

Komórkowe losy białek

Modyfikacje białek-obraćka potranslacyjna, transport wewnątrzkomórkowy,
degradacja, eksport

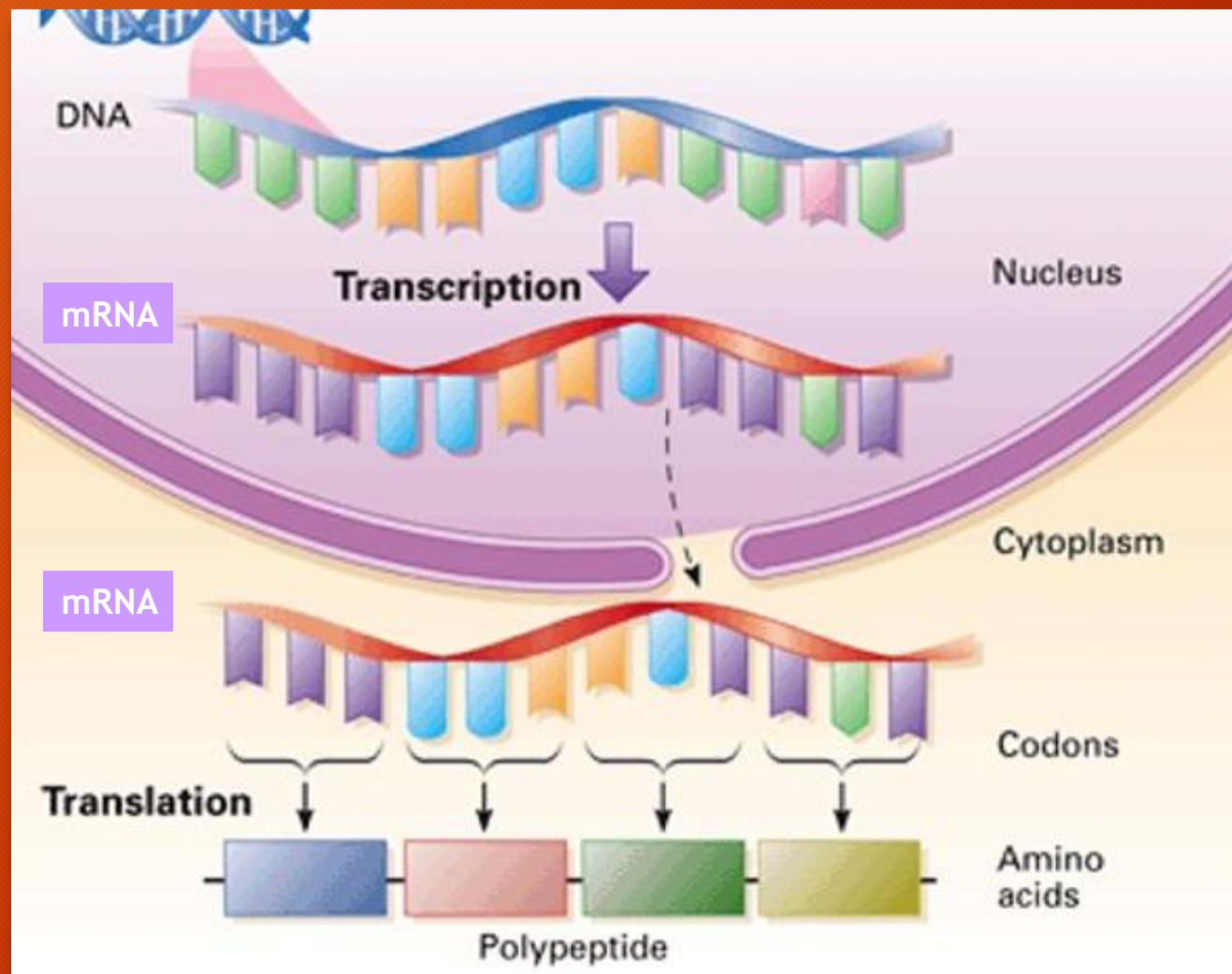
Dr n. med. Agata Białoszeńska-Magnusson



Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

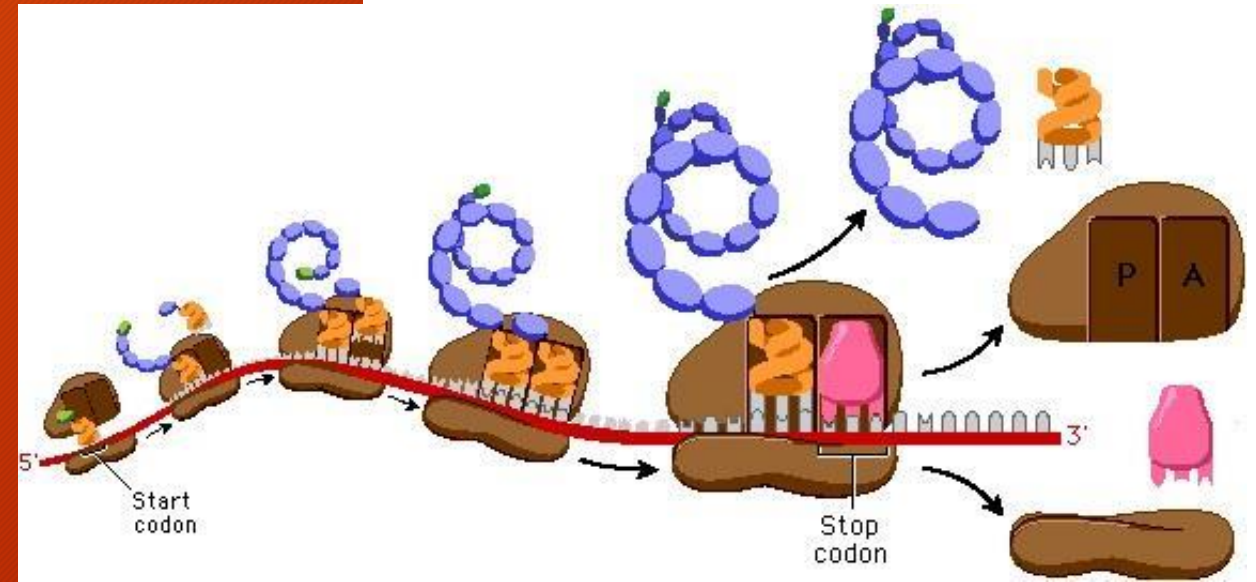
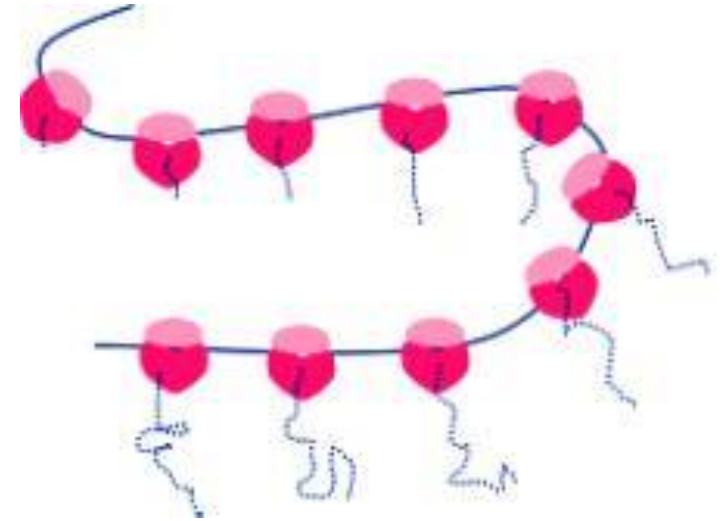
Od DNA do białka

- Informacja dotycząca I-rzędowej struktury białek jest kodowana w jądrowym DNA (sekwencja aminokwasów)
- Transkrypcja - przepisywanie informacji z DNA na mRNA
- mRNA jest transportowane z jądra na teren cytoplazmy
- Translacja - proces tworzenia białek przez rybosomy. Sekwencja kodonów (po trzy nukleotydy) mRNA jest tłumaczona na aminokwasy budujące łańcuch polipeptydowy



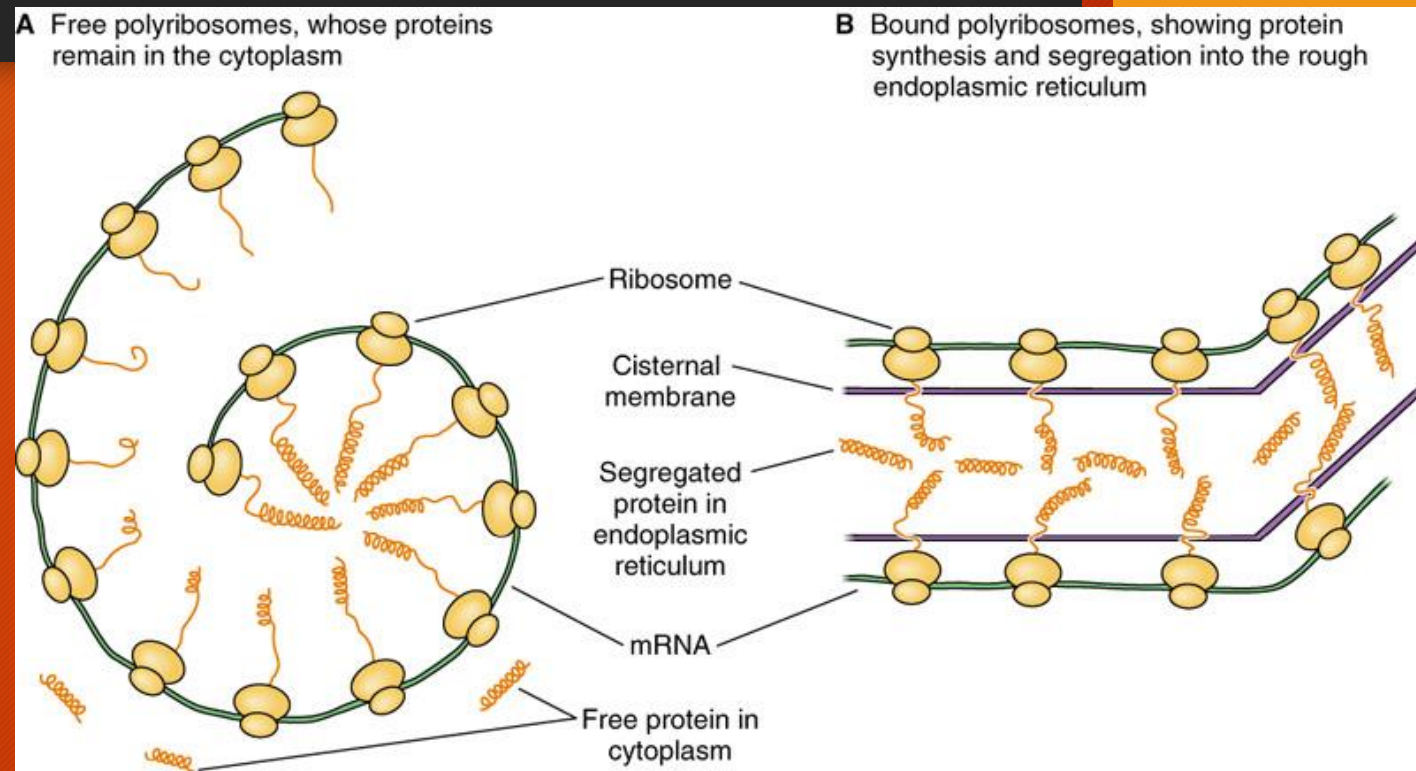
Polirybosomy (polisomy)

Wiele rybosomów jednocześnie odczytuje jedną nić mRNA, syntetyzując jednocześnie wiele cząsteczek tego samego białka



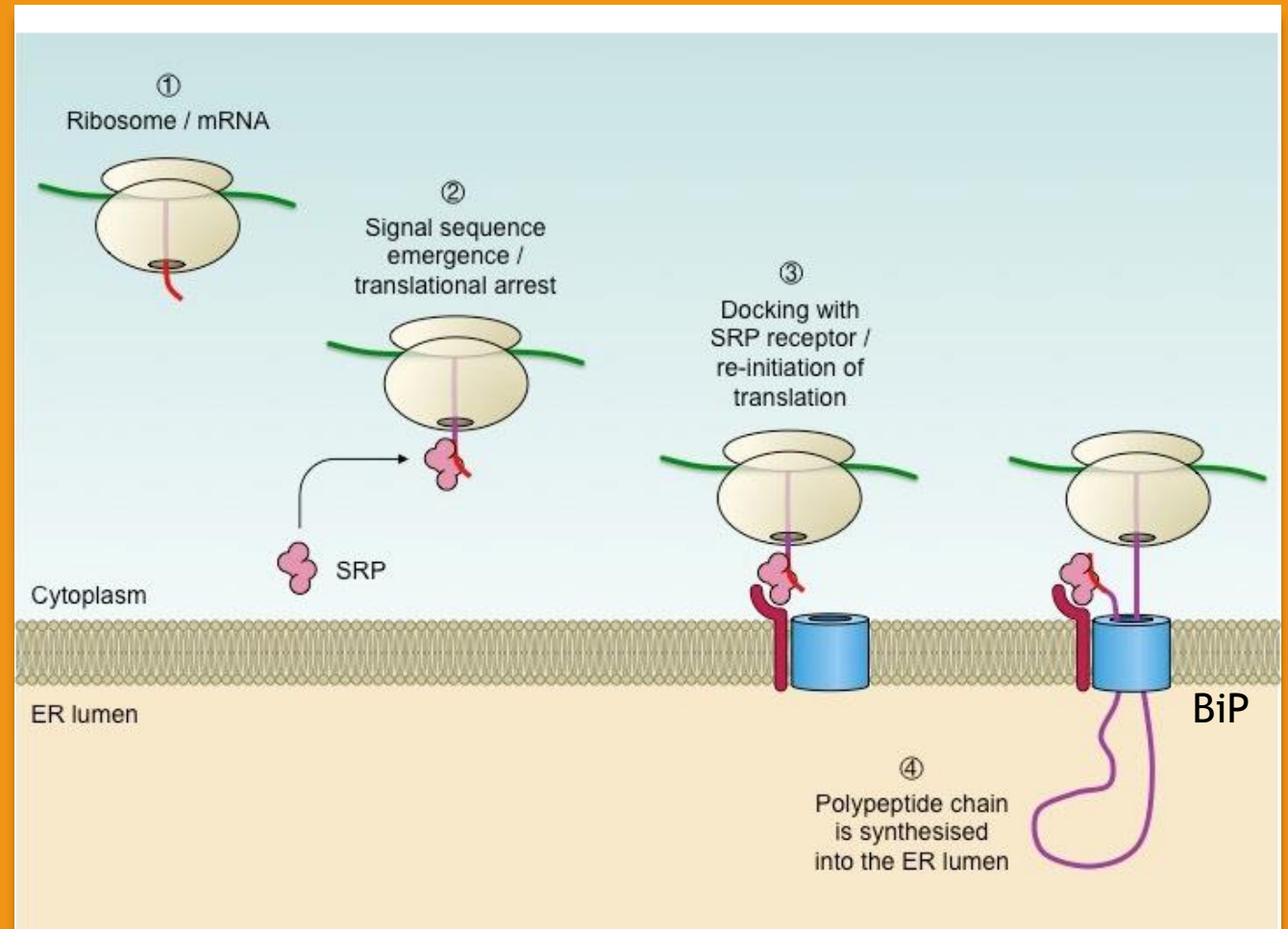
Dwie formy polirybosomów

- Białka przeznaczone do mitochondriów, peroksysomów, jądra kom. Są syntetyzowane w cytosolu i **potranslacyjnie** kierowane do odp. organeli
- Transport **kotranslacyjny** do RE:
 - białka błonowe - błony komórkowej, RER, lizosomów, mitochondriów
 - białka rezydujące w świetle przedziałów błoniastych - lizosomy
 - białka przeznaczone na eksport



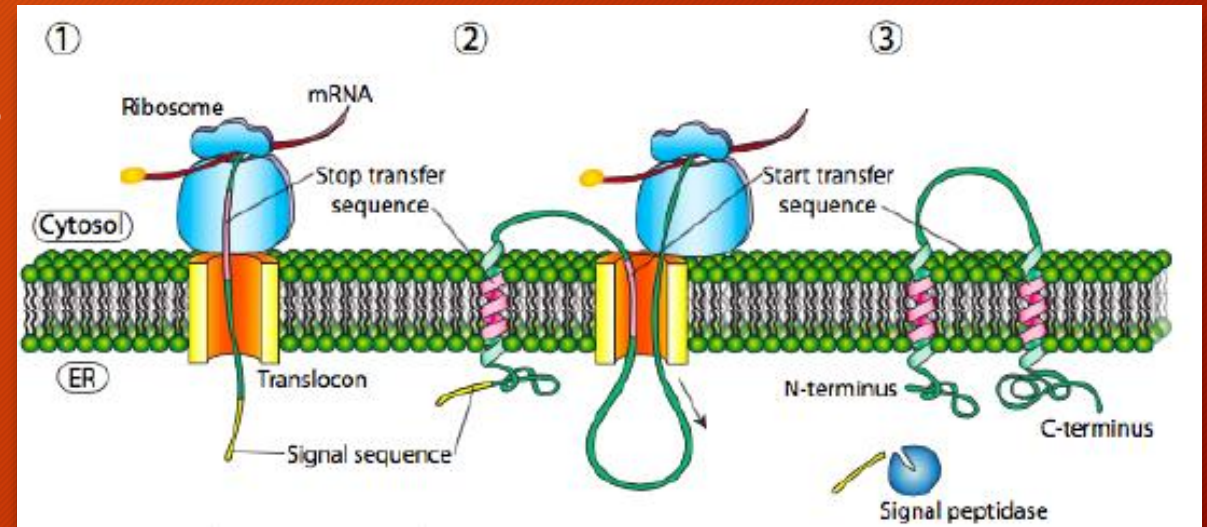
Translacja do RER

- Sekwencja sygnałowa dla ER - aminokwasy hydrofobowe
- Sekwencja sygnałowa kierująca białka do ER łączy się z obecną w cytozolu cząstką rozpoznającą sygnał (SRP), a następnie z receptorem SRP w błonie ER - połączenie z kanałem translokacyjnym w błonie ER.
- Białko przemieszcza się przez kanał translokacyjny do wnętrza ER, SRP odłącza się, peptydaza sygnałowa odcina peptyd sygnałowy



Białka transbłonowe RER

- Białka z pojedynczym segmentem transbłonowym posiadają sekwencję stoptransferową.
- Boczne otwarcie translokonu, przemieszczenie się polipeptydu.
- Odcięcie peptydu sygnałowego, sekwencja stoptransferowa w formie α -helisy kotwiczy białko.
- N-koniec w świetle RER, karboksylowy w cytosolu.
- Białka wielokrotnie transbłonowe mają naprzemiennie sekwencje stop- i starttransferowe



<https://cellandmolecularbiology.pressbooks.tru.ca/chapter/3-1/>

Sekwencje sygnałowe

15-60 reszt aminokwasowych

Tabela 15-3 Przykłady typowych sekwencji sygnałowych

FUNKCJA SYGNAŁU	PRZYKŁAD SEKWENCJI SYGNAŁOWEJ
Import do ER KDEL	⁺ 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-
Zatrzymanie w świetle ER	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO-
Import do mitochondriów	⁺ 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 do jądra NLS	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Import do peroksysomów PTS	-Ser-Lys-Leu-

Aminokwasy z ładunkiem dodatnim zaznaczono kolorem czerwonym, a ujemnym – kolorem niebieskim. Długi blok aminokwasów hydrofobowych zaznaczono żółtym tłem. ⁺H₃N oznacza koniec N białka; COO⁻ oznacza koniec C. Sygnał zatrzymania białka w ER zapisywany jest zwykle za pomocą jednoliterowych skrótów aminokwasów, stąd jest znany jako KDEL.

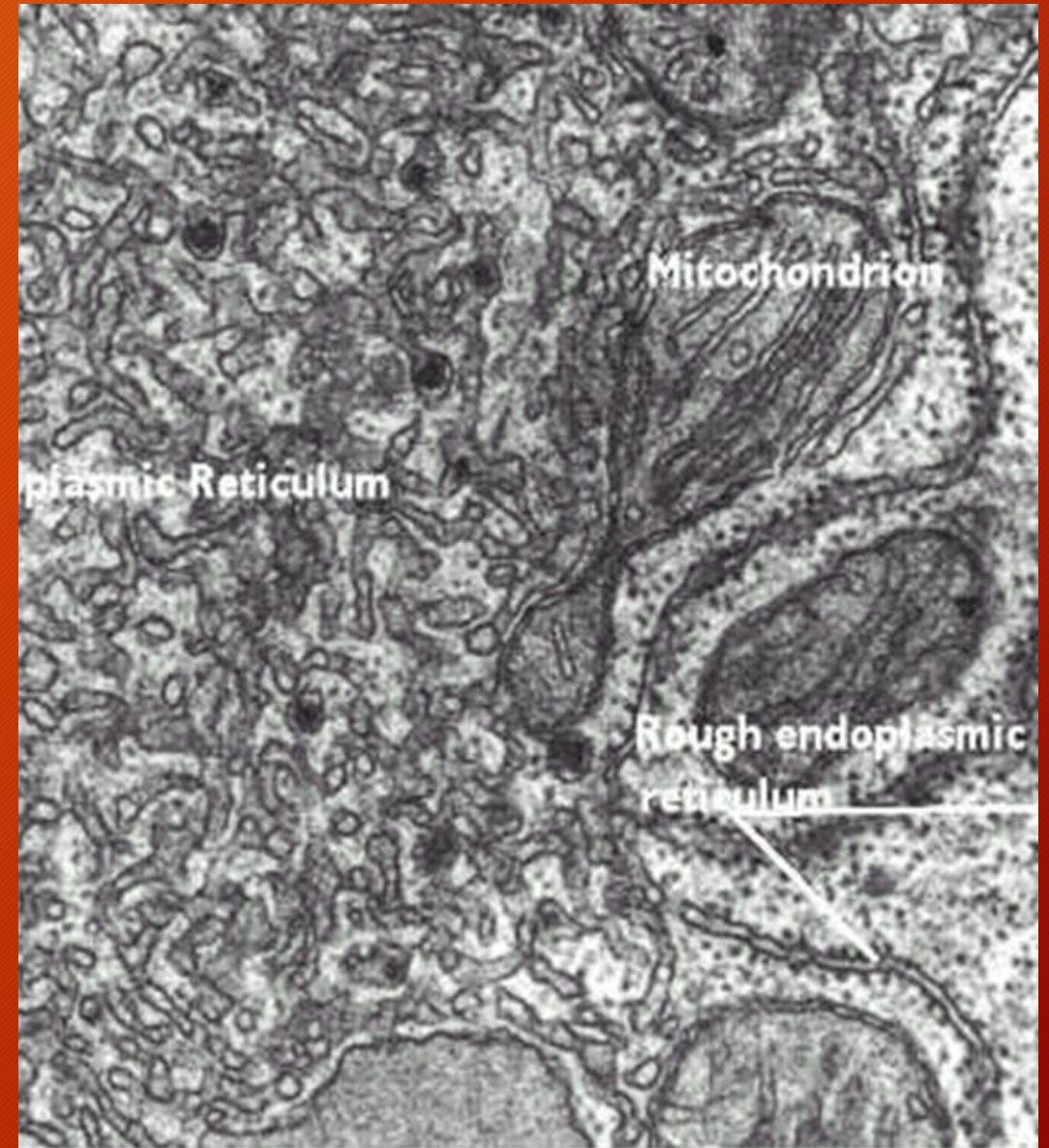
- Białka posiadają sekwencję aminokwasową zawierającą tzw. **sygnał sortujący**, który kieruje białko do właściwej organelli – białka rezydentne.
- Günter Blobel - 1999 r. Nagroda Nobla za sformułowanie hipotezy sygnałowej.

Siateczka śródplazmatyczna szorstka (RER)

Obfita w komórkach produkujących białka na eksport
(trzustka, komórki plazmatyczne)

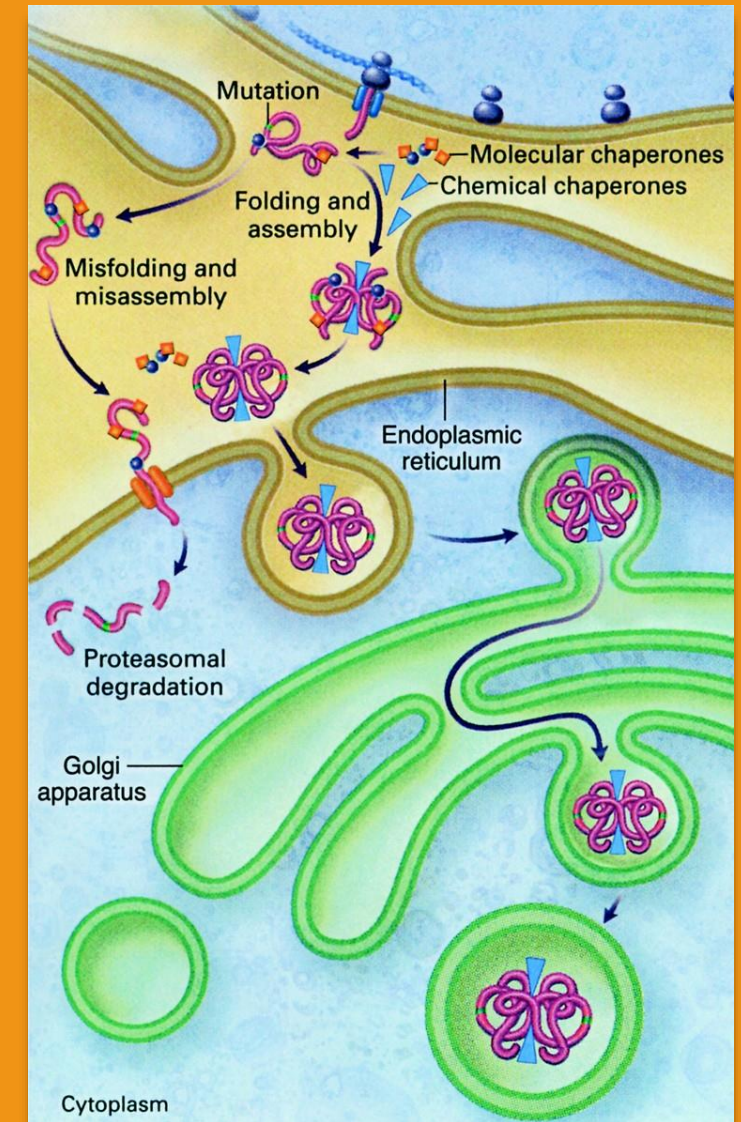
Potranslacyjna modyfikacja białek

- Glikozylacja - kotranslacyjne przyłączenie oligosacharydowych łańcuchów bocznych - ochrona przed degradacją, sygnał transportowy (transferaza oligosacharydowa)
- Wiązania dwusiarczkowe - stabilizacja III i IV rz. struktury białek (izomeraza dwusiarczkowa)
- Fałdowanie białek - białka opiekuńcze (chaperones)



Białka opiekuńcze/ białka szoku cieplnego/hsp/chaperones

- Białka opiekuńcze nadają/przywracają prawidłową konformację przestrzenną źle sfałdowanym, rozfałdowanym i zdenaturowanym białkom.
- Występują w cytozolu, RER i mitochondrium
- ATP-azy, powinowactwo do domen hydrofobowych
- Rodziny HSP60, HSP70 i HSP90
- Zwiększona ekspresja w warunkach stresowych dla komórki - temp, promieniowanie jonizujące, wirusy, jony metali ciężkich
- Odporne na denaturację
- Ubikwitynacja nienaprawialnego substratu - degradacja
- Ryzyko- formowanie agregatów źle sfałdowanych białek - ciała inkluzyjne - apoptoza
- Utrzymanie niesfałdowanej formy łańcuchów wtransportowanych do RER i mitochondrium

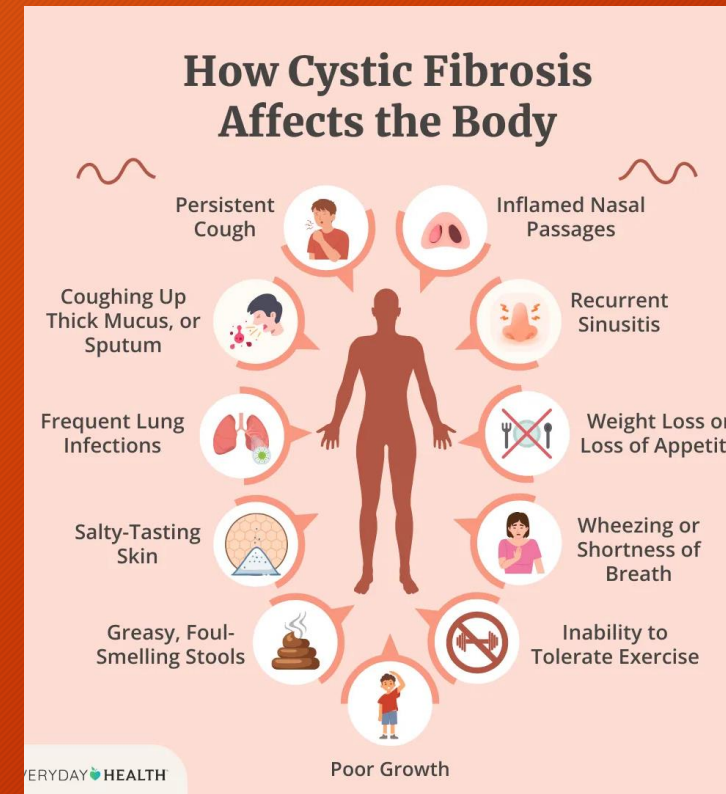


Mukowiscydoza (1/5tyś.)

- Mutacja kanału chlorkowego - CFTR
- Zredukowane wydzielanie jonów chlorkowych w przewodach
- Reabsorpcja jonów sodu i wody
- Gęsty, zalegający śluz - infekcje bakteryjne

Mutacje prowadzą do:

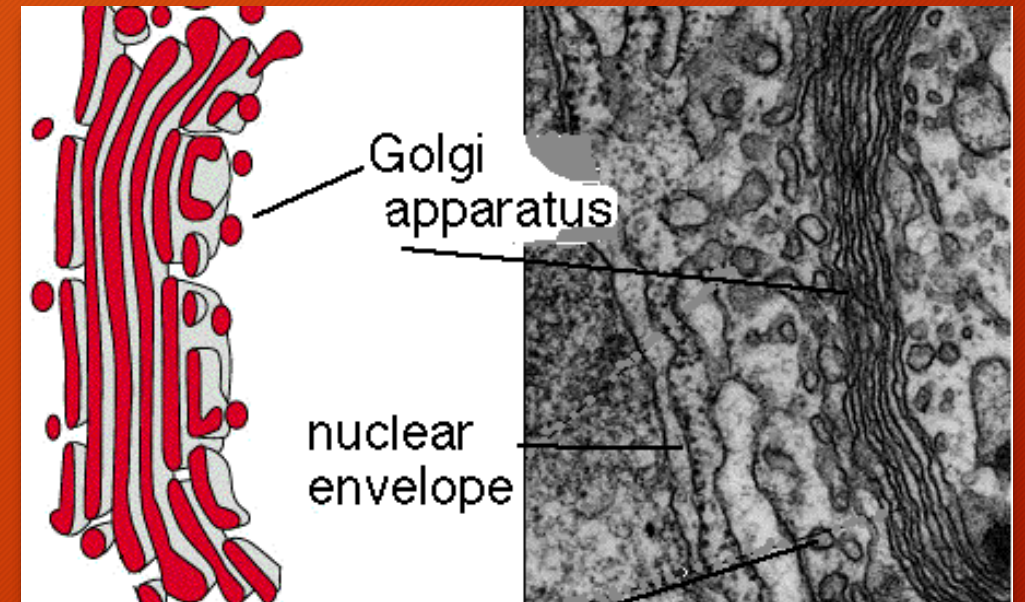
niepełna długość mRNA, obniżony poziom mRNA, upośledzone fałdowanie i transport, zdolność wiązania i hydrolizy ATP, upośledzone rozpoznanie substratu, kierowanie do degradacji, obniżony poziom białka, skrócony okres półtrwania w błonie plazmatycznej.



- 80% przypadków - zatrzymanie białka CFTR w RER w wyniku nieprawidłowego sfałdowania
- Ciągłą ekspozycją motywów retencyjnych (hydrofobowych) - uniemożliwienie pakowania w pęcherzyki otłuszczone COPII

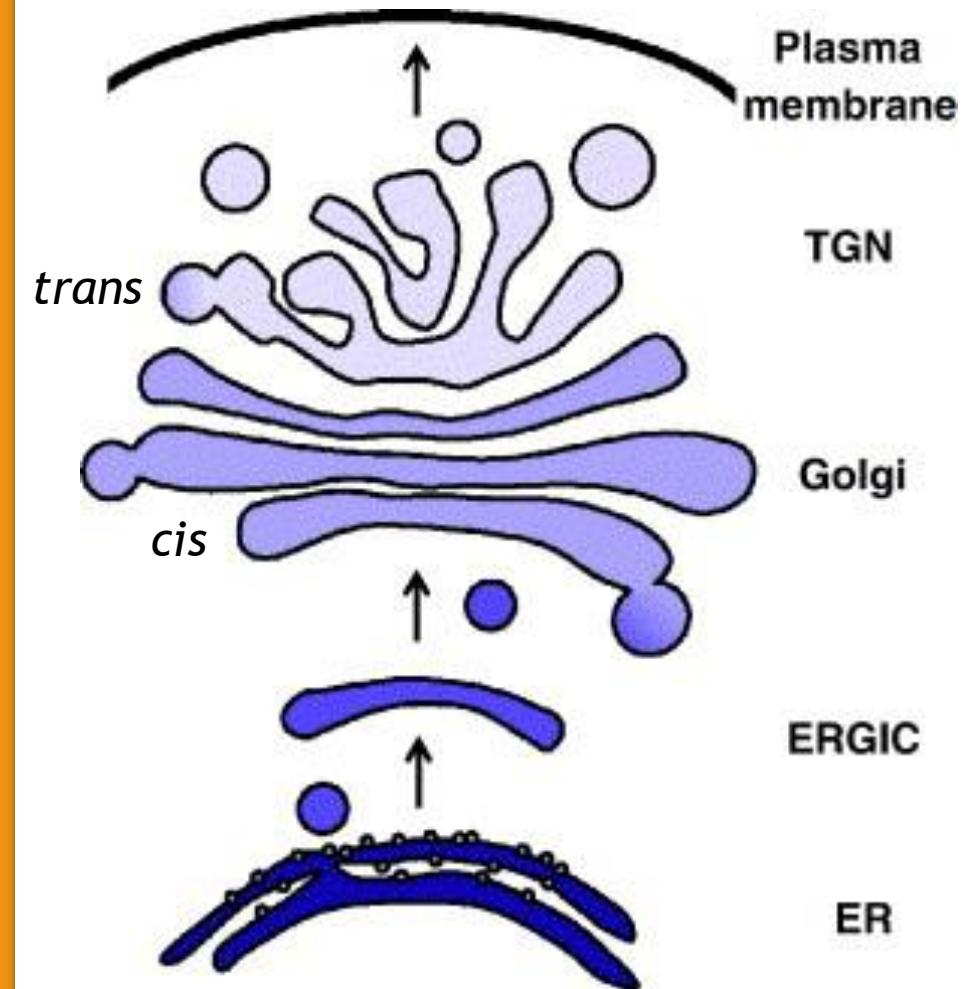
Aparat Golgiego

- Stos 6-30 płaskich, obłonionych cystern - diktiosomów
- Brzegi każdej cysterny są rozszerzone i otoczone przyłączającymi lub odłączającymi się pęcherzykami.
- Mikrotubule - rusztowanie
- 3 poziomy cystern:
 - wypukły biegun *cis* (syntezy) zwrócony w stronę RER
 - powierzchnia środkowa
 - wklęsły biegun *trans* (dojrzewania) w stronę błony komórkowej



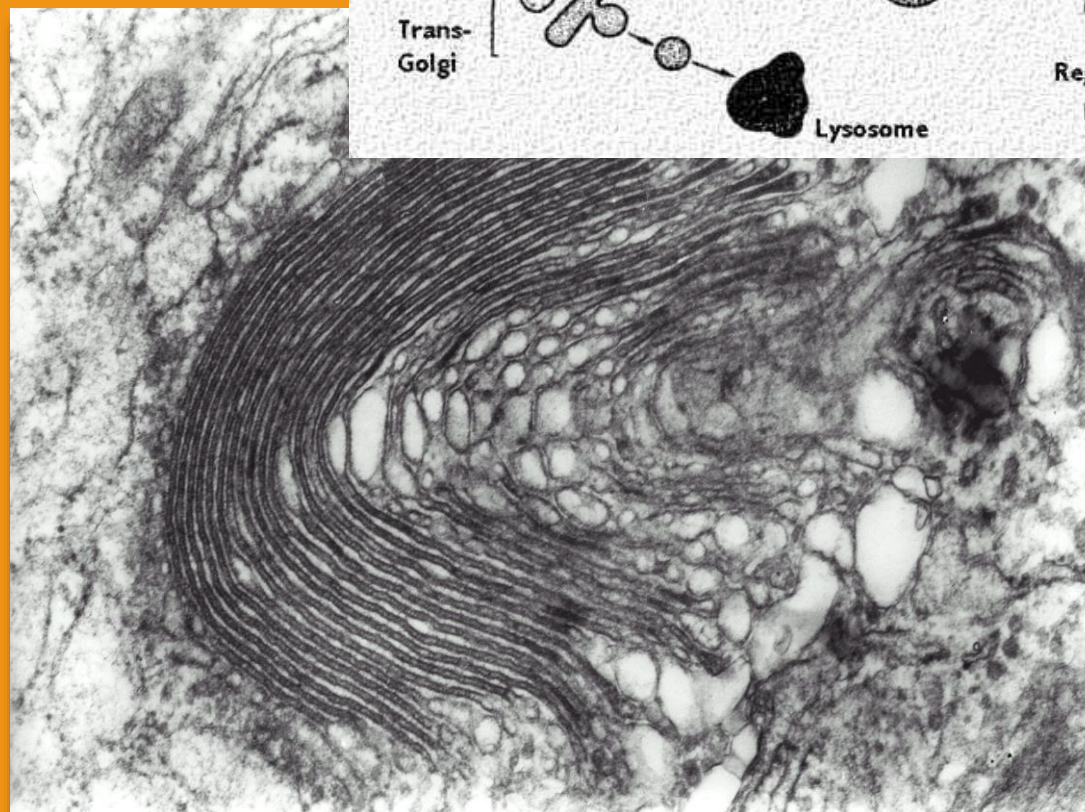
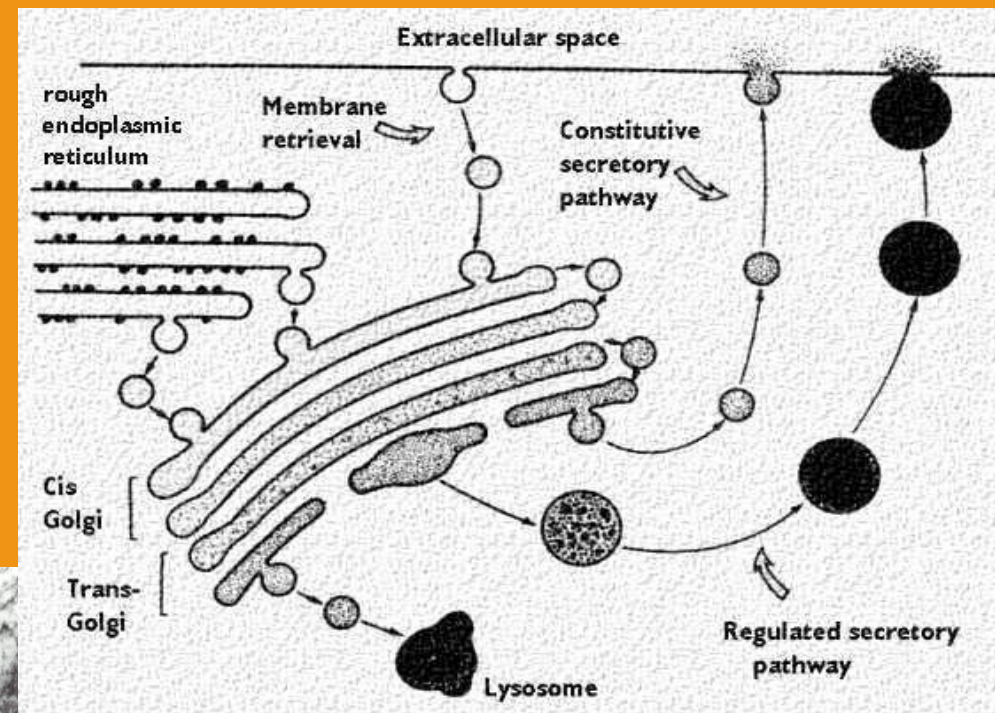
Komora pośrednia ER-Golgiego

- Endoplasmic reticulum/Golgi intermediate compartment (ERGIC) - zawiera pęcherzyki z białkami pochodzące z szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (RER)
- Kluczowa dla formowania się autofagosomu w interakcji z ERES (ER - exit site)



Funkcja aparatu Golgiego

- Białka błonowe i rozpuszczalne, w tym osadnicze, przechodzące przez aparat Golgiego są modyfikowane, sortowane i adresowane
- Wydzielanie szlakiem **konstytutywnym**
- Część białek gromadzi się w wyspecjalizowanych ziarnach wydzielniczych - wydzielanie pod wpływem bodźca - szlak wydzielania **regulowanego**



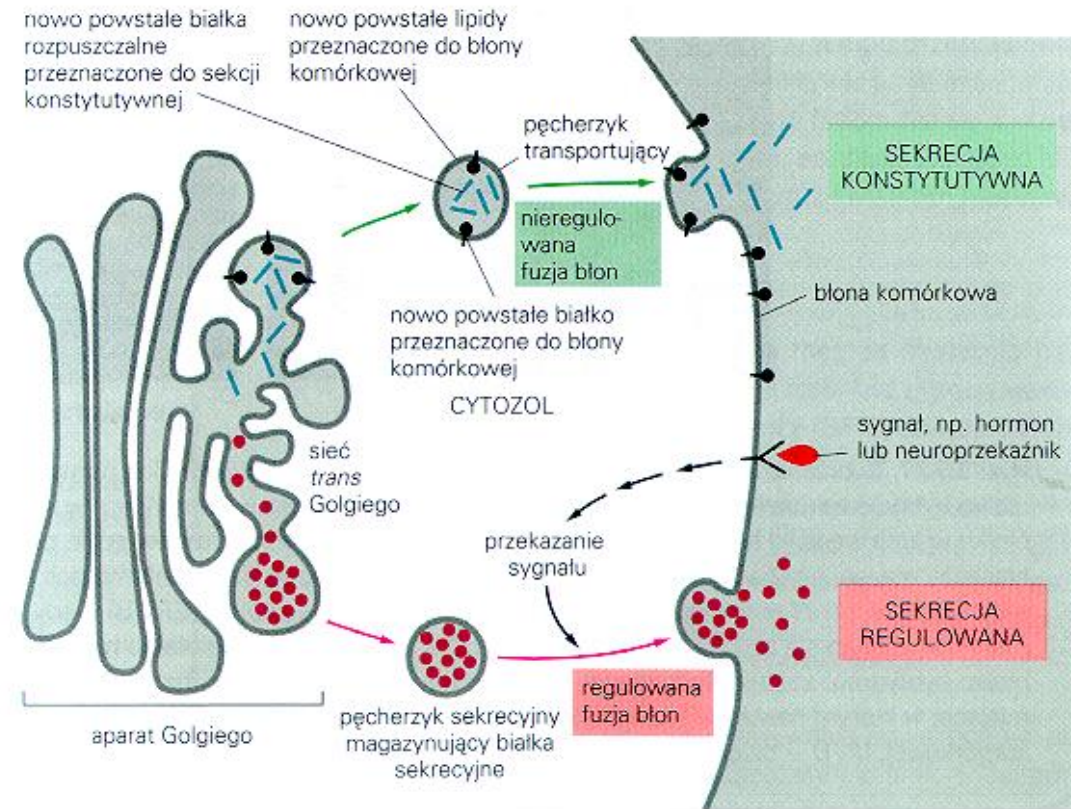
Egzocytoza regulowana i konstytutywna

Konstytutywna

- Lipidy i białka rozbudowującej się błony komórkowej
- Białka stale wydzielane na zewnątrz (sekrecja)

Regulowana

- W komórkach wydzielniczych syntetyzujących hormony, śluz, enzymy trawienne

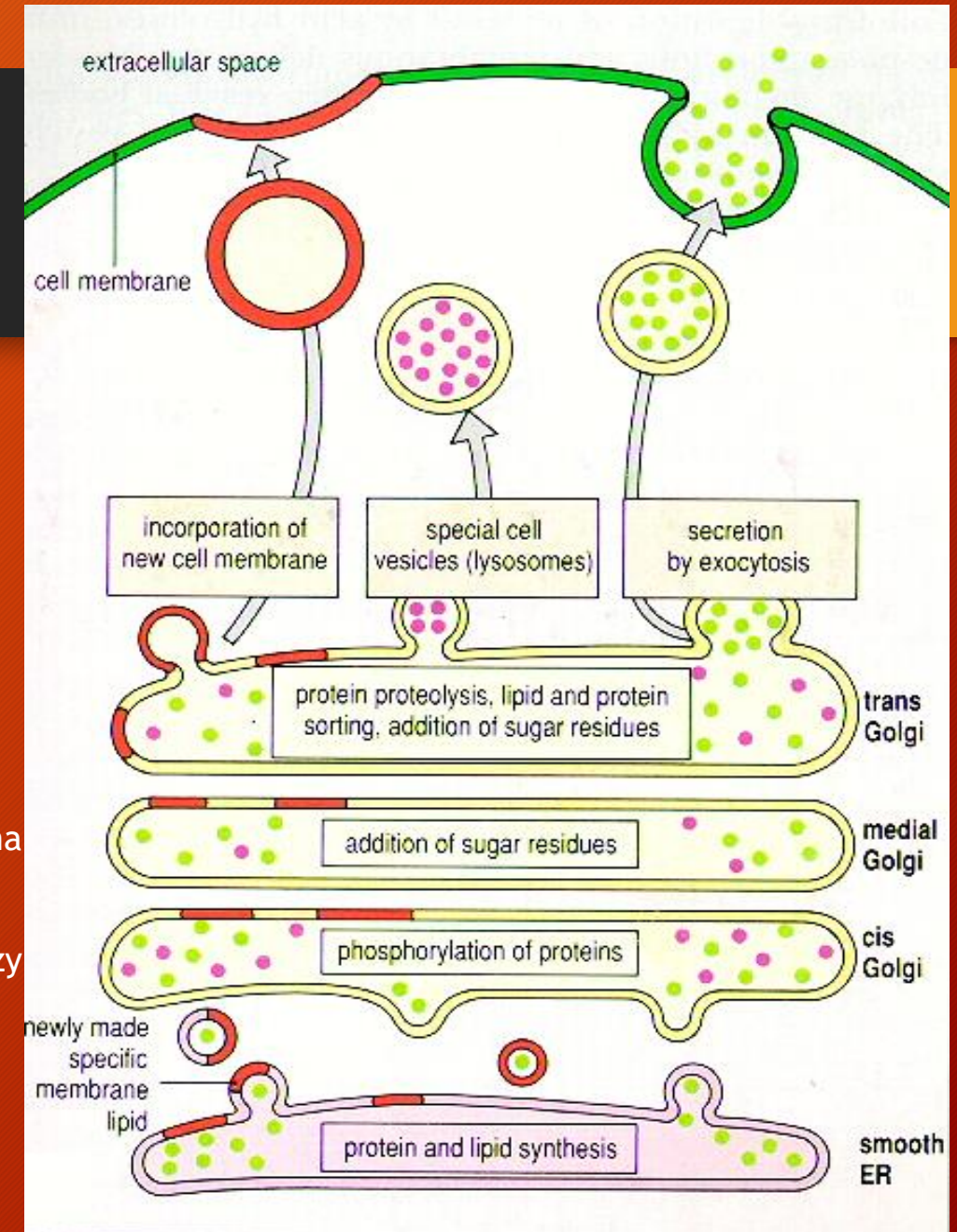


Modyfikacje białek

- Modyfikacje: zmiany kowalencyjne białek, proteoglikanów, glikoprotein.
- Modyfikacja oligosacharydów, O-glikozylacja reszt serynowych i treoninowych, dodawanie grup siarczanowych, fosforylacja

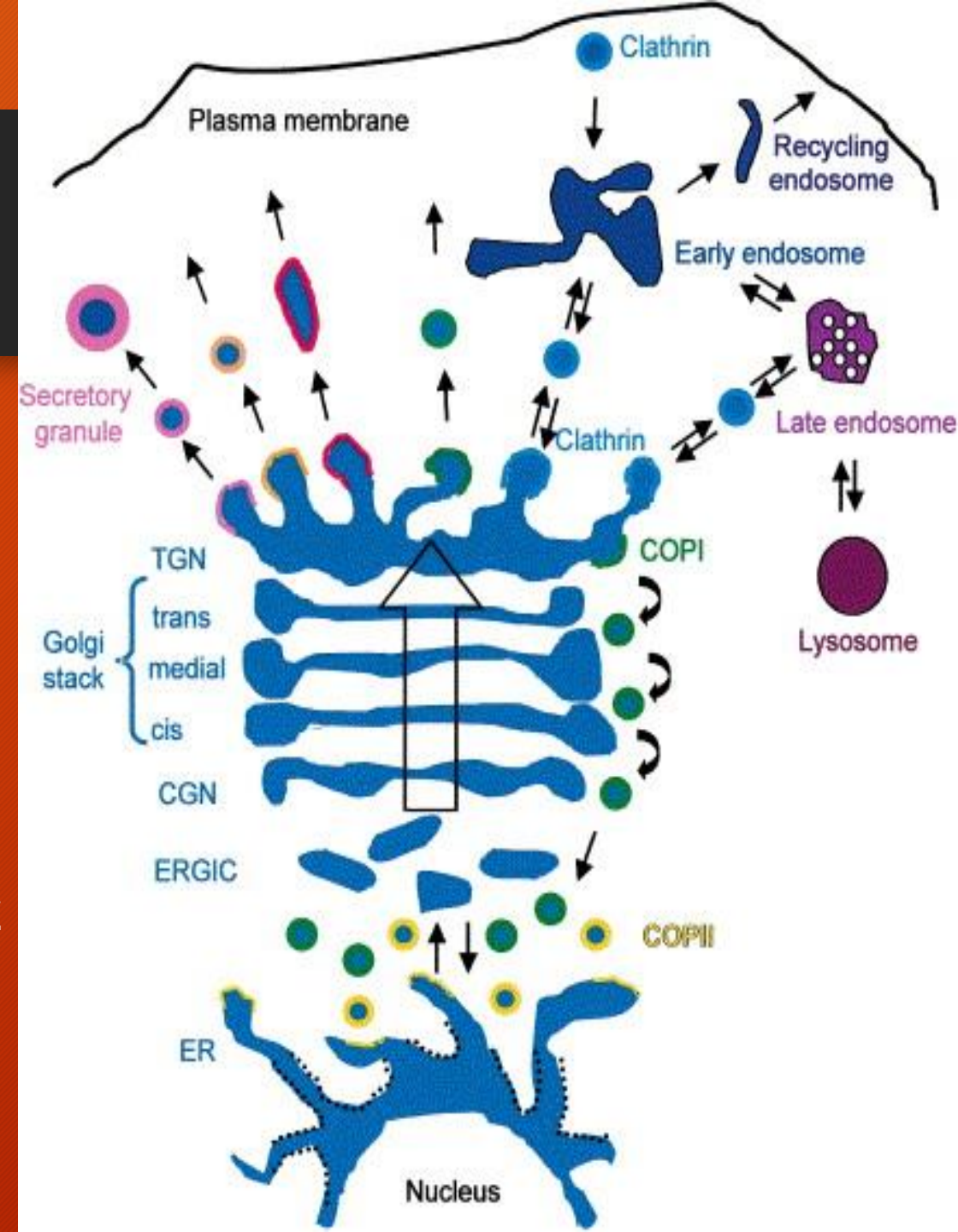
N-acetyloglukozamina

Fosforylacja mannozy



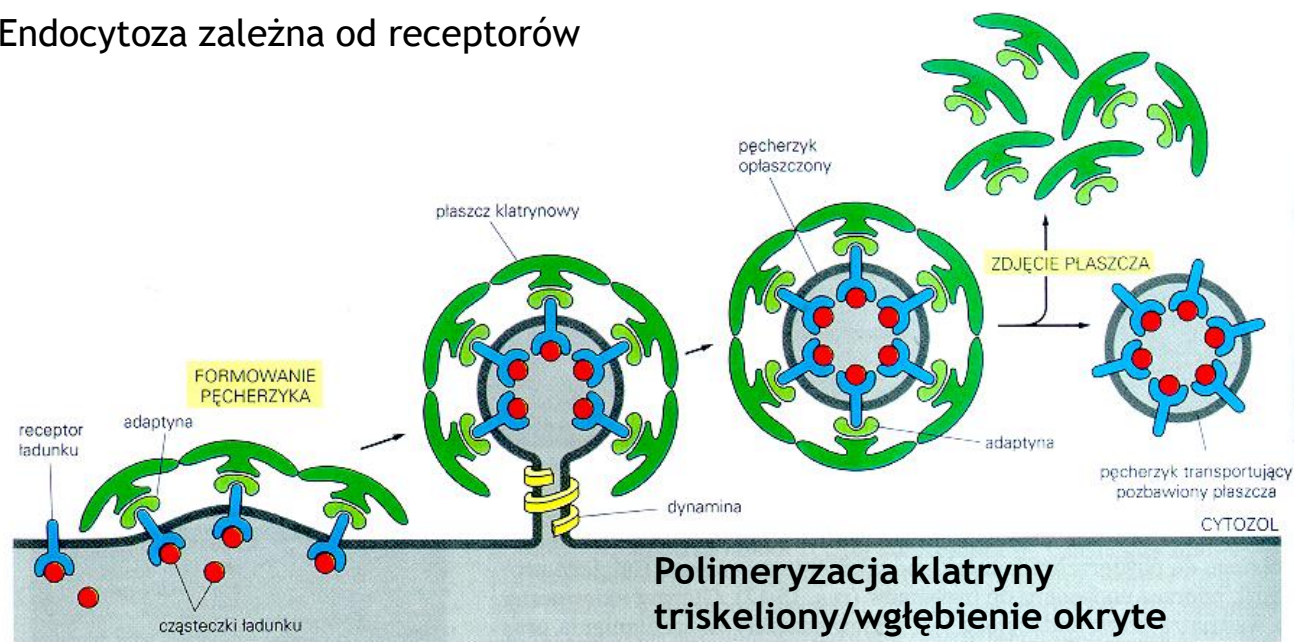
Zależnie od miejsca przeznaczenia, pęcherzyki transportujące białka są odpowiednio znakowane białkami opłaszczającymi.

- Koatomer II (COPII) - pęcherzyki pomiędzy RER a biegunem *cis* (anterograde transport)
- Klatryna - pęcherzyki odpączkowujące od bieguna *trans*
- Koatomer I (COP I) - pęcherzyki powracające z bieguna *trans* - transport wsteczny (retrograde transport)
- Retromer - recyklowane receptory błonowe z endosomów do sieci trans aparatu Golgiego (trans-Golgi network - TGN) - odzyskiwanie receptorów dla M6P



Pęcherzyki opłaszczane

Endocytoza zależna od receptorów



Niektóre typy pęcherzyków opłaszczanych

typ pęcherzyka opłaszczonego
opłaszczony klatryną
opłaszczony klatryną
opłaszczony białkami COP
(coat protein)

białka opłaszczające
klatryna + adaptyna 1
klatryna + adaptyna 2
białka COP TYP 2
TYP 1

pochozenie
aparat Golgiego
błona komórkowa
ER
cysterna Golgiego
aparat Golgiego

przeznaczenie
lizosom (poprzez endosom)
endosomy
aparat Golgiego
cysterna Golgiego
ER

Białka SNARE

- Swoistość transportu pęcherzykowego jest możliwa dzięki obecności swoistych znaczników na powierzchni pęcherzyków, przedziałów macierzystych i docelowych.
- GTP-azy **Rab** (ca 60) specyficznie znakują różne przedziały kom. Wiążą się z błoną i z efektorowymi białkami cytoplazmatycznymi np. motorowymi
- Specyficzne białka **v-SNARE** pęcherzyków są rozpoznawane przez komplementarne białka **t-SNARE** na cytozolowej powierzchni błony docelowej.
- Etapy transportu: pączkowanie, cumowanie (RAB), dokowanie, fuzja (regulowana przez m.in. Rab)

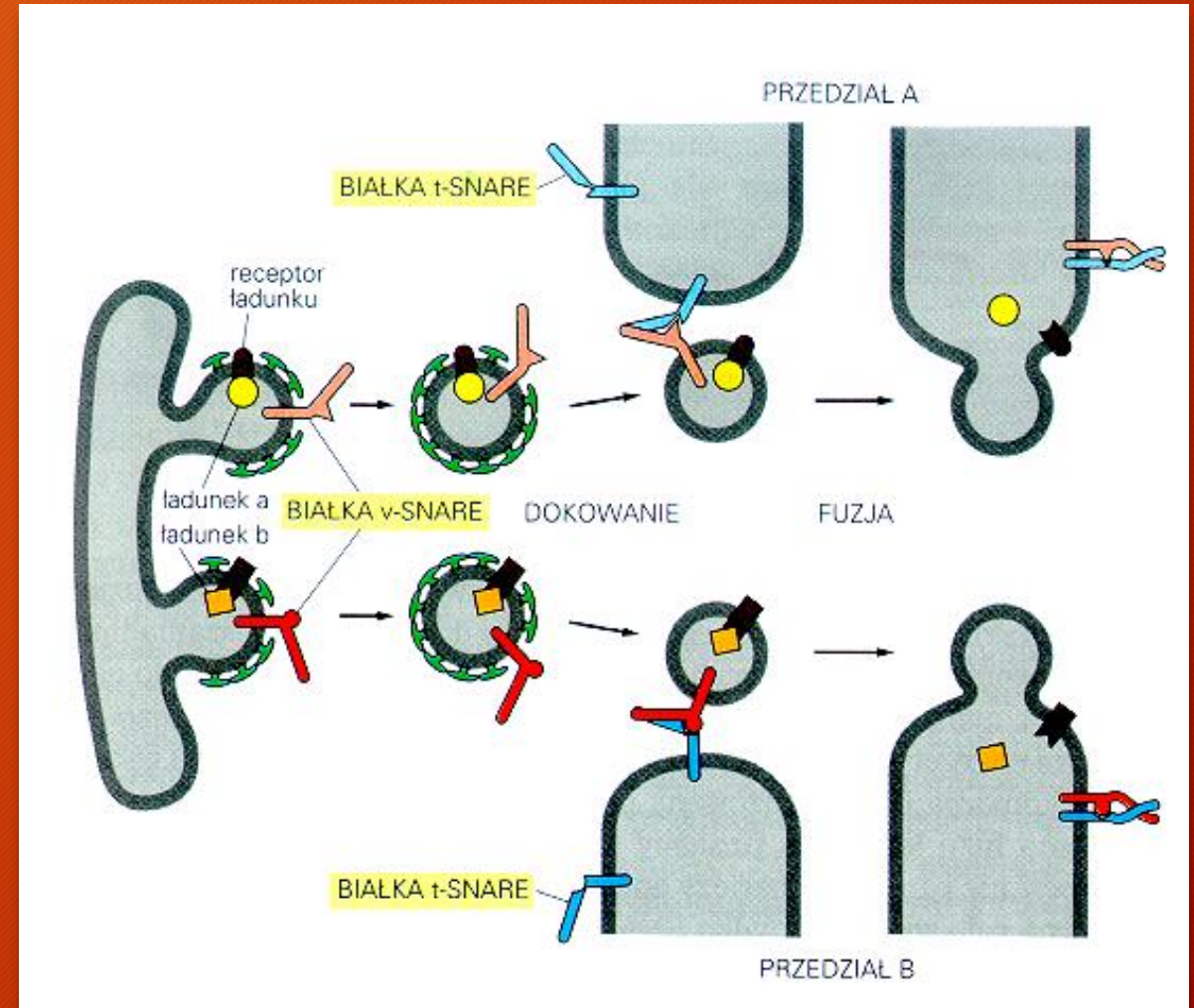
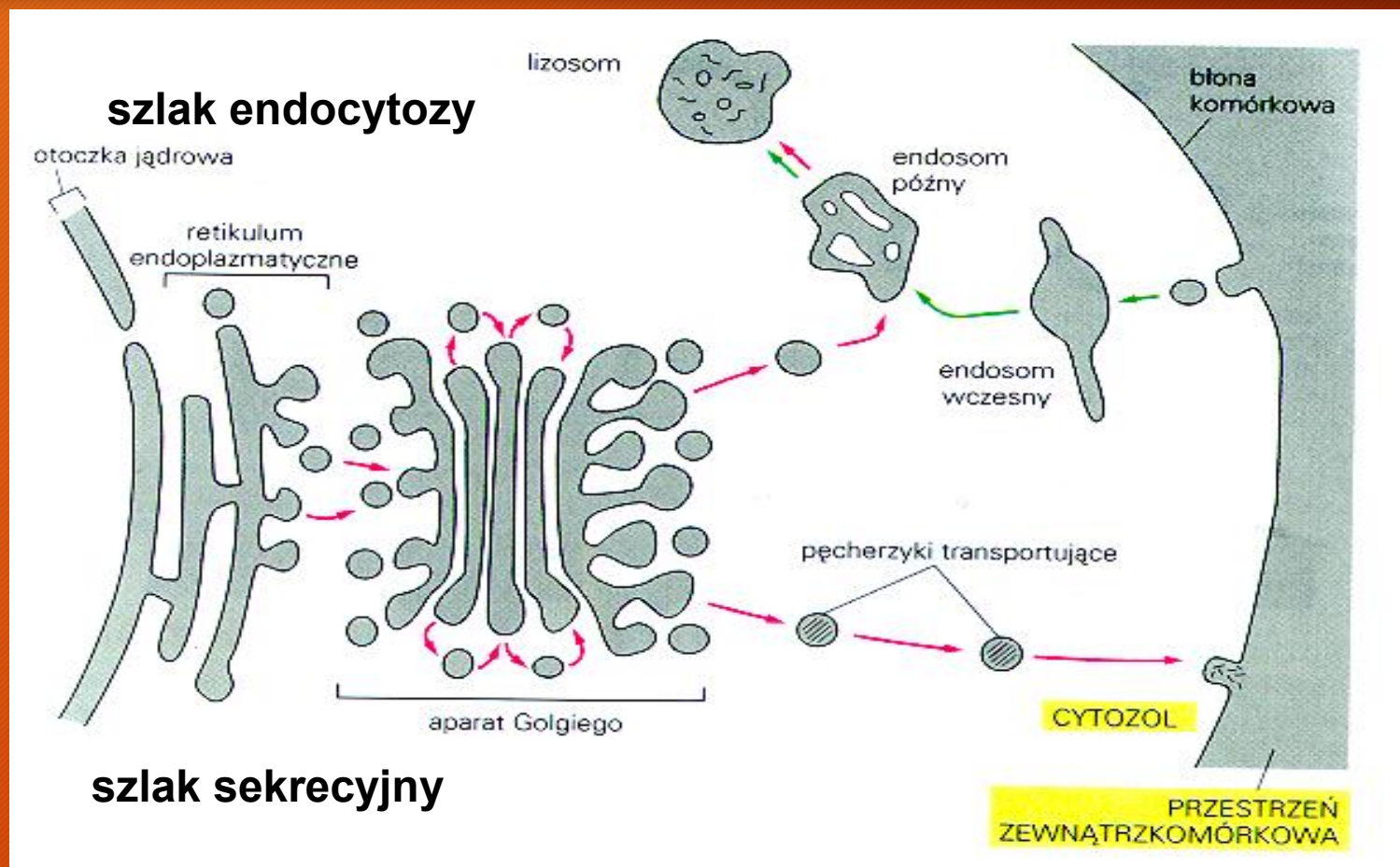
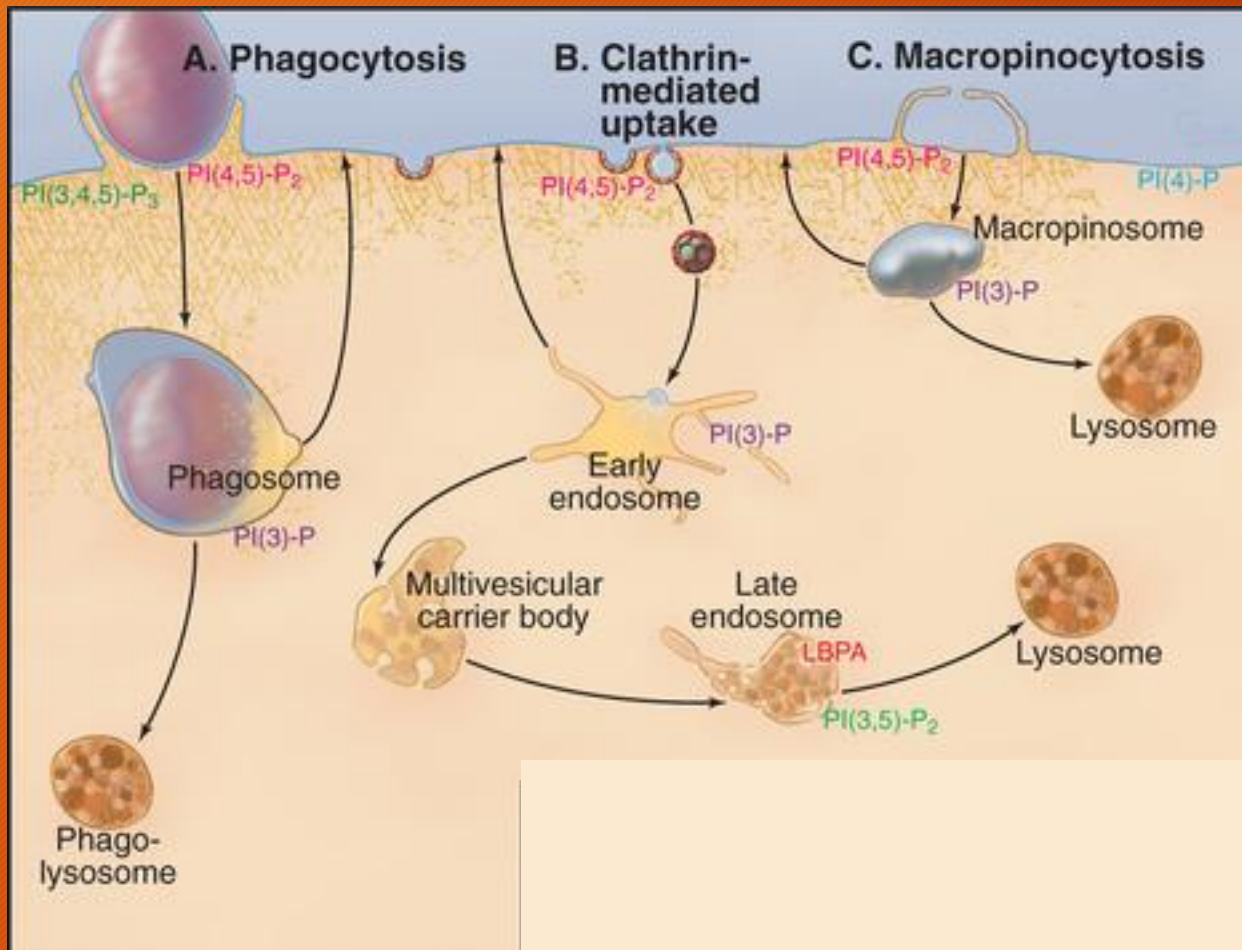


Fig.15-20 Alberts i wsp., Podstawy Biologii Komórki, 2005

Transport pecherzykowy



Endocytoza - system endosomów i lizosomów

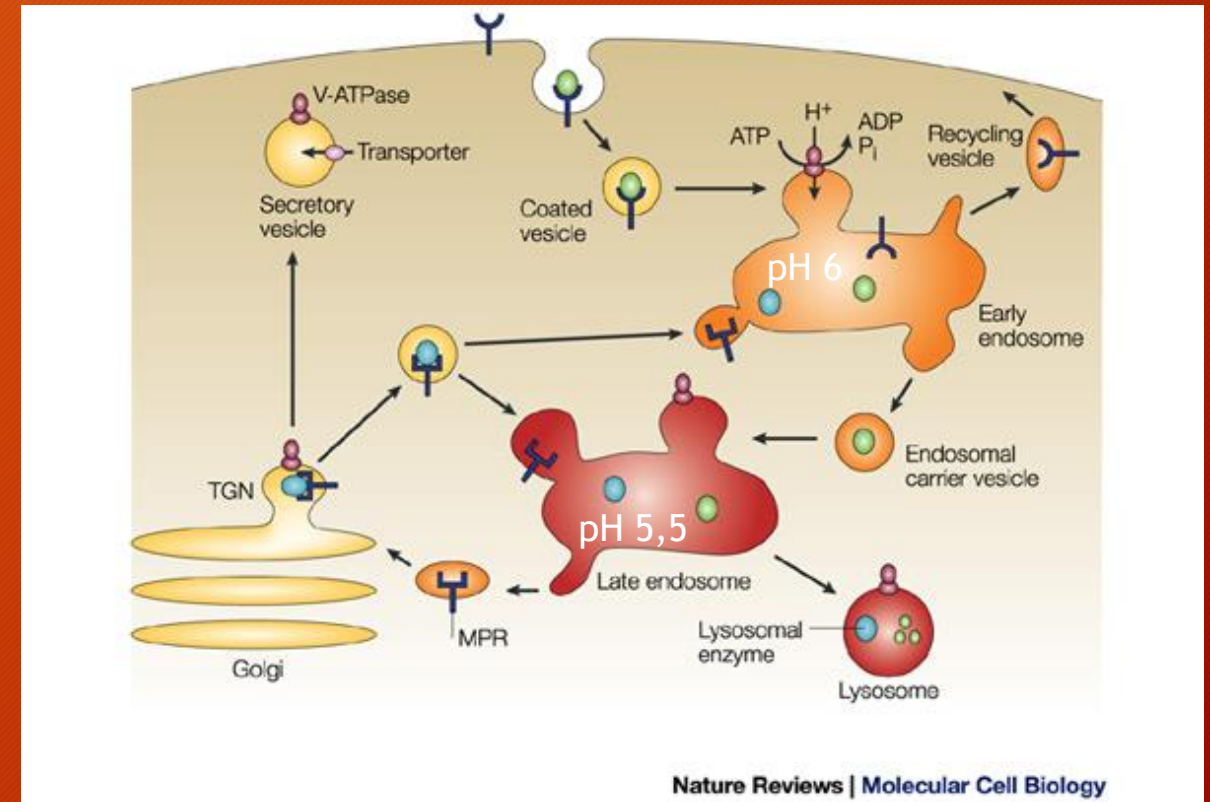


Endosomy - błoniaste struktury cytoplazmatyczne biorące udział w endocytozie, segregacji oraz transporcie cząsteczek.

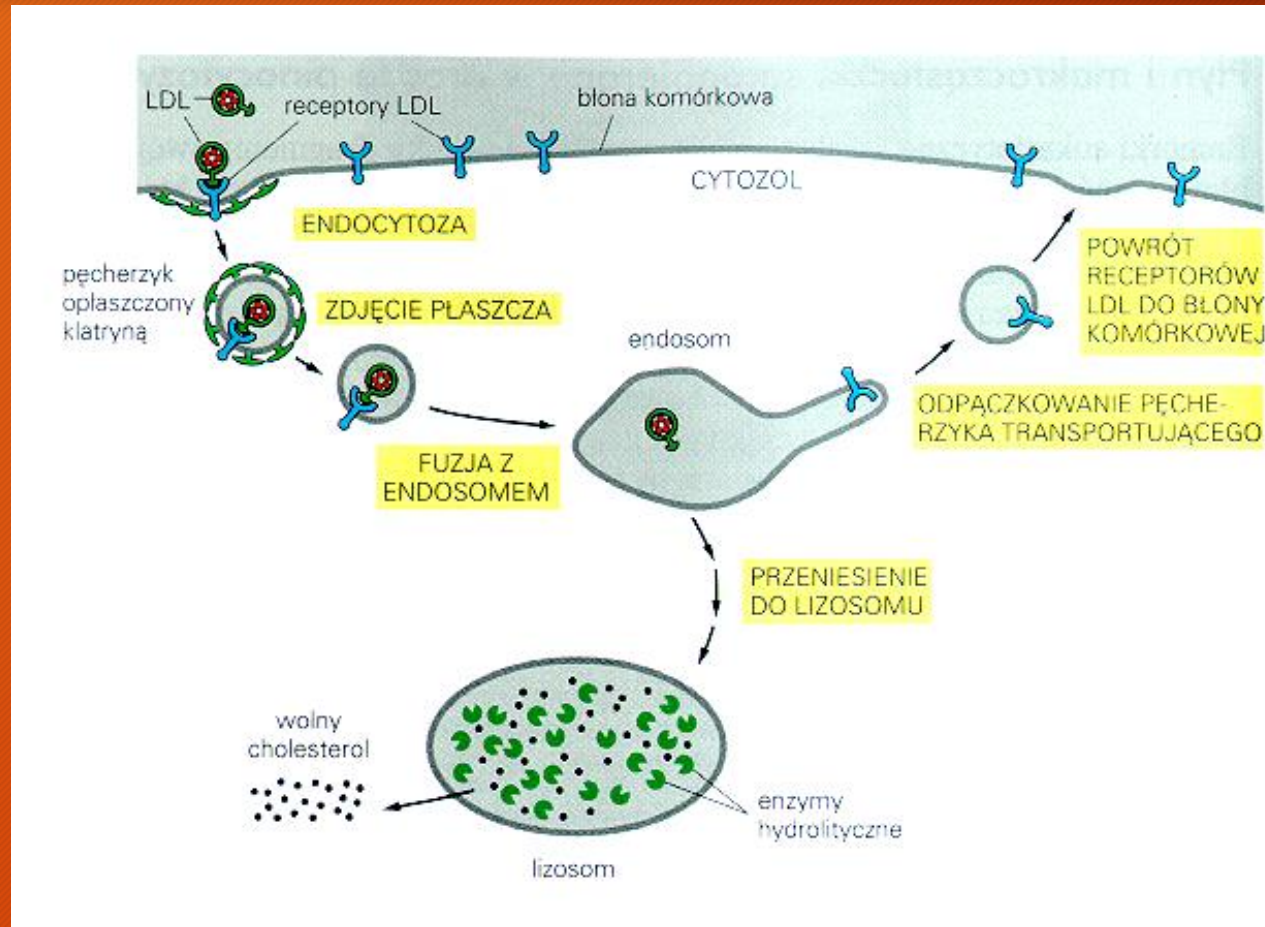
Lizosomy - degradacja

Endosomy

- **Endosomy wczesne** - okolice błony komórkowej, endocytyowany materiał po kilku minutach
- **Ciała wielopęcherzykowe** - formy pośrednie. Liczne wgłobienia formujące pęcherzyki.
- **Endosomy późne** - okolice jądra, endocytyowany materiał po 20 minutach

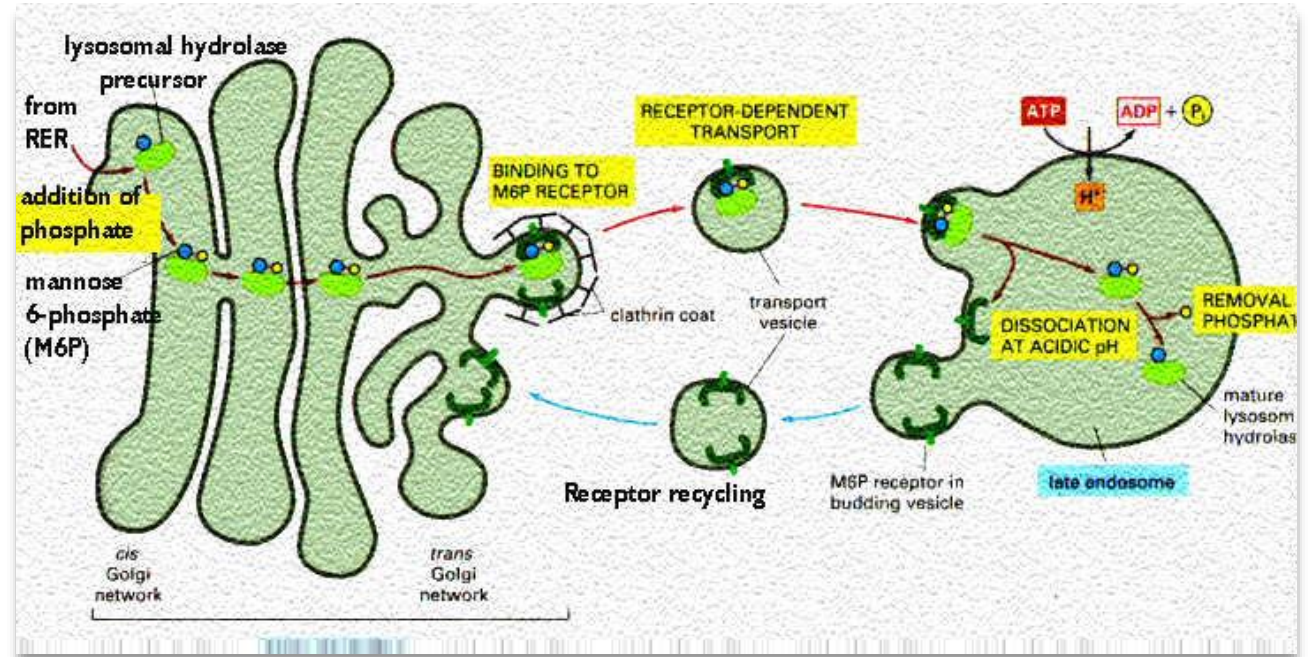


Endocytoza - losy białek receptorowych



Endosomy

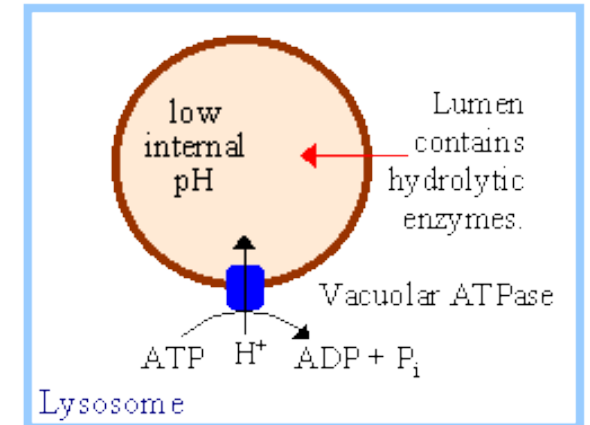
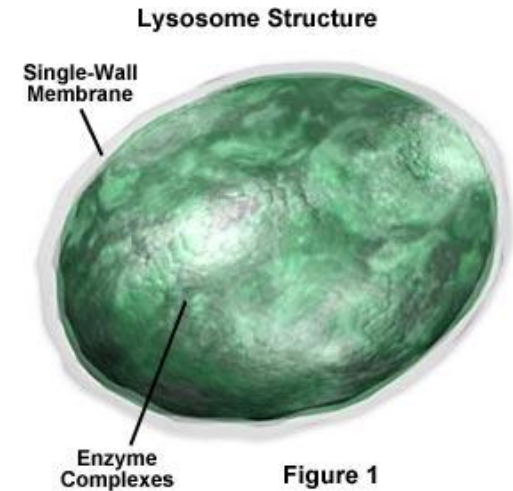
- Błony endosomów zawierają ATP-zależne pompy H^+ , które aktywnie pompują jony do wnętrza pęcherzyka.
- Endosomy zapewniają odpowiednie środowisko do sortowania cząsteczek zanim zostaną strawione przez lizosomy.



Mannozo-6-fosforan (M6P)

Lizosomy

- Zawierają aktywne kwaśne hydrolazy: lipazy, proteazy, fosfatazy, nukleazy, sulfatazy i glikozydazy
- Pompa protonowa - pH 5.0
- Błona przepuszczalna dla produktów hydrolaz



Funkcja lizosomów

- Fagocytoza - wirusy i bakterie
- Autofagia - nadliczbowe albo uszkodzone organelle, agregaty białkowe - ubikwityna
- Endocytoza zależna od receptorów - duże cząsteczki
- Proteoliza dużych, długo żyjących nierozpuszczalnych białek

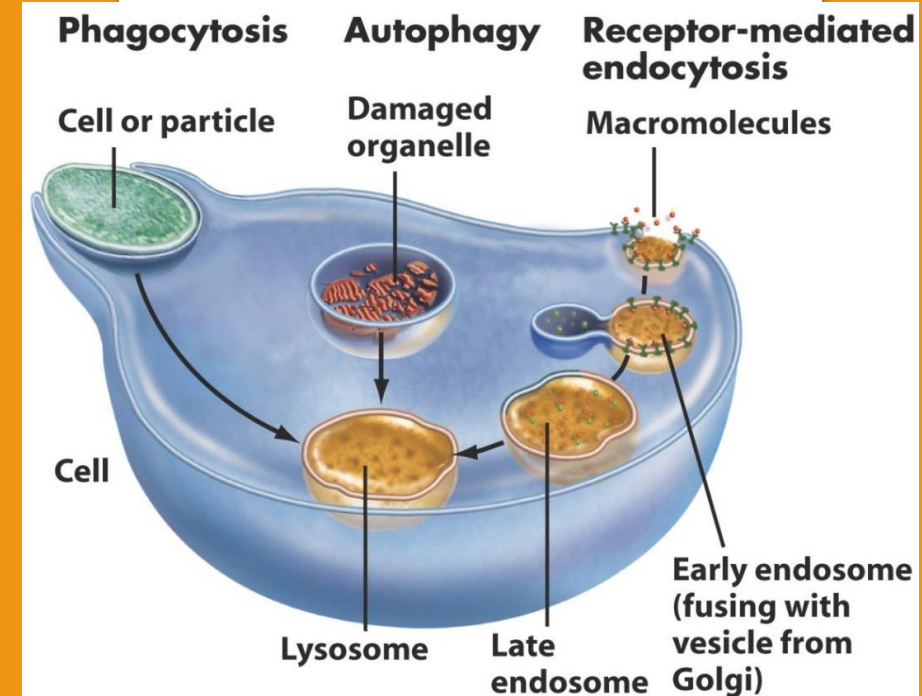
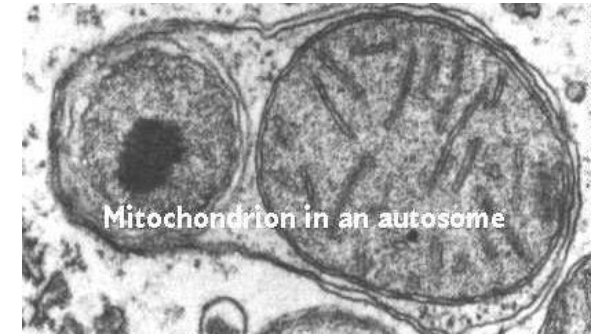
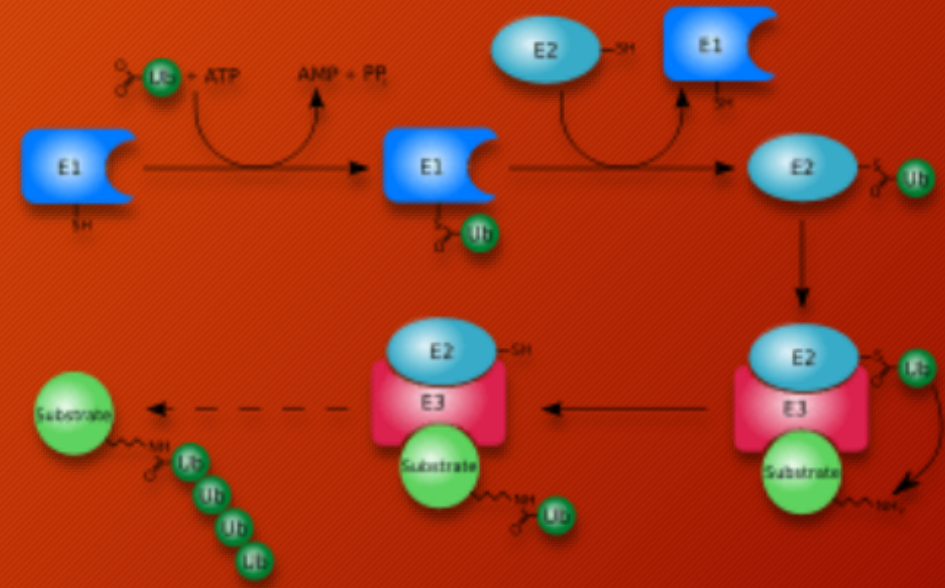


Figure 7-14 Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Ubikwitynacja białek

- Adresowanie i sortowanie białek bywa zależne od swoistych etykiet adresowych np. ubikwityny i białek ubikwitynopodobnych UBL (np. SUMO)
- Monoubikwitynacja, multiubikwitynacja, poliubikwitynacja
- Wiązanie do dowolnej lizyny substratu
- Enzym aktywujący ubikwitynę (E1x2), koniugujący ubikwitynę (E2 >10), ligaza ubikwityny (E3>100)
- Hierarchiczny system ubikwitynacji - precyzja i specyficzność



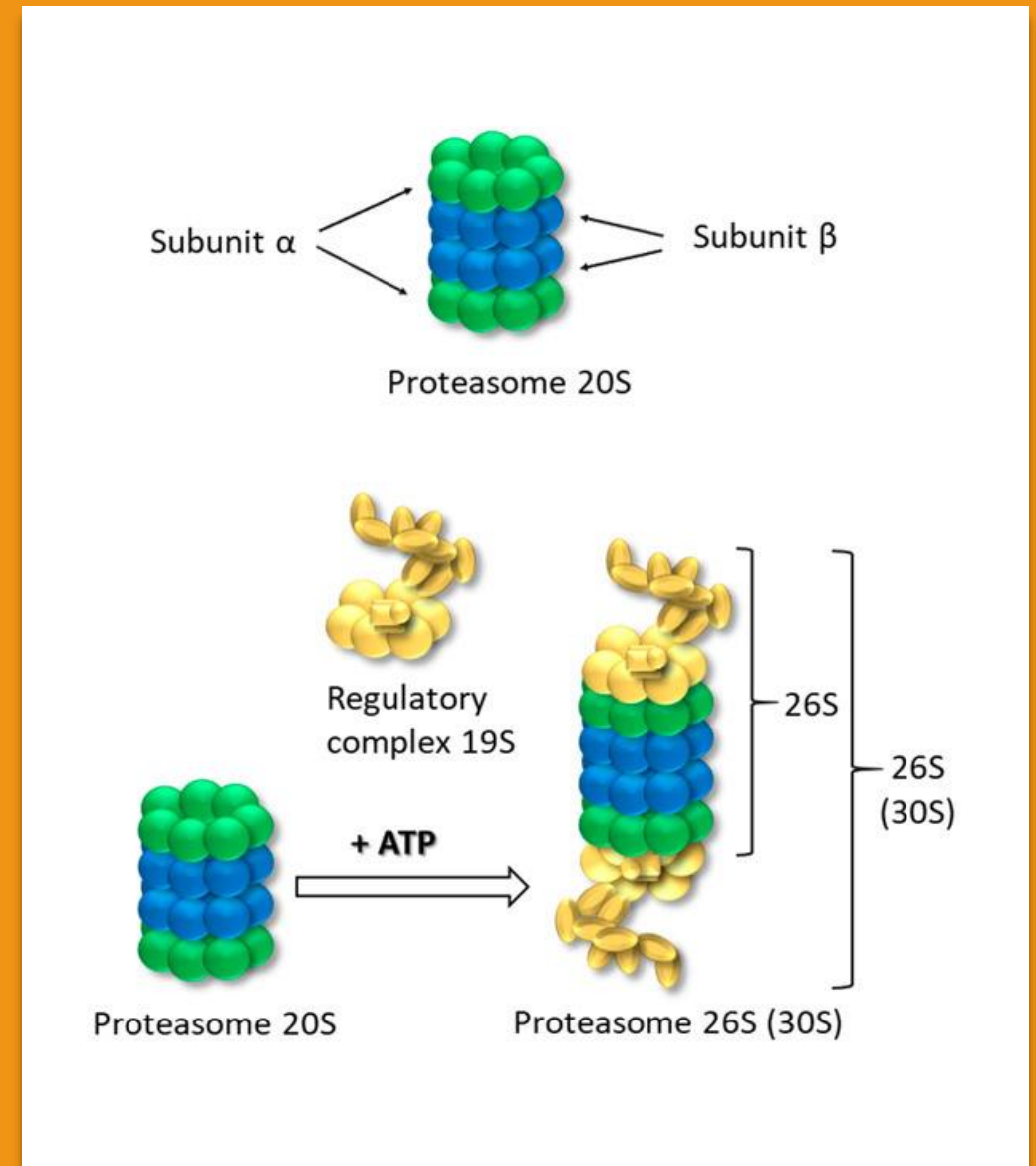
<https://bioexpertnetwork.com/2017/05/31/a-new-tool-to-identify-linear-polyubiquitin-modified-proteins/>

Ubikwitynacja białek

- Przykłady
 - poliU-lizyna48 - proteasom
 - poliU -lizyna63 - endocytoza, naprawa DNA
 - Mono- i multiU - przedziały endosomalne
 - SUMO (białko ubikwitynopodobne) - pory jądrowe, centrosomy, blokowanie ubikwitynacji

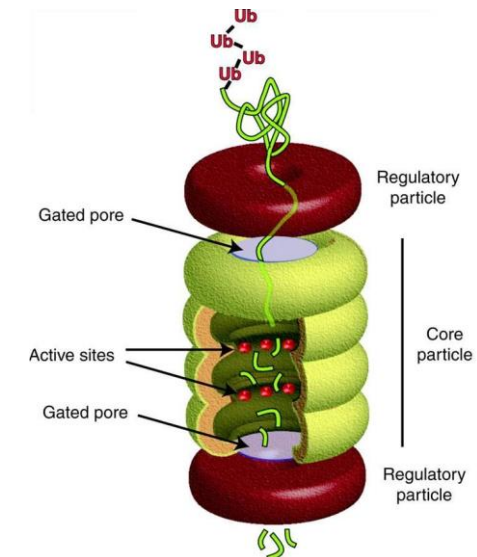
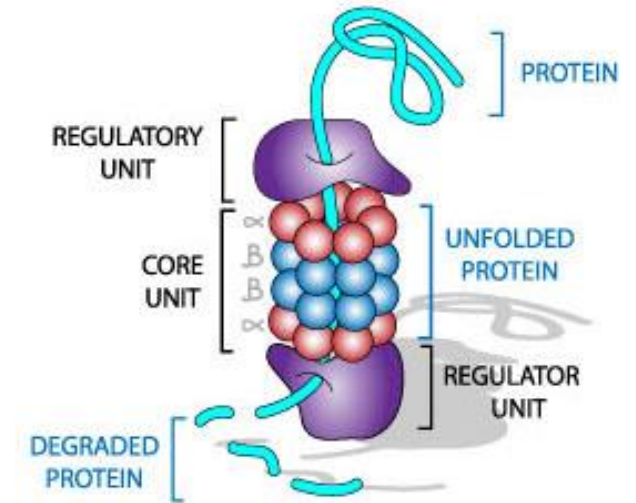
Proteasomy

- Są kompleksami białkowymi 45nm
- Występują w jądrze i cytoplazmie
- Odpowiedzialne za proteolizę niepotrzebnych i uszkodzonych, zle sfałdowanych białek, białek wirusowych
- Degraduje białka o krótkim okresie półtrwania (regulatorowe) i bardziej stabilne strukturalne
- Proteasomy 20S - krótkie peptydy i niesfałdowane białka
- Proteasomy 26S (20S+czapeczka11S) - poliubikwitynowana, sfałdowane białka



Struktura proteasomu

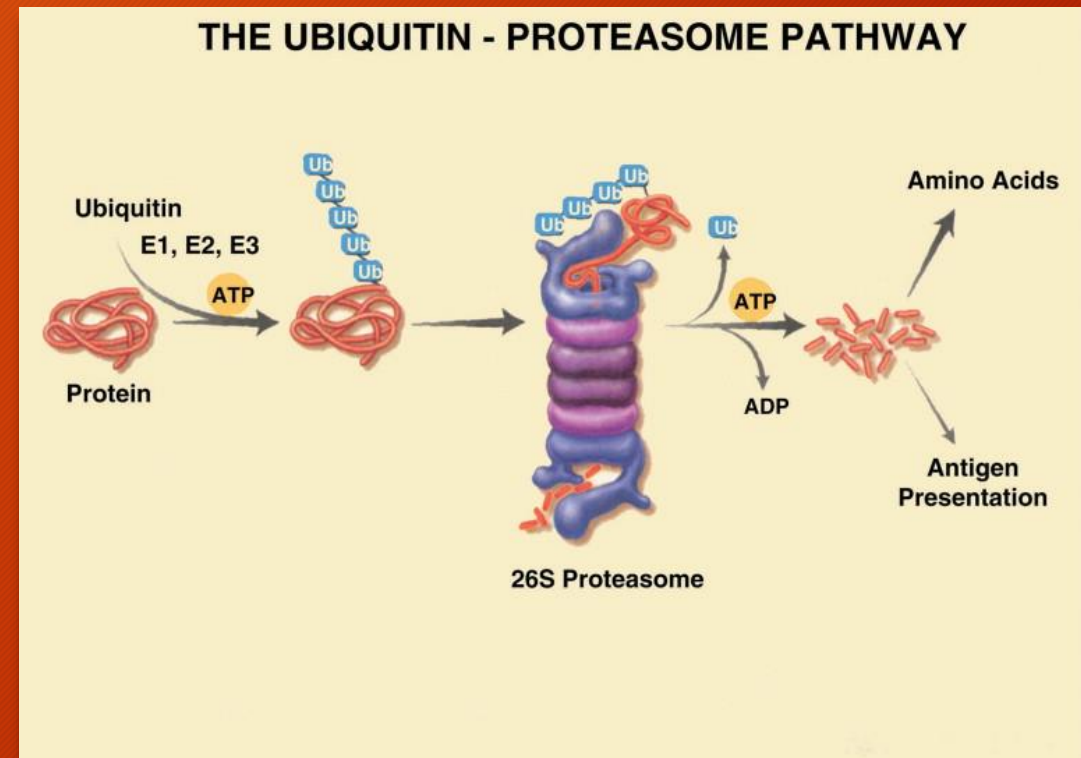
- Cylindryczny kompleks złożony z czterech pierścieni tworzących kanał centralny
- Każdy pierścień składa się z siedmiu podjednostek
- Dwa wewnętrzne pierścienie składają się z siedmiu podjednostek beta - na wewnętrznej powierzchni miejsca aktywne proteazy. B
- Białko docelowe musi przedostać się do kanału centralnego aby ulec degradacji
- Dwa zewnętrzne pierścienie zawierają podjednostki alfa, które stanowią "furtkę", przez którą białka wchodzi do proteasomu
- Aktywator - ATPaza, wiązanie, rozfałdowanie białka, otwarcie kanału, wprowadzenie białka do kanału, odłączenie ubikwityny



Proteasom zawiera centralny cylinder (20S) z aktywnymi proteazami (czerwone kropki)

Produkty proteasomów

- Peptydy 8-15 aminokwasów
 1. Ulegają degradacji przez endo- i egzopeptydazy plazmatyczne
 2. Peptydy są transportowane do RER i prezentowane w kontekście MHC klasy I na powierzchni komórki - rozpoznanie własnych komórek oraz zarażonych wirusem
- Upośledzona proteoliza - agregaty np. Choroba Parkinsona, Alzheimer
- Inhibitory proteasomów - szerokie zastosowanie w onkologii (szpiczak mnogi) - zahamowanie degradacji cyklin



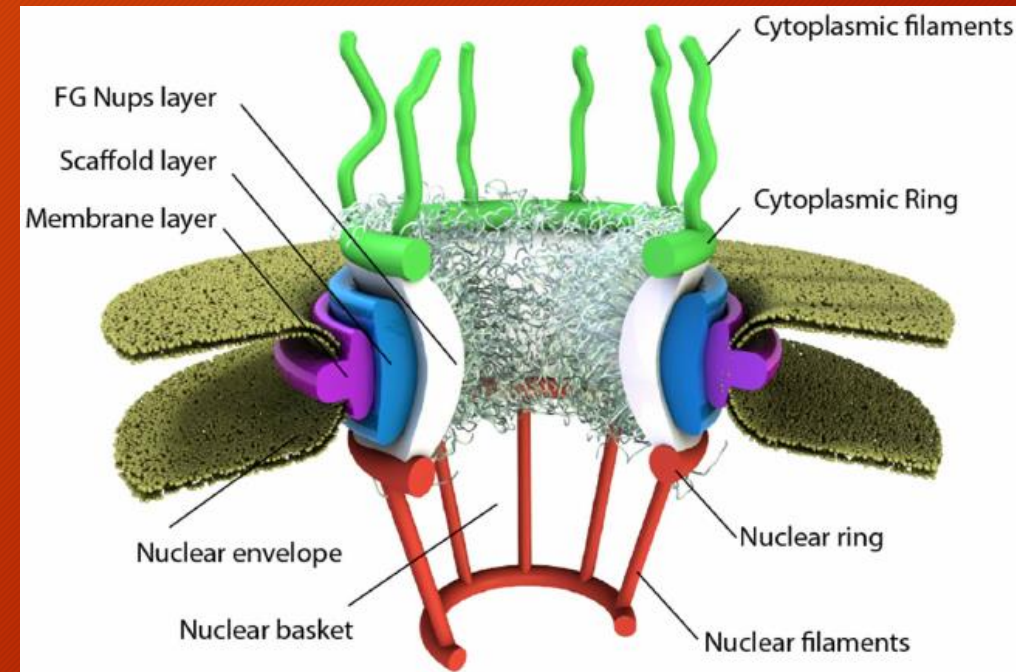
Chemistry & Biology 8 (2001) 739-758

Import białek do organelli

- Transport za pośrednictwem pęcherzyków - wymiana błon
transport w obrębie systemu błon wewnętrznych i błony komórkowej
- Transport przez kompleksy porowe do jądra komórkowego
transport aktywny (GTP), dyfuzja
- Transport przy udziale translokaz
transport z cytozolu do ER, mitochondriów, peroksysomów

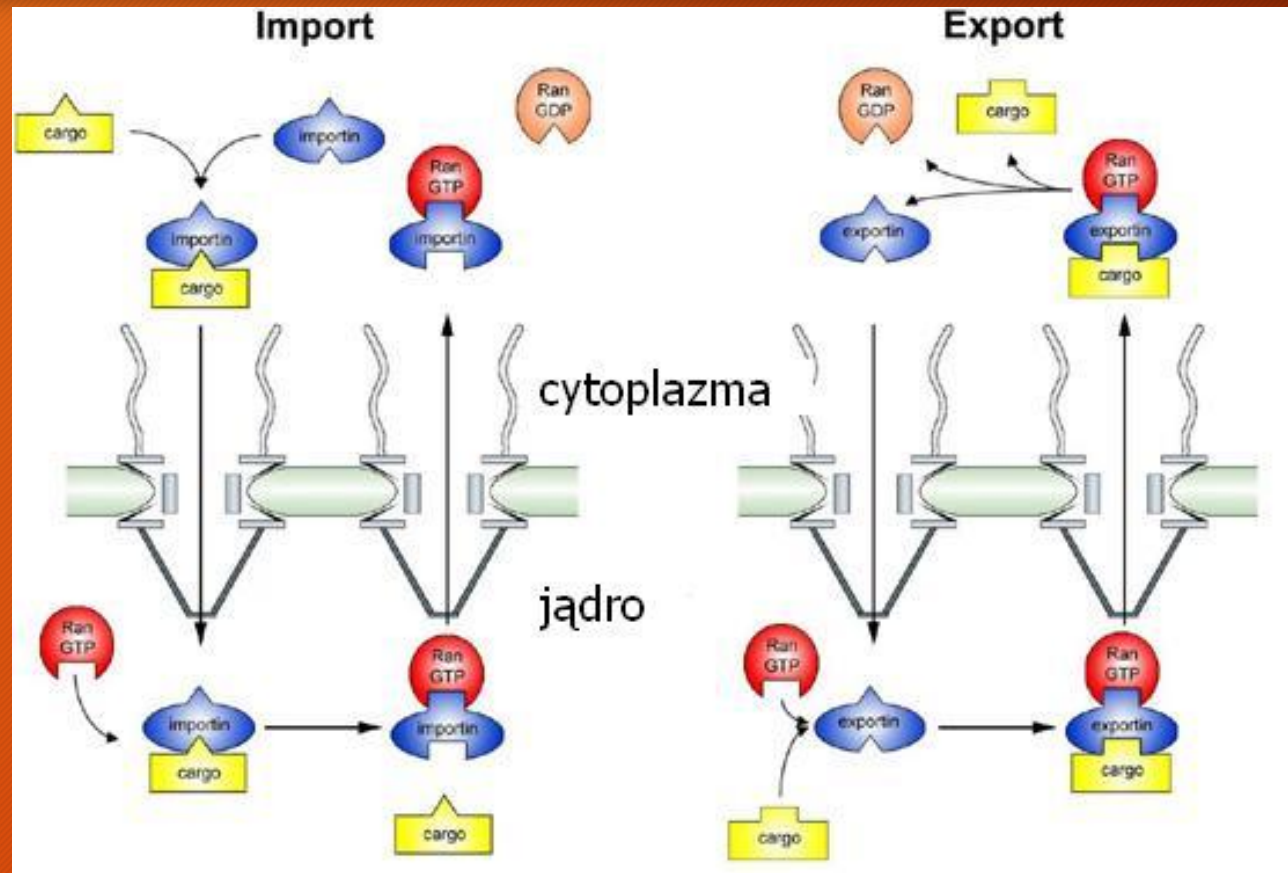
Transport przez pory jądrowe - 3-5 tyś

- Dwukierunkowy
 - białka do jądra - b. rybosomów, polimerazy, histony, TF
 - RNA i podjednostki rybosomowe z jądra
 - bez zmiany konformacji białek (bez rozfałdowania)
 - przy udziale karioferyn - importyn/eksportyn i GTP-azy Ran
- Sekwencje sygnałowe
- NLS (*nuclear localisation signal*) bogate w lizynę i arginę
- NOS (*nucleolar targeting signal*)
- NES (*nuclear export signal*) bogate w leucynę



DOI: [10.1371/journal.pone.0081741](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081741)

Transport przez pory jądrowe



The nuclear pore complex becomes alive: new insights into its dynamics and involvement in different cellular processes
Joachim Köser*, Bohumil Maco*, Ueli Aebi, and Birthe Fahrenkrog

Transport do peroksysomów

- Białka importowane do macierzy peroksysomów mają dwa rodzaje sekwencji sygnałowej PTS (ang. *peroxisomal targeting sequence*): **PTS1 i PTS2**.
- Receptory dla PTS1 i PTS2, to **peroksyna 5 i 7** tworzą kompleks translokacyjny dla sfałdowanych białek z cytoplazmy (ATP)
- Część białek błony peroksysomów w pęcherzykach z ER

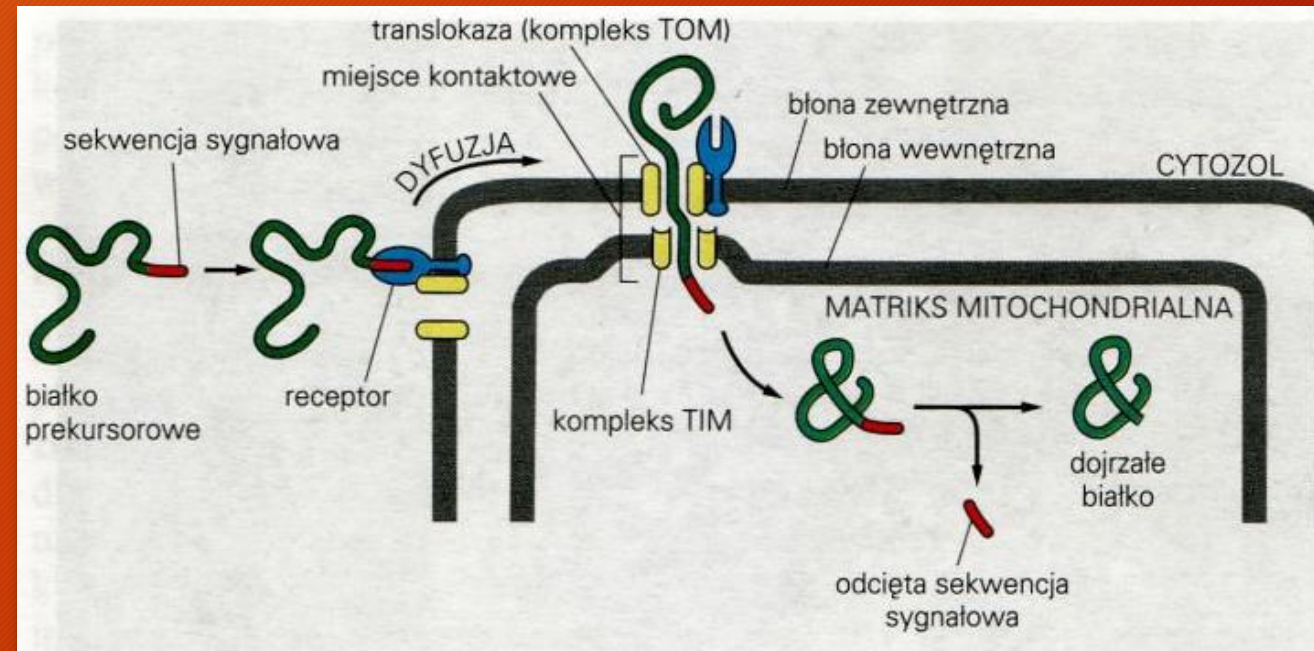
Choroby związane z peroksysomami

Mutacje genów dla peroksyn – zespoły wad wrodzonych

- Zespół Zellwegera – m.in. wady mózgu, niewydolność nerek, marskość wątroby
- Zespół Refsuma – m.in. zapalenie siatkówki, neuropatia nerwów obwodowych, ataksja móżdżkowa

Transport białek do mitochondrium - TOM i TIM (*Translocase of the Outer/Inner Membrane*)

- Mitochondria - własny genom, rybosomy, tRNA
- 5% białek mitochondriów powstaje na ich terenie
- Sekwencja sygnałowa MTS (mitochondrial targeting sequence)
- Białka są transportowane za pomocą translokaz białkowych
- Kompleksy TOM - błona zewnętrzna; kompleksy TIM - błona wewnętrzna
- Chaperony utrzymują białko w stanie rozfałdowanym, odłączane po związaniu z TOM. Po translokacji odcięcie MTS.
- Chaperony - białka opiekuńcze związane z TIM hydrolizują ATP



Dziękuję za uwagę