra przez pory.

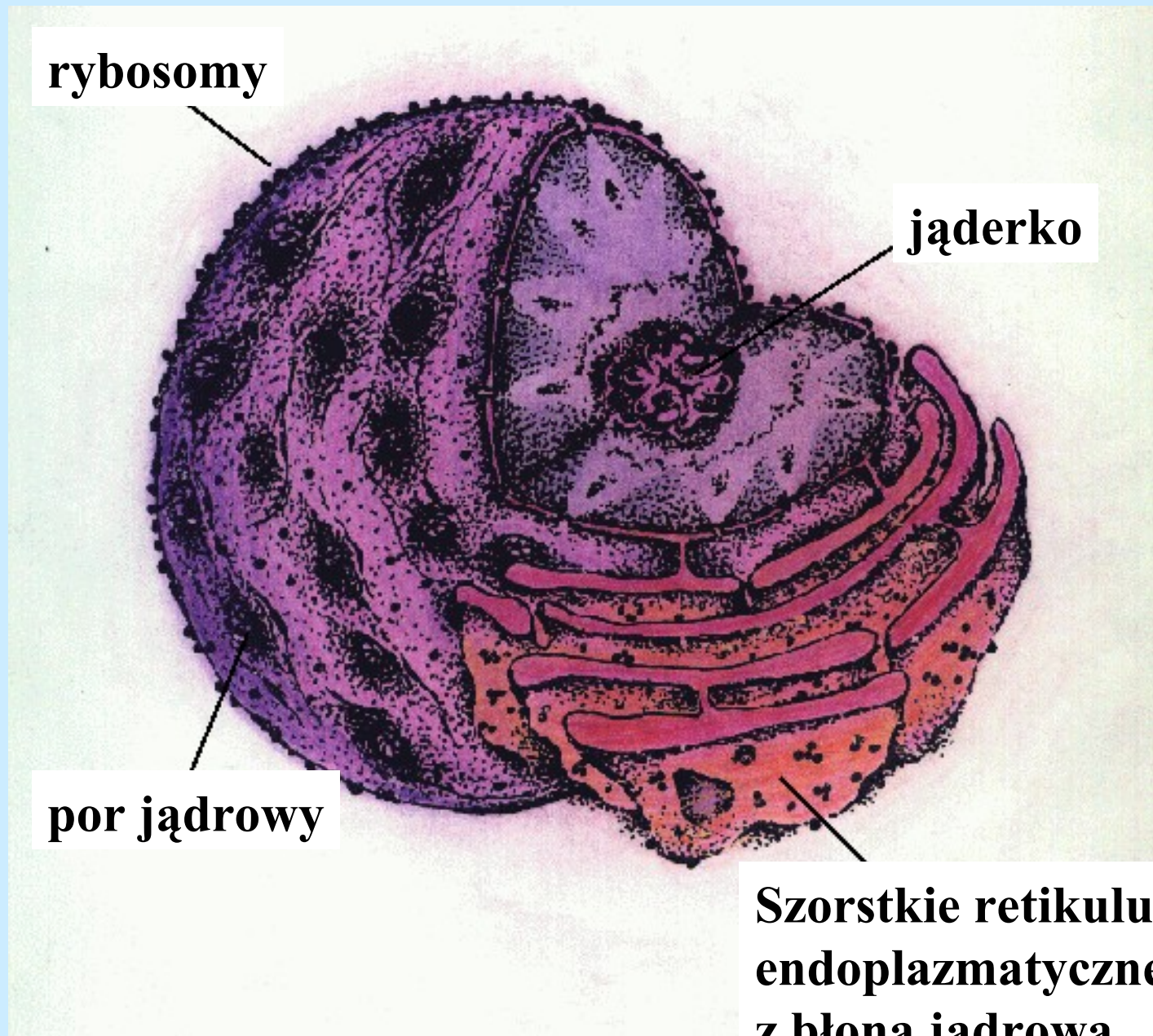
Małe białka (do 15 kDa) mogą przechodzić bez pomocy, duże muszą posiadać swoje sygnały w postaci krótkich peptydów. Do jądra mogą być importowane białka całkowicie sfalutowane.

rybosomy

jąderko

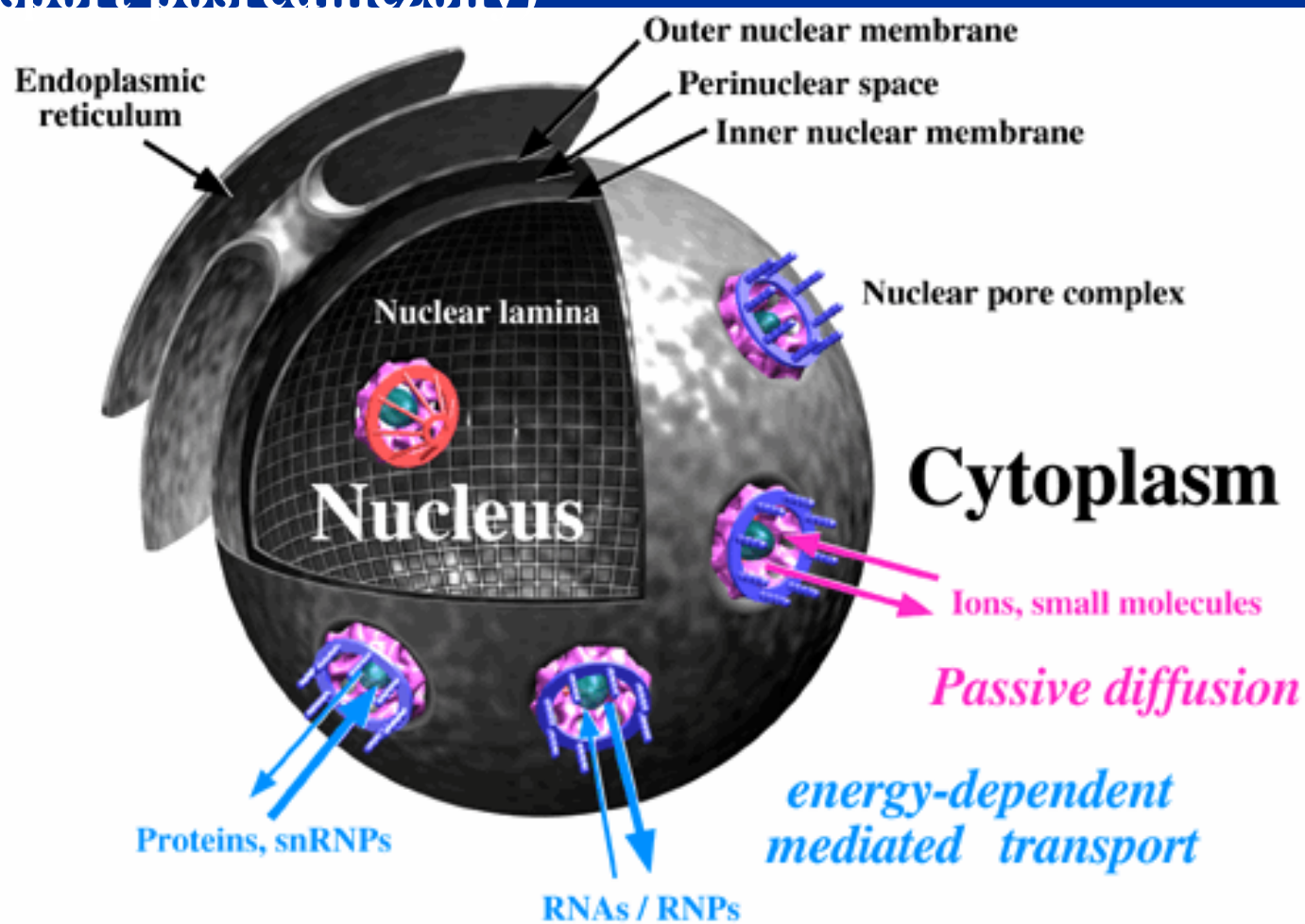
por jądrowy

**Szorstkie retikulum
endoplazmatyczne łączy się
z błoną jądrową**



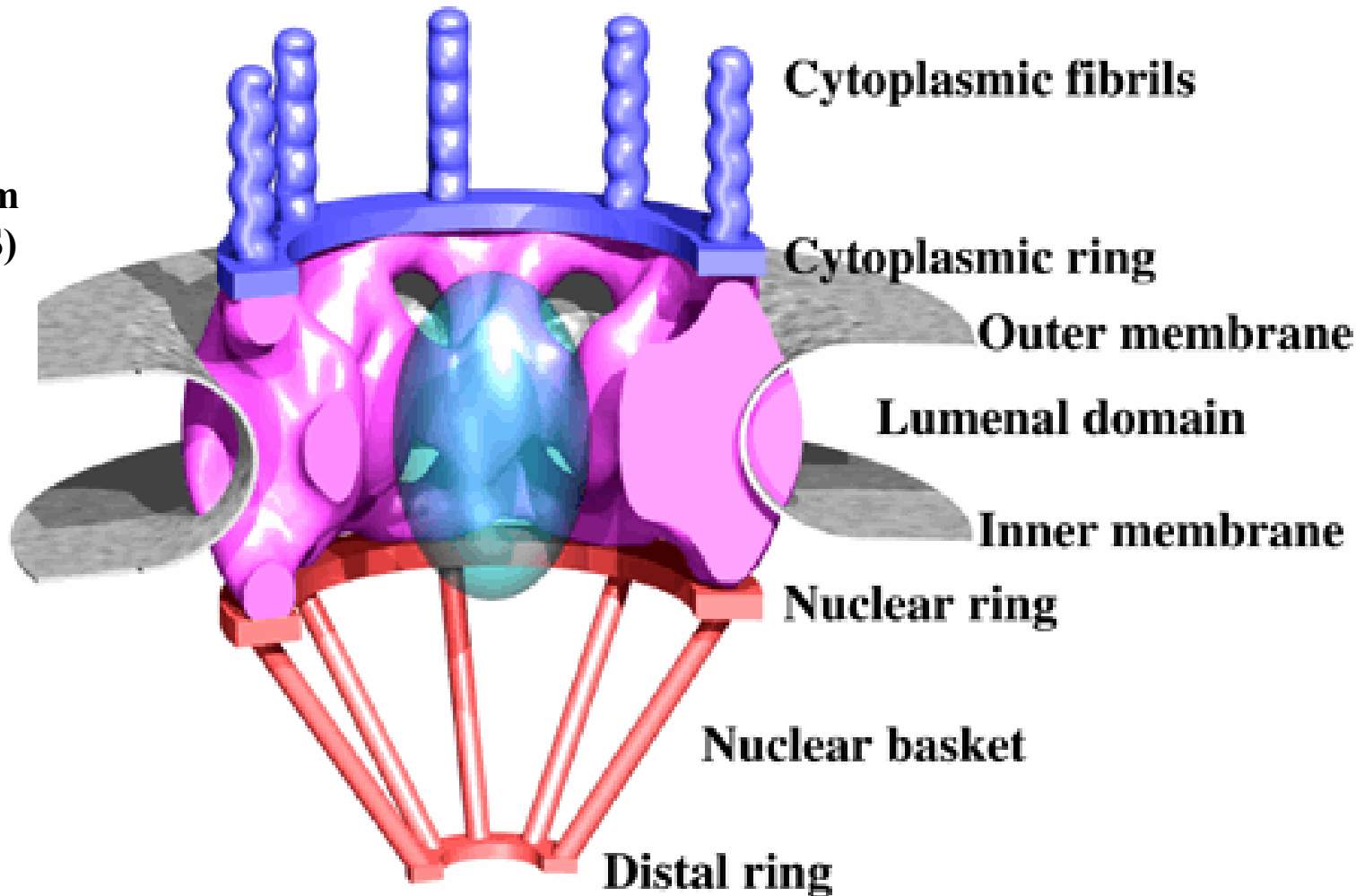
Kompleks porów jądrowych (NPC) pozwala na bierną dyfuzję jonów i małych cząsteczek.

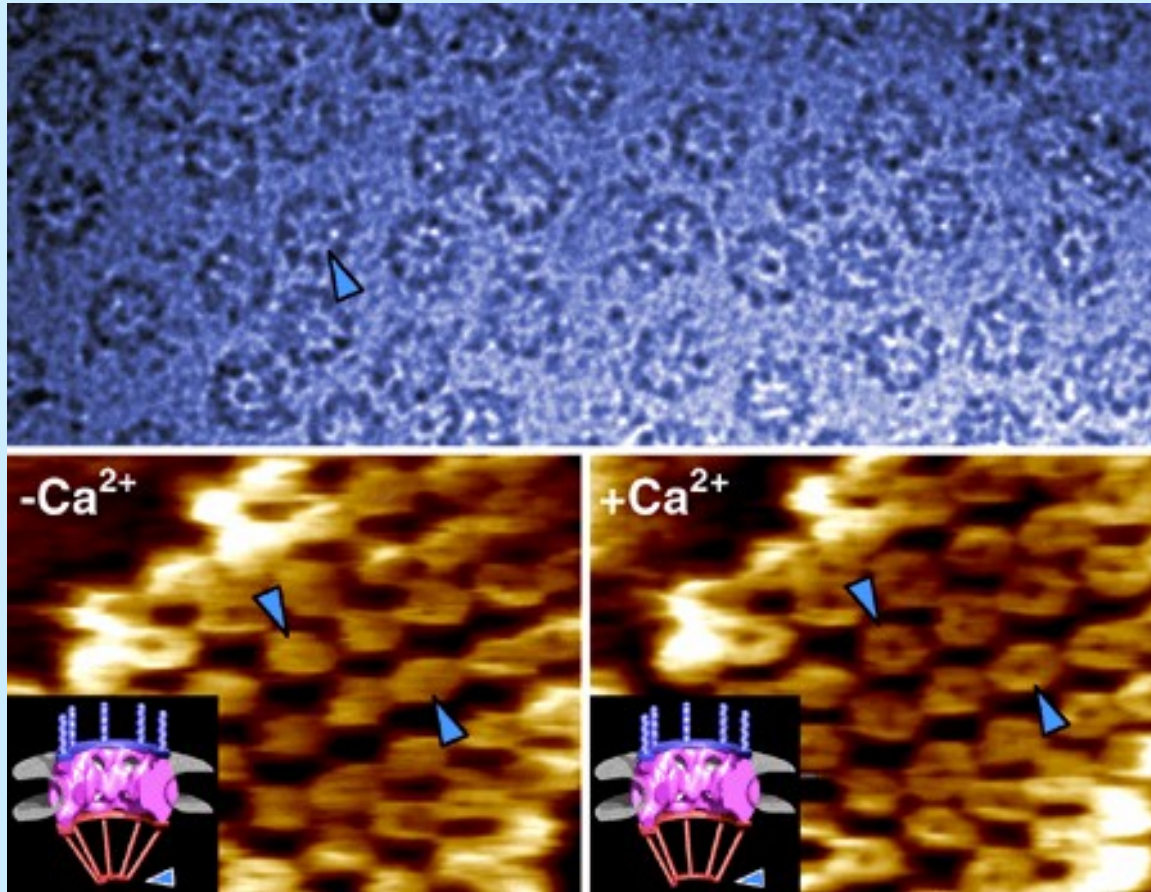
Białka jądrowe, RNA i rybonukleoproteiny o cząsteczkach większych niż 9 nm są selektywnie i aktywnie transportowane przez NPC przy pomocy białek sygnałowych i energii (transport pośredniczony)



Schematyczny, trójwymiarowy obraz kompleksu porów jądrowych (NPC)

NPC ma ogólną masę ok. 25 razy większą niż rybosom eukariotyczny (80 S)
Najmniejsza powtarzalna komponenta ma masę 6 000 000





W górnej części obraz ME z mrożonych, nieutrwalonych i niebarwionych kompleksów porów jądrowych (strzałka wskazuje szczególnie dobrze zachowany NPC)

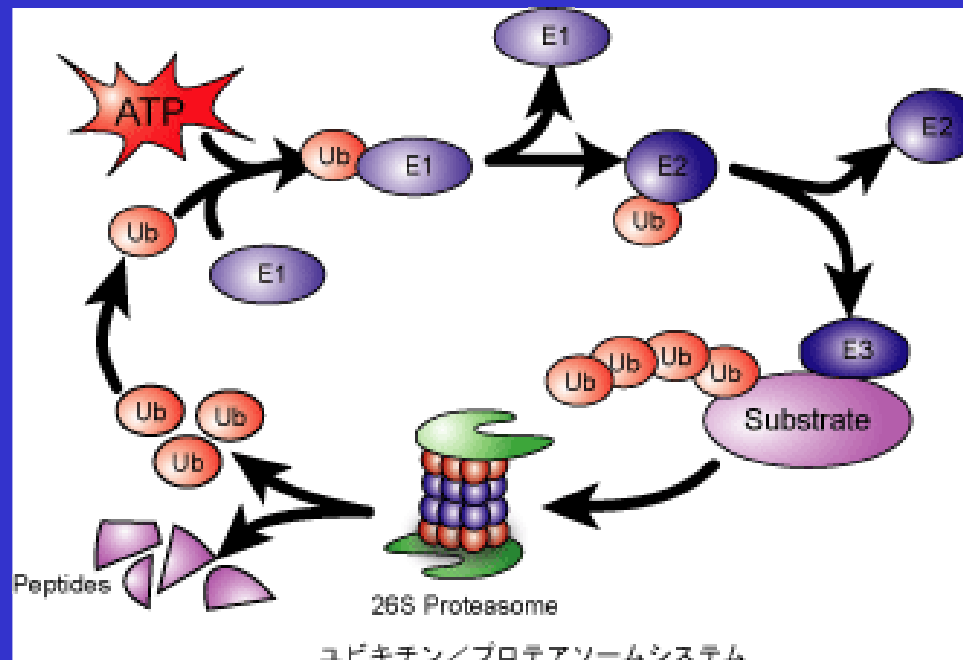
NPC mogą działać na zasadzie żrenico-podobnej przesłony, otwierając się pod wpływem obecności jonów Ca^{++} (dolna część ilustracji)

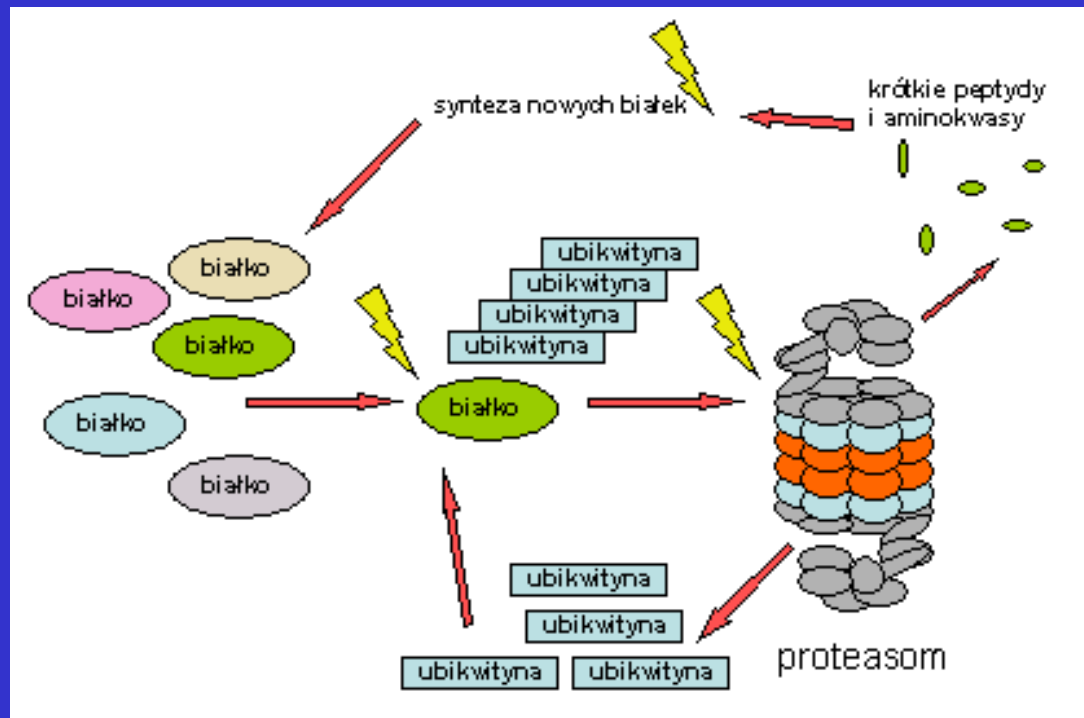
DEGRADACJA BIAŁEK

- Białka są również kierowane do ich miejsc zniszczenia.
- Półokres życia białek jest bardzo różny.
- Większość tych enzymów, które pełnią ważną rolę w regulacjach metabolicznych, ma krótki okres życia i zmiana ich ilości może regulować/przestawiać metabolizm komórki.
- Kontrolowana degradacja jest też ważna przy usuwaniu białek nieprawidłowych
- Ważną rolę w naznaczaniu białek, które mają ulec zniszczeniu odgrywa ubikwityna (białko 8,5 kDa), obecna we wszystkich komórkach eukariotycznych. Jest bardzo konserwatywna, ubikwityna drożdży i człowieka różni się jedynie 3 z 76 reszt.

DEGRADACJA BIAŁEK

- ★ Pierwszym etapem jest związanie wiązaniem tioestrowym końcowej grupy karboksylowej ubikwityny z grupą hydrosulfidową enzymu E1 przy udziale ATP.
- ★ Zaktywowana ubikwityna jest następnie przemieszczana na hydrosulfidową grupę E2.
- ★ W końcu E3 katalizuje przeniesienie ubikwityny z E2 na docelowe białko. Białko naznaczone do rozkładu ma zazwyczaj kilka przyłączonych cząsteczek ubikwityny.





Uproszczony schemat degradacji białek z udziałem ubikwityny

Komórkowe białka mające ulec zniszczeniu zostają wyznakowane poprzez przyłączenie kilku do kilkunastu cząsteczek specjalnej cząsteczki białka ubikwityny. Ubikwityna jest etykietką rozpoznawczą dla specjalnego enzymu zwanego proteasomem, który spełnia rolę kata – egzekutora niszczącego białko, które zostało „skazane na śmierć” poprzez wyznakowanie ubikwityną. Proteasom rozkłada takie białko na krótkie peptydy, które następnie są rozkładane do „poziomu” aminokwasów, podstawowych cegiełek budujących białka. Aminokwasy te używane są do syntezy nowych białek. Ubikwityna nie ulega zniszczeniu lecz jest uwalniana i może służyć ponownie do wyznakowania białek.

Białka komórkowe ulegają niszczeniu z dwóch głównych powodów – albo są już „zepsute” i nie spełniają należycie swoich funkcji, albo są kluczowymi przełącznikami procesów życiowych i muszą być zniszczone, ażeby te procesy prawidłowo zachodziły. Procesy przyłączania ubikwityny, rozkładu białek za pomocą proteasomów oraz syntezy nowych białek wymagają dostarczenia energii (oznaczonej na schemacie znakiem pioruna). CEZARY WÓJCIK, 2003

Naznaczone ubikwityną białka są degradowane w PROTEASOMIE

★ **PROTEASOMY** są wysoce selektywnymi kompleksami proteinazowymi zlokalizowanymi w cytoplazmie i jądrze.

★ Każdy **proteasom** składa się z 2 zespołów : cylindrycznej części rdzeniowej 20 S (20 S proteasom) oraz 2 części 19 S, które przyłączają się do obydwu końców części rdzeniowej tworząc biologicznie aktywny proteasom 26 S.



★ Część rdzeniowa zbudowana jest z 28 podjednostek należących do 2 różnych typów: a i b

★ Pierścienie na końcach części rdzeniowej są zbudowane z podjednostek alfa i beta ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$).

Dziękuję za uwagę