

Translacja białek eukariotycznych

Marta Koblowska
Zakład Biologii Systemów, UW

Białka – liniowe nierozgałęzione polimery

Aminokwasy, Białka

Niepolarne

| | | | | |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
| UNCHARGED | Glycine Gly G | Alanine Ala A | Valine Val V | Leucine Leu L |
| | Cysteine Cys C | Methionine Met M | Proline Pro P | Isoleucine Ile I |
| POLAR UNCHARGED | Serine Ser S | Threonine Thr T | Tyrosine Tyr Y | Phenylalanine Phe F |
| | Asparagine Asn N | Glutamine Gln Q | Histidine His H | Tryptophan Trp W |
| CHARGED | Aspartic acid Asp D | Glutamic acid Glu E | Lysine Lys K | Arginine Arg R |

Polarne obojętne

Zasadowe i kwaśne

Białka:

- Białka są tworzone z liniowej sekwencji aminokwasów, połączonych wiązaniami peptydowymi - polipeptydy

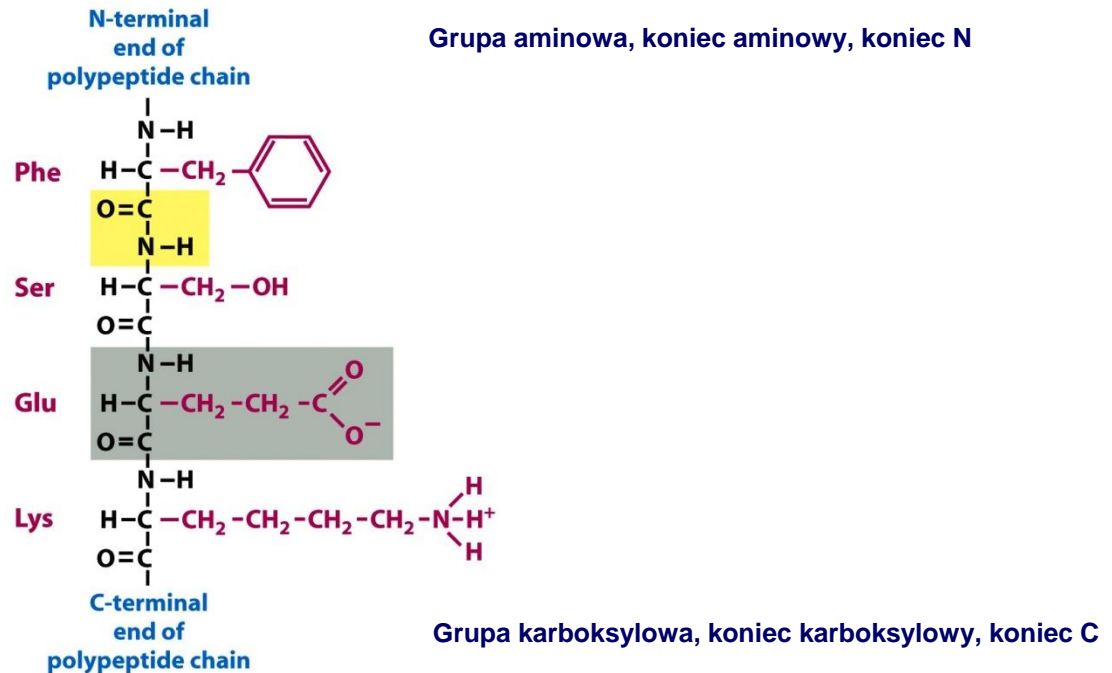
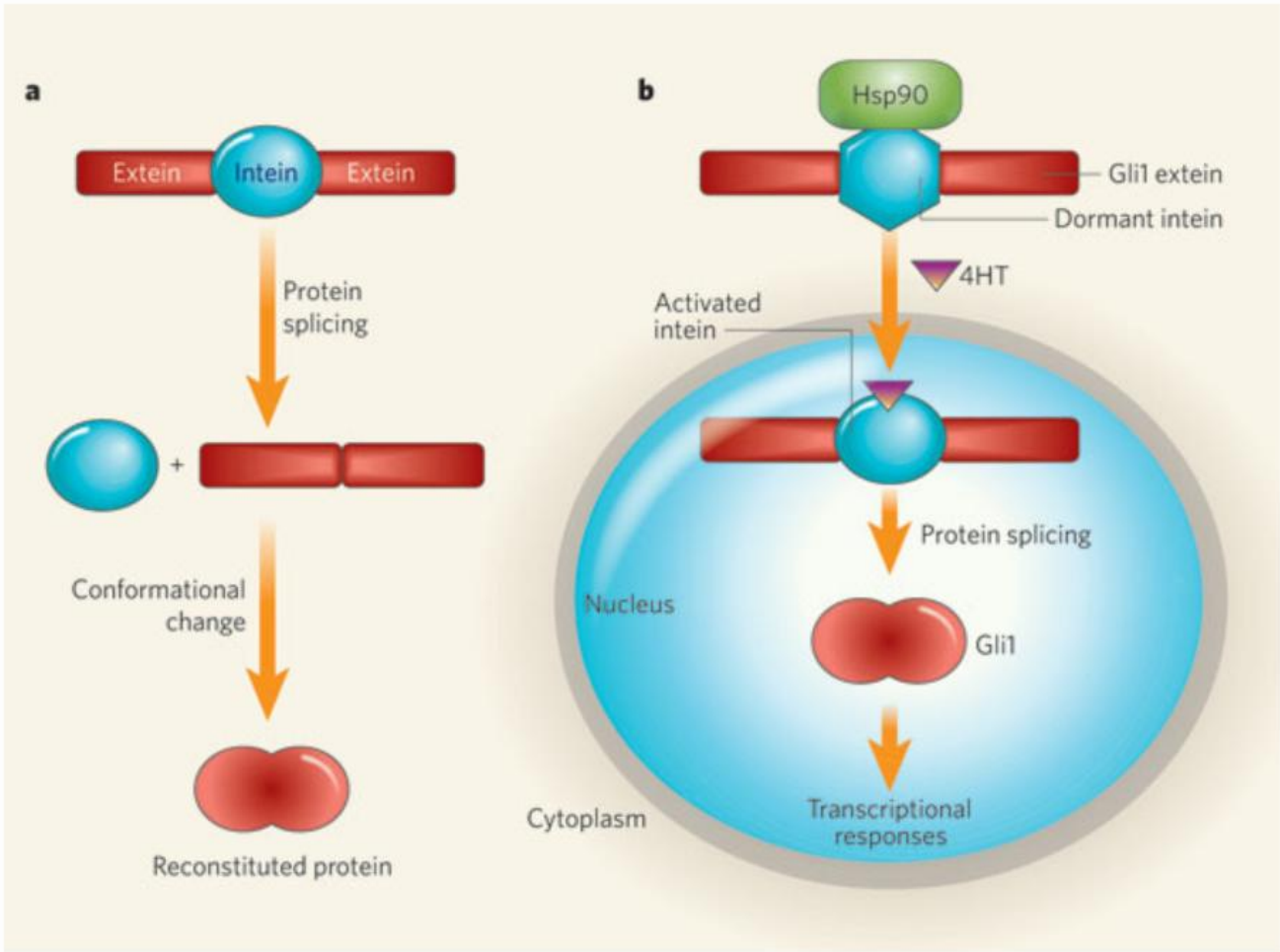


Figure 2-24 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

- Aminokwasy połączone wiązaniami peptydowymi stanowią strukturę pierwszorzędową białka

Splicing białek



4-hydroxytamoxifen (4HT).

Struktura Białka:

Przyjęcie konformacji o najniższej energii swobodnej

- **Struktura Drugorzędowa**

Oddziaływania aminokwasów z ich sąsiadami decydują o strukturze drugorzędowej

Stabilizowane przez:

wiązania wodorowe

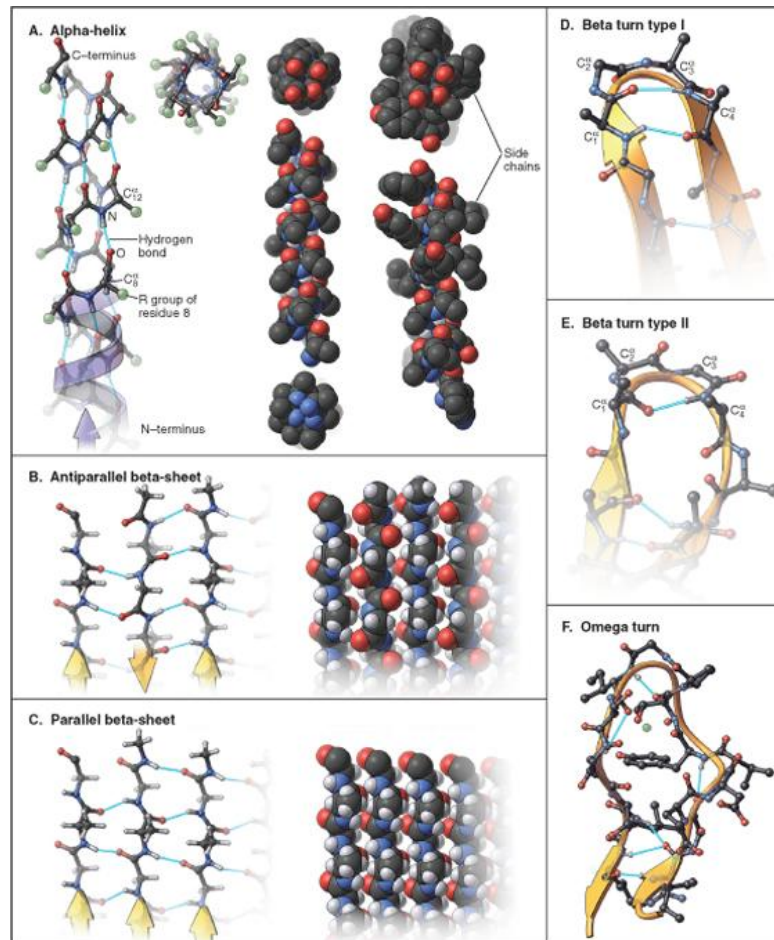
mostki dwusiarczkowe

wiązania van der Waalsa

oddziaływania hydrofobowe

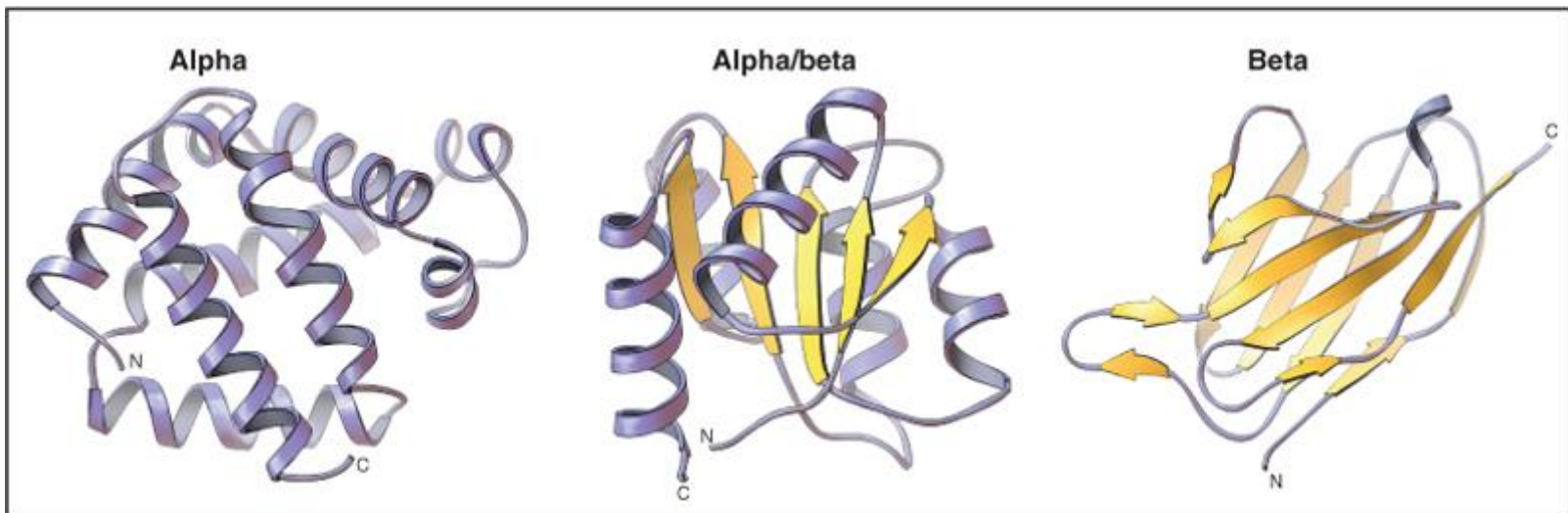
elektrostatyczne

Helisa alfa, harmonijka beta, zwroty



Struktura Białka:

- Trzeciorzędowa – polipeptyd zwinięty w strukturę przestrzenną (wiązania kowalencyjne i niekowalencyjne)

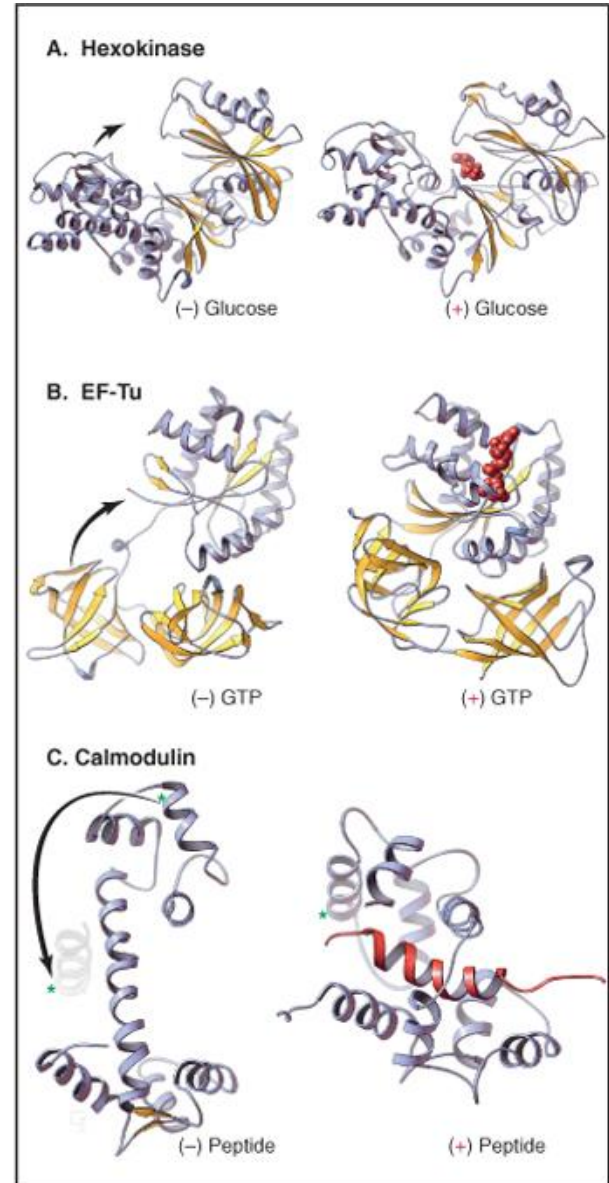
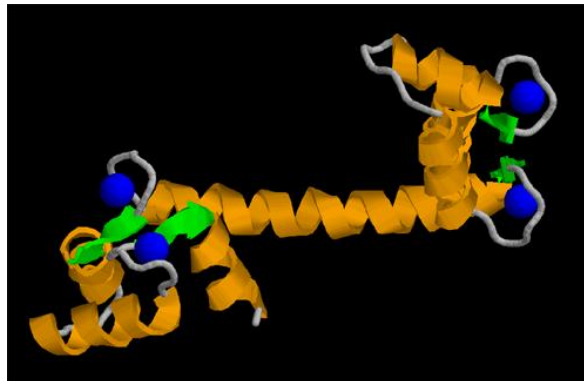


© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

- Czwartorzędowa – kompleksy wielu pojedynczych łańcuchów polipeptydowych

Dynamika białek

- Wiązanie ligandu
- Aktywność wielu białek powiązana z dużymi zmianami konformacyjnymi



Białka opiekuńcze

Termin „**chaperon**” (ang. *chaperone* - opiekun) po raz pierwszy został użyty przez Rona Laskeya w „Nature” (1978 r.) do opisanie nukleoplazminy, czyli białka niezbędnego przy tworzeniu się nukleosomów z histonów i DNA.

Białka, które wiążą się w sposób odwracalny z fałdującymi się polipeptydami i zapobiegają tym samym tworzeniu się nieprawidłowych wiązań.

Ich nieobecność może powodować niewłaściwe łączenie się łańcuchów i ich agregowanie w nierozpuszczalne kompleksy.

Białka opiekuńcze:

- pełnią funkcję katalizatorów
- wspomagają proces samodzielnego fałdowania się łańcuchów
- nie wchodzi one w skład ostatecznego produktu,
- nie przekazują również żadnych dodatkowych informacji na temat konformacji cząsteczki, której kształt determinowany jest jedynie przez sekwencję aminokwasową.

Białka opiekuńcze

- Pomagają przyjmować właściwą konformację białkom w trakcie procesu fałdowania.
- Wiążą segmenty hydrofobowe białek lub zapewniają odizolowane środowisko, najczęściej z użyciem energii.
- Zapobiegają agregacji.
- Oddziałują z intermediami powstałymi w trakcie fałdowania.

- **Białka szoku cieplnego:**
Hsp70, Hsp90
- **Chaperoniny (mitochondrialny Hsp60)**
- **Małe białka szoku cieplnego**
- **Wyspecjalizowane chaperony**

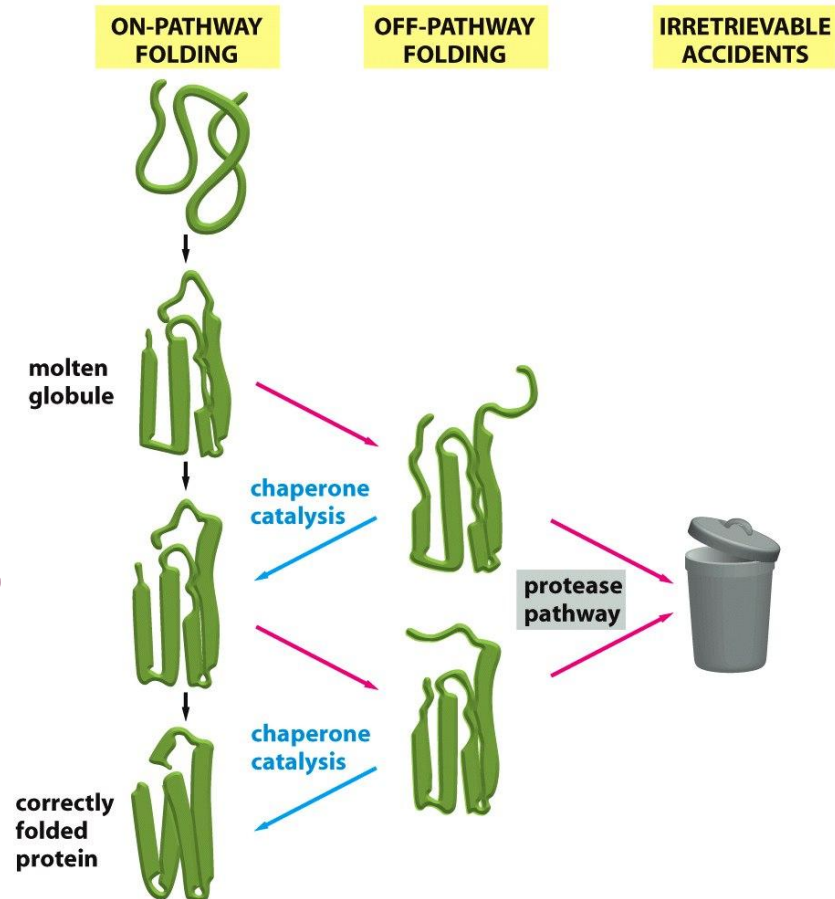


Figure 6-85 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Białka HSP

Dezagregacja białek wrażliwych na stres oraz ułatwianie proteolizy białek uszkodzonych

Większa szansa komórek na przeżycie w warunkach stresu

Indukcja: stres termiczny, stres oksydacyjny, zatrucie metalami ciężkimi, zatrucie alkoholem, inhibitory przemian energetycznych, stany zapalne.

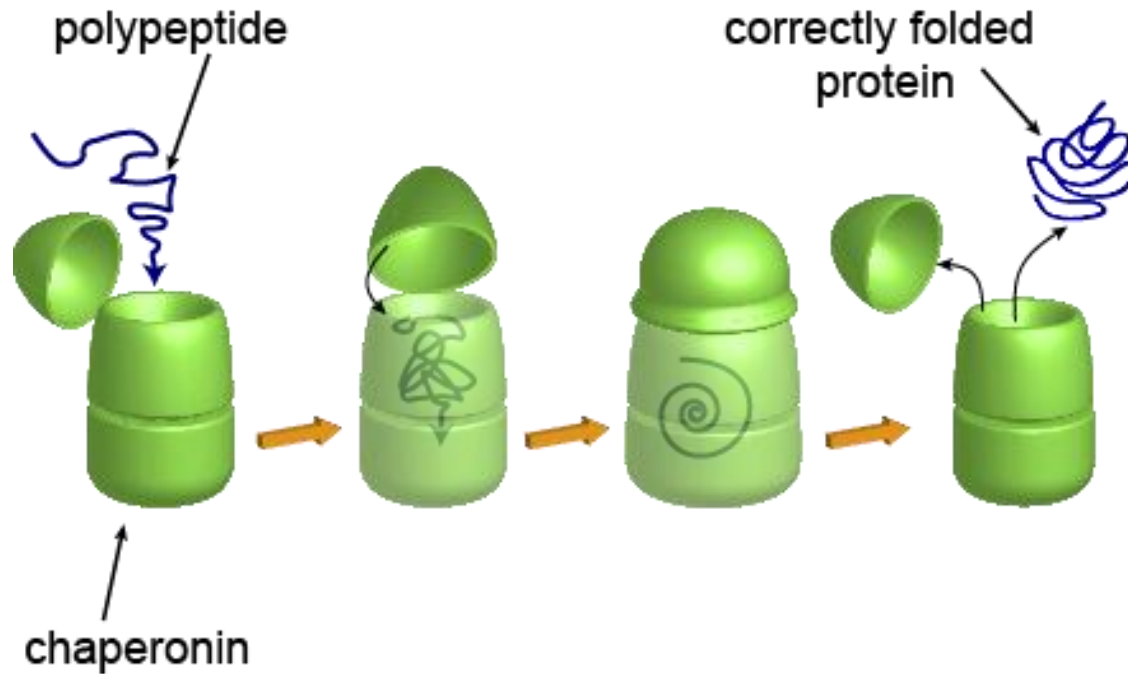
W warunkach normalnych

- regulują podstawowe procesy życiowe komórki,
- biorą udział w fałdowaniu i translokacji białek
- aktywują niektóre białka regulatorowe

Fałdowanie i Modyfikacje białek

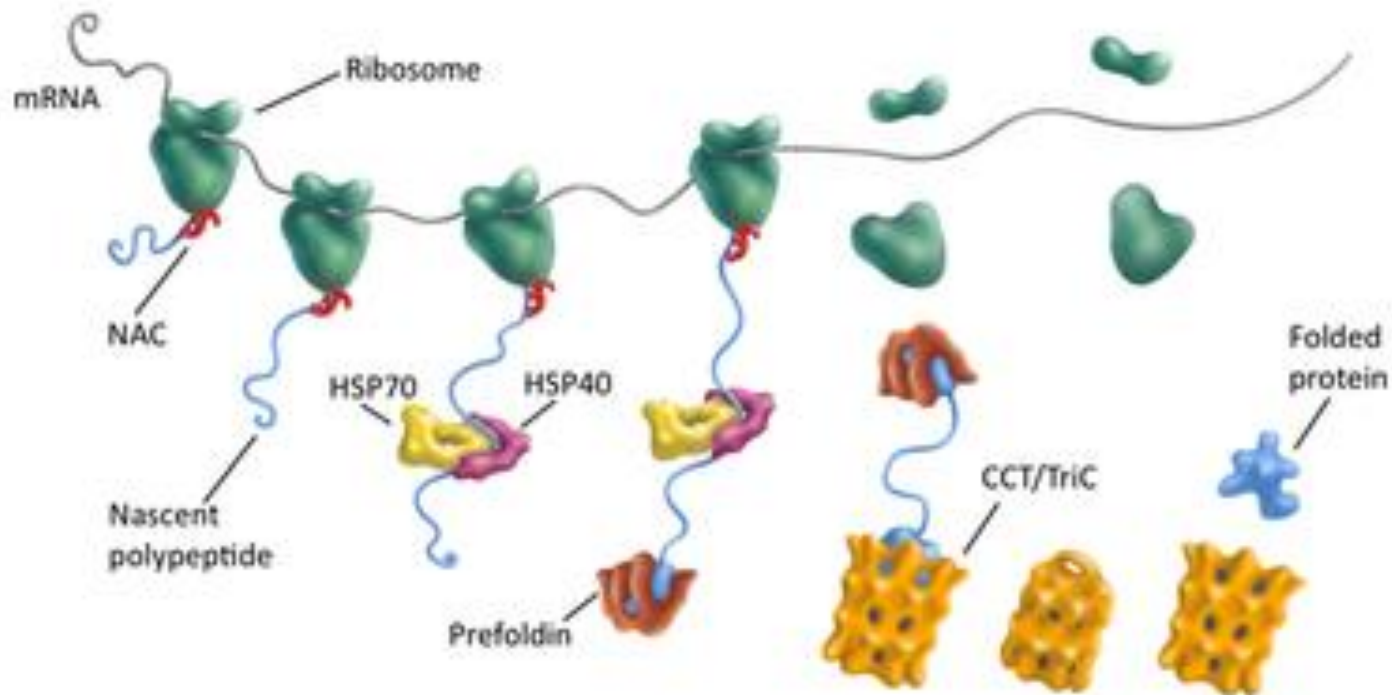
- **Rodzina Hsp70 (70 kDa)** – u człowieka kodowana przez 11 różnych genów położonych na kilku chromosomach, stanowi 1-2% białek w komórce.
- **HSF - czynnik szoku cieplnego**, czynnik transkrypcyjny, który indukuje ekspresję genów HSP70 w warunkach stresu, na indukcję HSP70 wpływają także czynniki regulujące takie procesy jak cykl komórkowy, proliferacja i różnicowanie komórek
- Wykazano nadekspresję białek Hsp70 w neuronach i miocytach mutantów *Cyanorhabdis elegans* o wydłużonym czasie życia.

Białka opiekuńcze - chaperoniny



Współdziałanie chaperonów z rodziny Hsp70 i chaperoniny TRiC

Niesfaldowany polipeptyd jest chroniony przez środowiskiem cytozolu wewnątrz chaperoniny



Hsp90 - najbardziej konserwatywna grupa białek chaperonowych.

Ich ekspresja wzrasta wraz z wystawieniem komórek na działanie stresów.

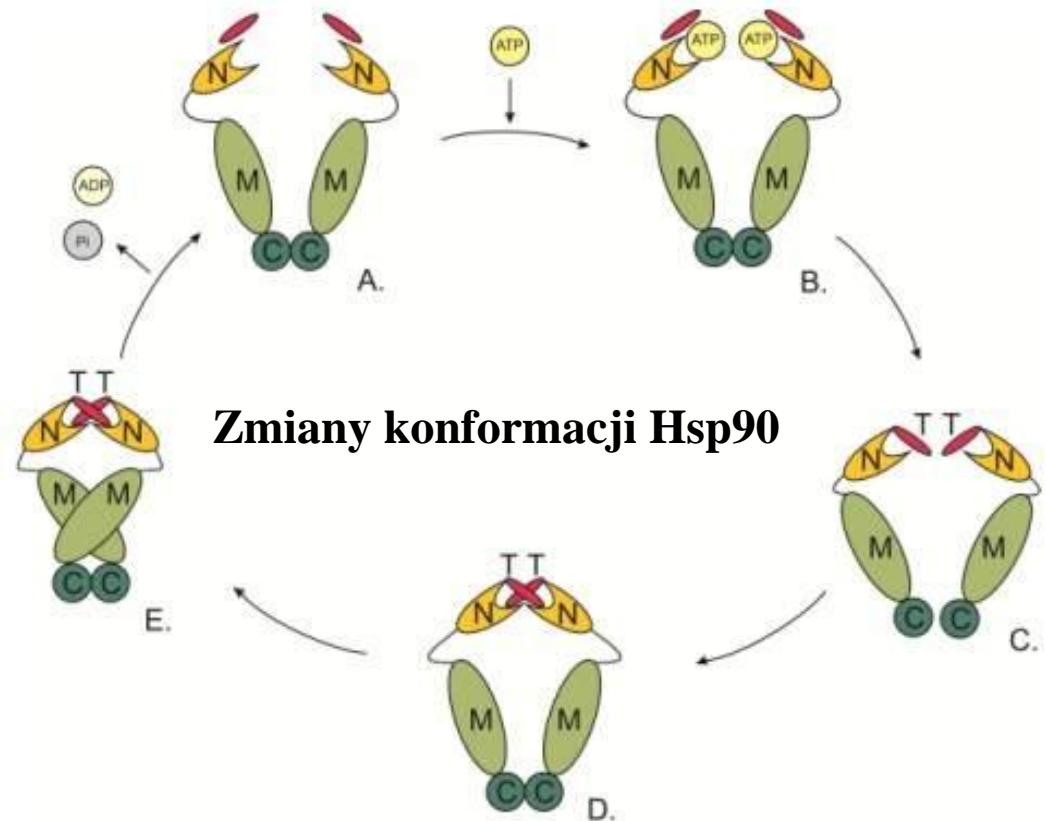
Budowa: trzy konserwatywne domeny: N-koniec – łączący się z ATP, obszar środkowy oraz C-koniec.

Przechodzą zmiany konformacji.

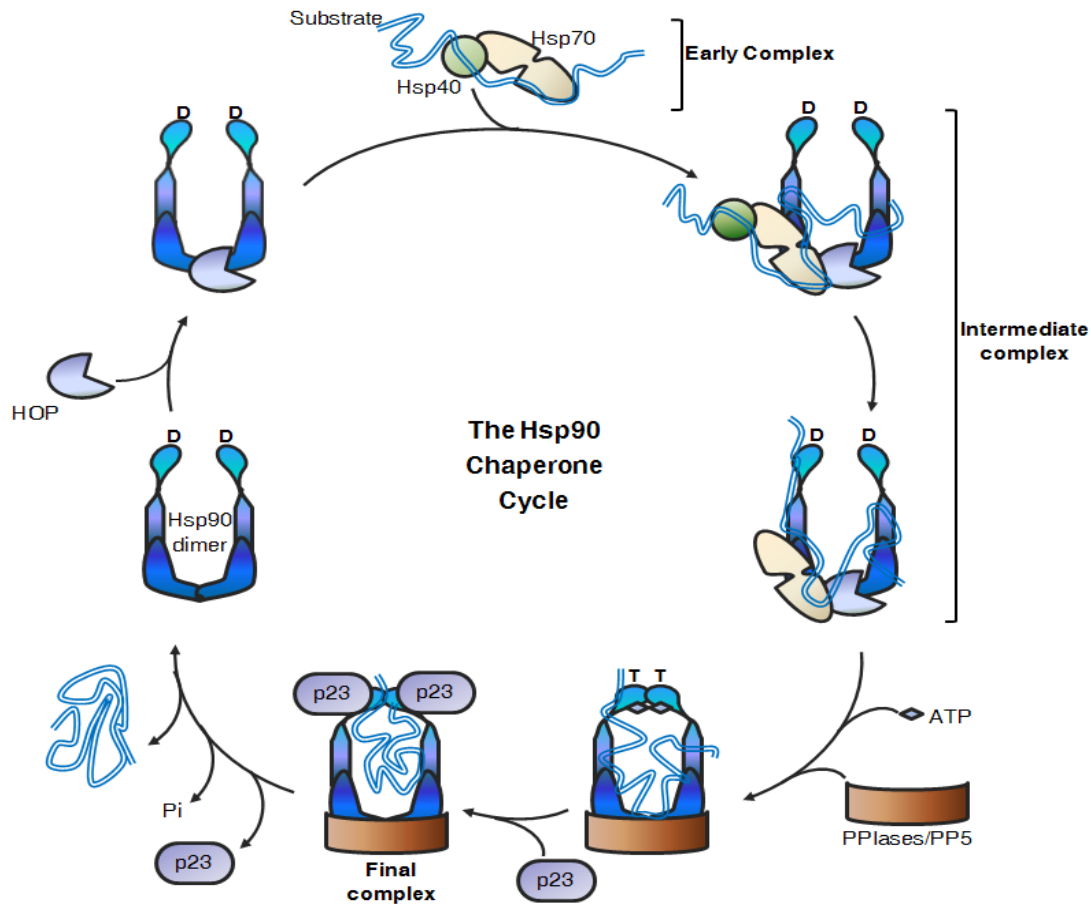
Niektóre z nich wymagają obecności białek pomocniczych, które są odpowiedzialne za regulację aktywności ATPazowej oraz umożliwiają łączenie się chaperonu z odpowiednimi, niesfałdowanymi białkami.

Pod nieobecność ATP, Hsp90 przyjmuje otwartą strukturę dimeru połączonego C-końcami (A). W wyniku przyłączenia ATP (B) zachodzą zmiany w konformacji N-końców, które w efekcie zbliżają się do siebie (C) i krzyżują (D). Hsp90 przyjmuje skreconą strukturę zdolną do hydrolizy ATP. Po hydrolizie powraca do otwartej struktury.

Poziom hydrolizy ATP zależy od rodzaju białka.



Funkcjonowanie HSP 90

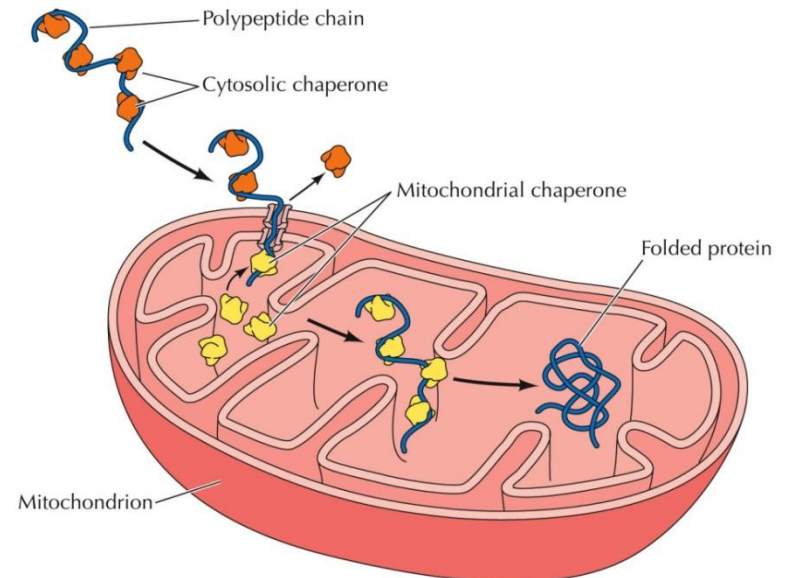
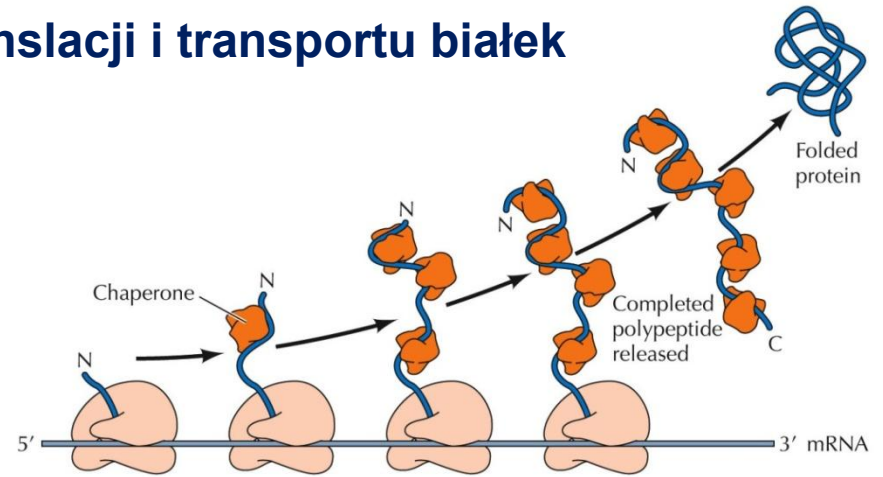


Fałdowanie i Modyfikacje białek

Funkcje białek opiekuńczych podczas translacji i transportu białek

Niektóre białka opiekuńcze wiążą się do powstającego polipeptydu w trakcie jego syntezy na rybosomach, w ten sposób **zapobiegają niewłaściwemu fałdowaniu białka lub powstawaniu agregatów** z części polipeptydu, który powstaje zanim synteza zostanie zakończona

Chaperony **stabilizują** niesfałdowane białka podczas ich transportu do docelowych organelli



Fałdowanie i Modyfikacje białek

- Mostki dwusiarczkowe wzmacniają strukturę białka, przyspieszają fałdowanie, pełnią również inne funkcje „regulacyjne”

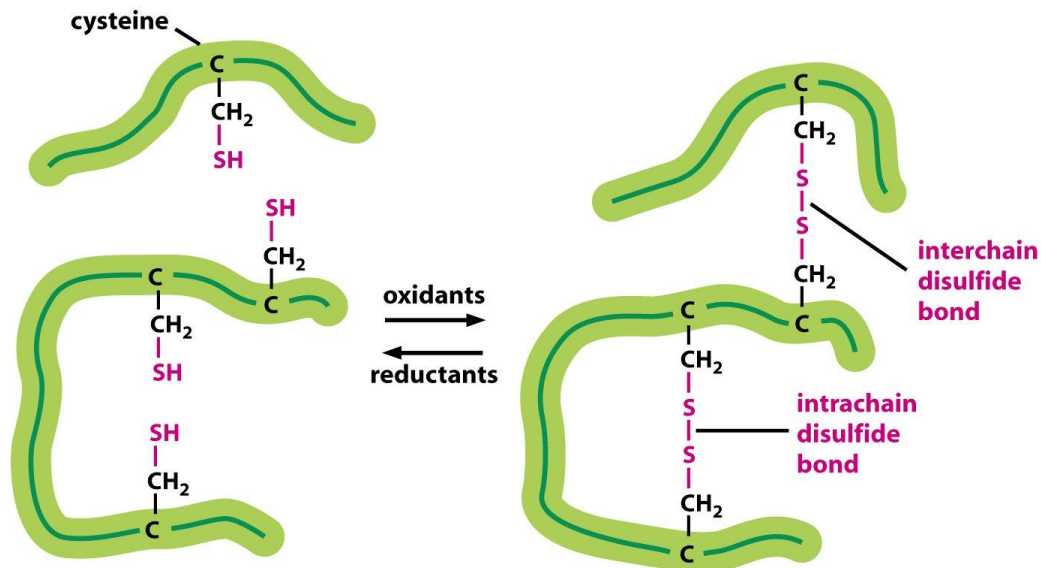
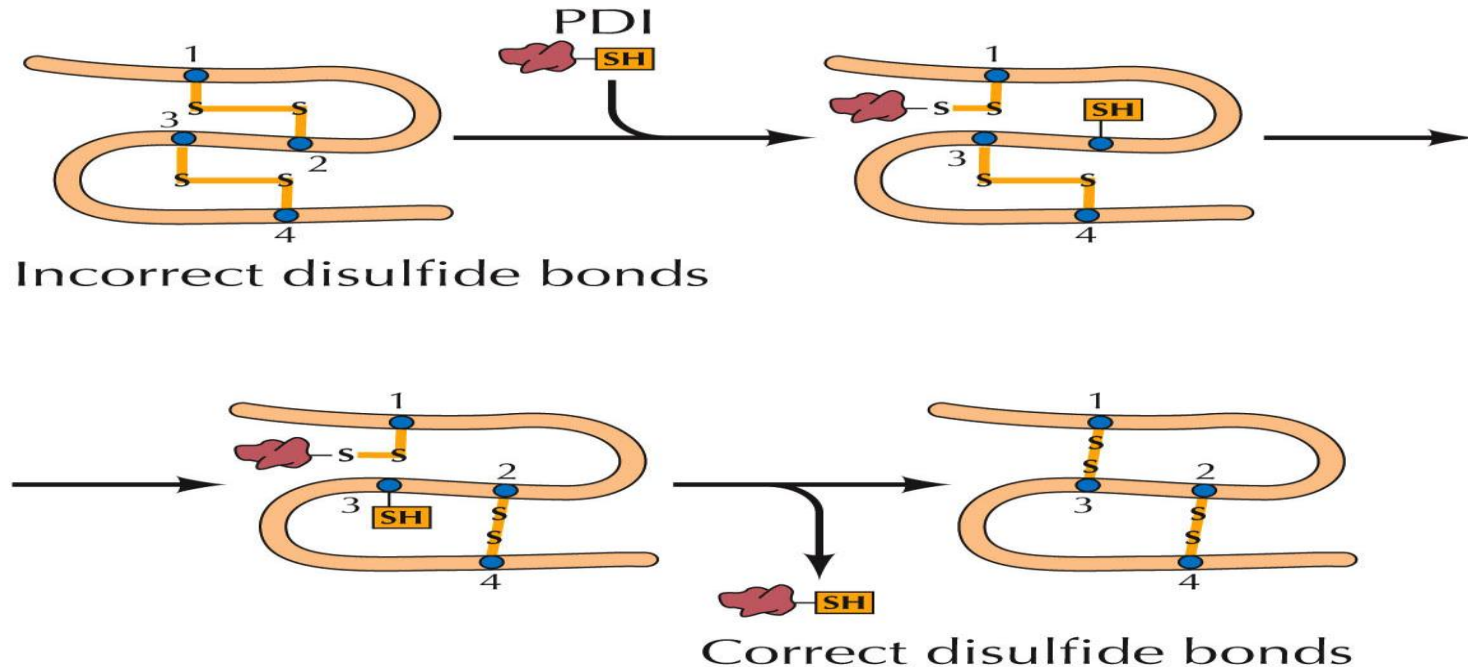


Figure 3-28 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

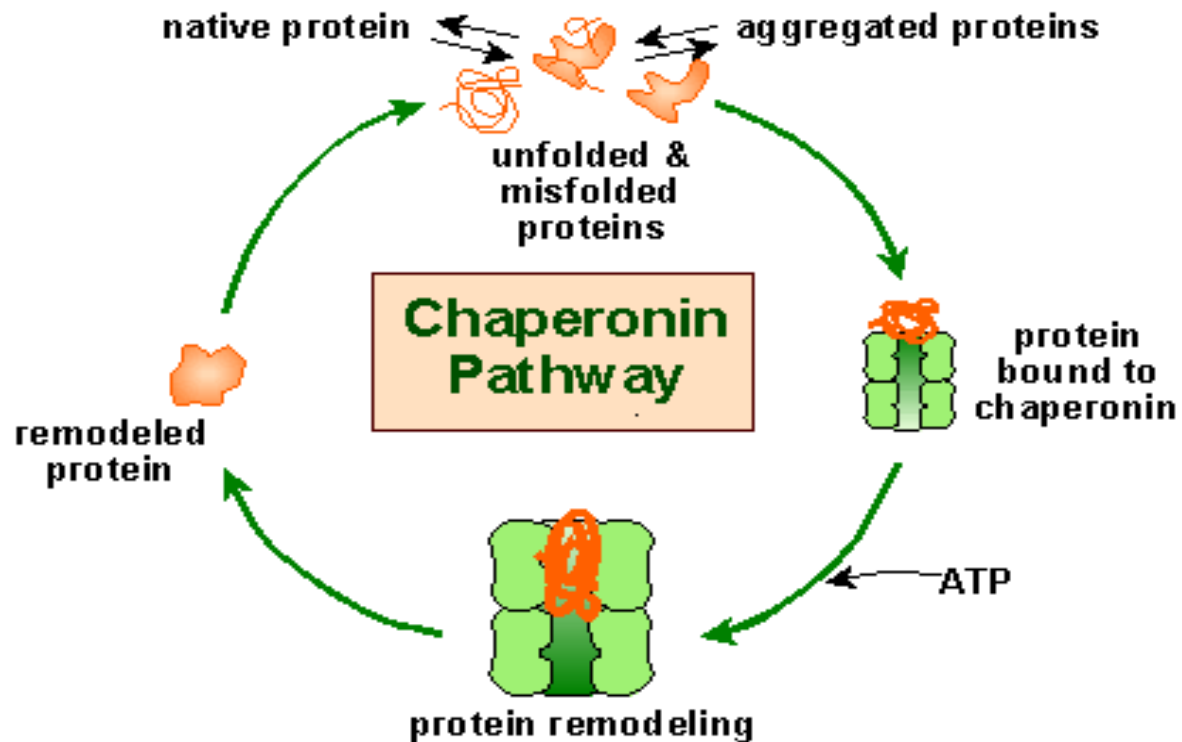
Fałdowanie i Modyfikacje białek

Enzymy katalizujące fałdowanie białek – zwiększają tempo fałdowania cząsteczki białka

Disulfidoizomeraza białek PDI (Protein disulfide isomerase) katalizuje powstawanie mostków dwusiarczkowych i odgrywa ważną rolę we właściwym ich formowaniu



Protein folding, refolding, and degradation



Mutacje chaperonów i chaperonin we wrodzonych schorzeniach u człowieka

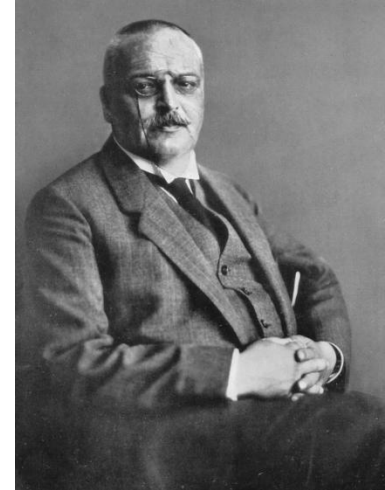
- **Syndrom McCusicka-Kaufmana - m.in.wrodzona wada serca**
- **Syndrom Bardet-Biedl - retinopatia, opóźnienie umysłowe, otyłość, dysfunkcja nerek**
- **Autosomalna recesywna ataksja Charlevoix-Saguenay - neuropatia motoryczna, atrofia mózdzku, hipermielinizacja siatkówki**
- **wrodzona katarakta**

Fałdowanie i Modyfikacje białek

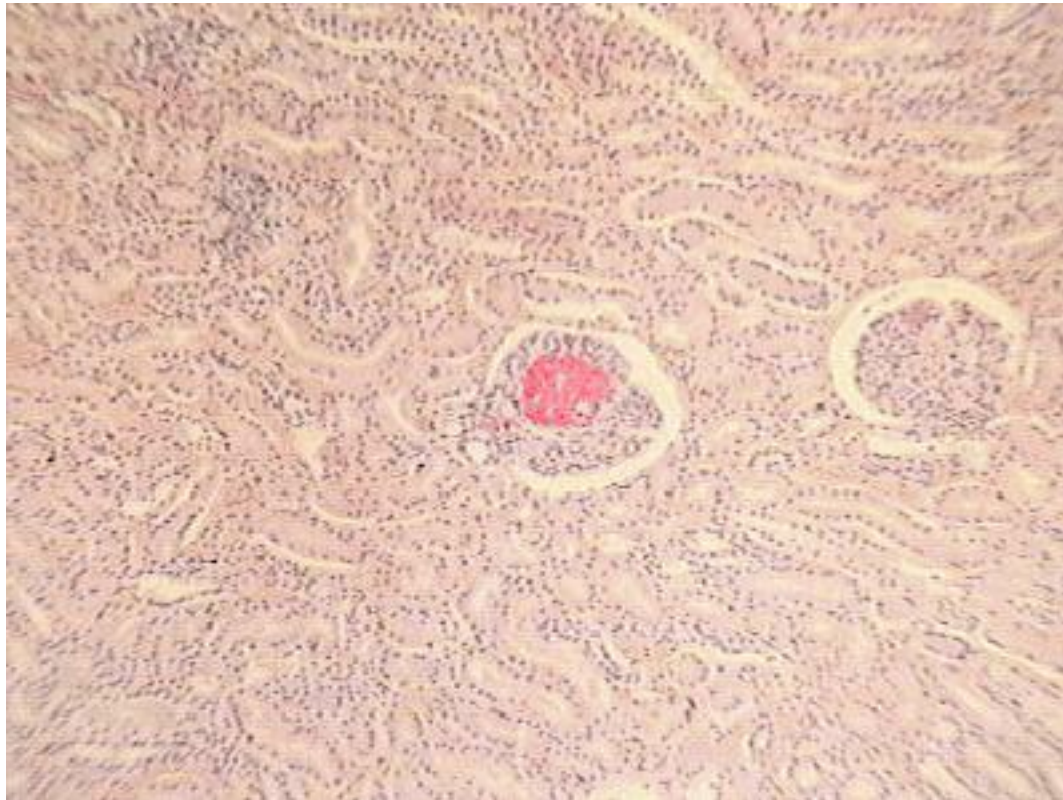
Nieprawidłowe fałdowanie może doprowadzić do utworzenia się nierozpuszczalnych agregatów i amyloidów.

- Choroby neurodegeneracyjne (np. choroba Alzheimera)
- Priony i zaraźliwość (**zakaźne gąbczaste encefalopatie**)
 - Chronic Wasting Disease (CWD)
 - Scrapie
 - BSE- Mad Cow Disease
 - Kuru
 - Creutzfeldt-Jakob Disease

Alois Alzheimer
1864 - 1915



Alzheimer's Disease Amyloid hypothesis



Amyloid cascade hypothesis

Missense mutations in *APP*, *PS1*, or *PS2* genes



Increased A β 42 production and accumulation



A β 42 oligomerization and deposition
as diffuse plaques



Subtle effects of A β oligomers on synapses



Microglial and astrocytic activation
(complement factors, cytokines, etc.)



Progressive synaptic and neuritic injury



Altered neuronal ionic homeostasis;
oxidative injury



Altered kinase/phosphatase activities \blacktriangleright tangles



Widespread neuronal/neuritic dysfunction
and cell death with transmitter deficits



Dementia



(B) **infectious seeding of amyloid fiber formation**

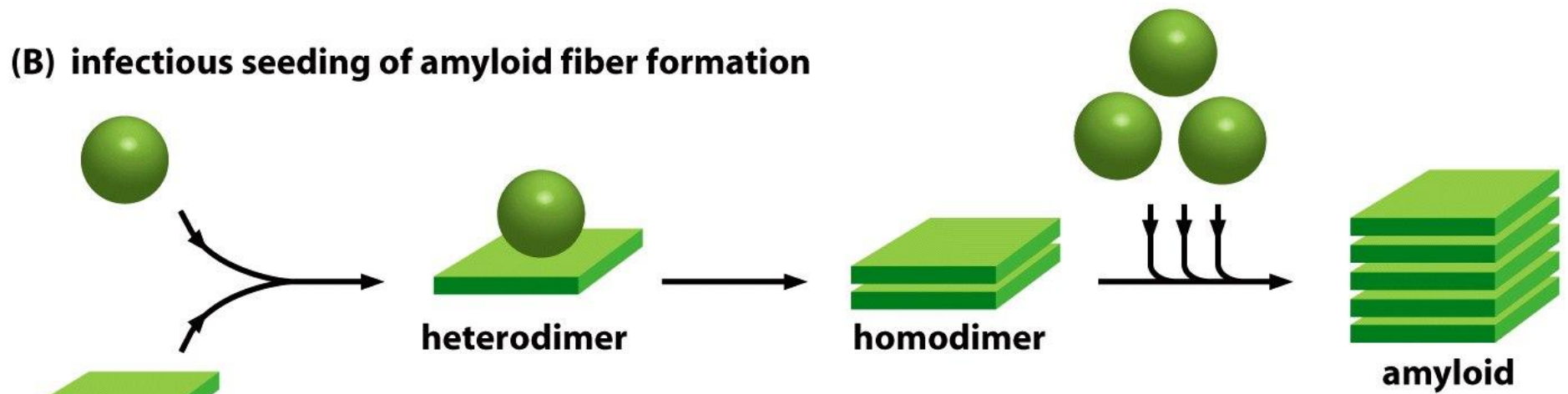
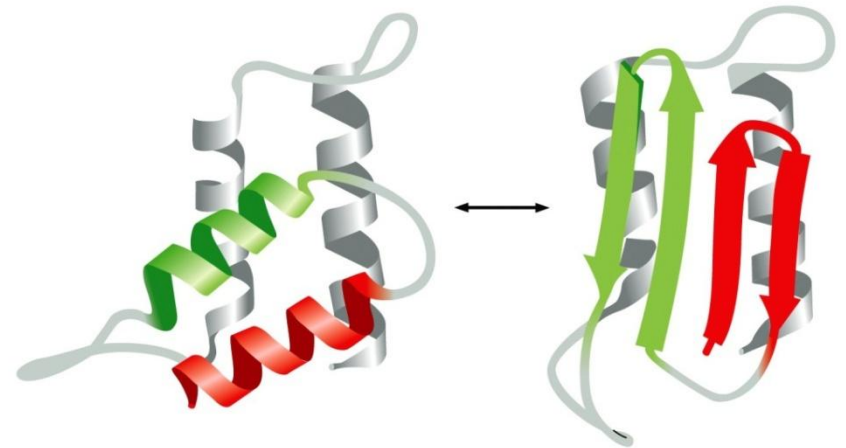
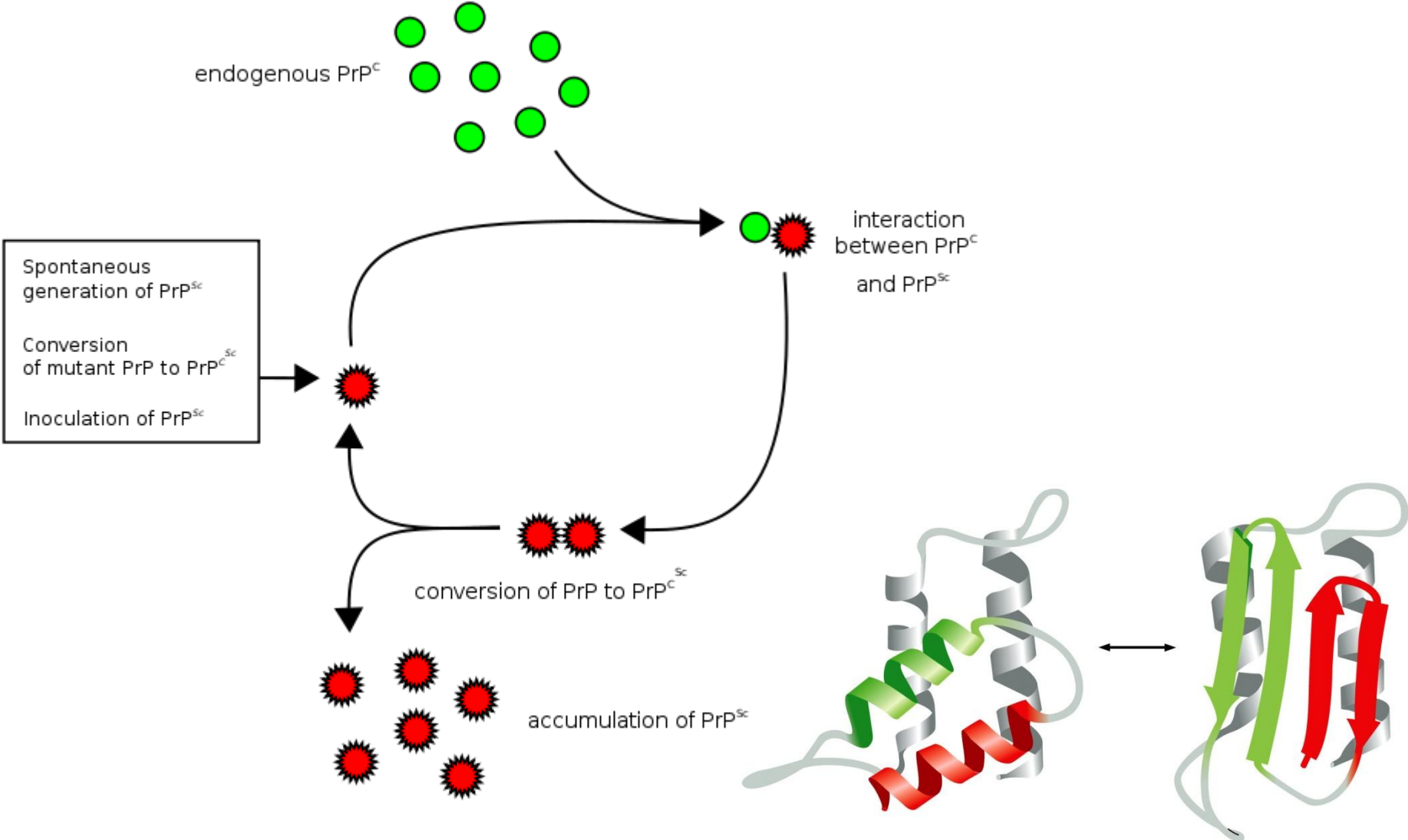


Figure 6-95ab Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



Prion Protein



Amyloids vs Prions



≠



- Prions are known to be infectious in their spreading to different hosts, e.g. CWD, BSE, kuru, etc...
- Amyloid diseases - not *thought* to be infectious agents **but....**

Amyloids vs. Prions-news!

1: Proc Natl Acad Sci U S A 2002 May 14;99(10):6979-84

Full text article at
www.pnas.org

Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism.

Lundmark K, Westermark GT, Nystrom S, Murphy CL, Solomon A, Westermark P.

Division of Molecular and Immunological Pathology, Linköping University, 581 83 Linköping, Sweden.

- It has been recently shown that mice who were fed amyloid fibrils (from the spleen of infected mice) orally (in H₂O) developed amyloid deposits upon stimulation.

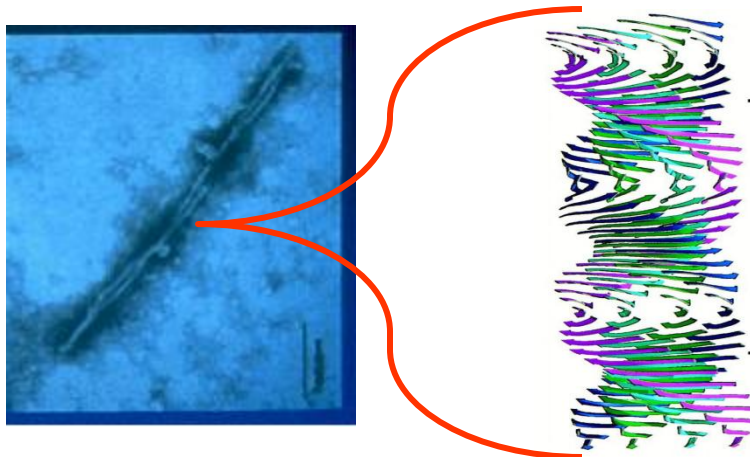
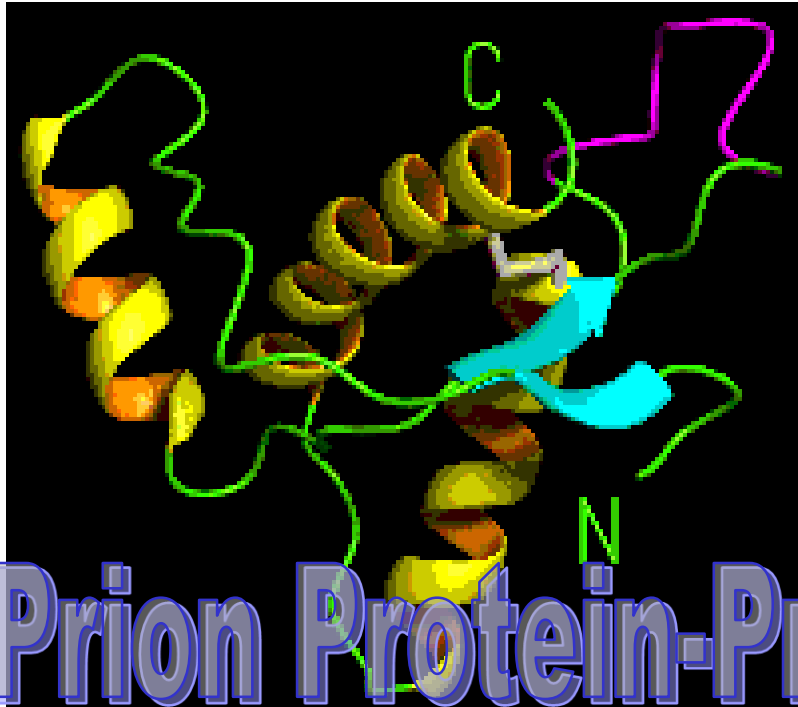
Amyloids vs. Prions



=



- Similar propagation of fibrils in vitro.
- Similar symptoms (inflammatory neuropathies).



- Normal PrP or A β protein may misfold into a beta sheet structure
- The beta sheets form extended aggregate fiber structures by “recruiting” properly folded proteins
- **These fibrils are protease resistant and insoluble**
- This is the most prevalent characteristic of amyloid and prion diseases.

Fałdowanie i modyfikacje białek

- Priony i zaraźliwość

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1997

Stanley B. Prusiner

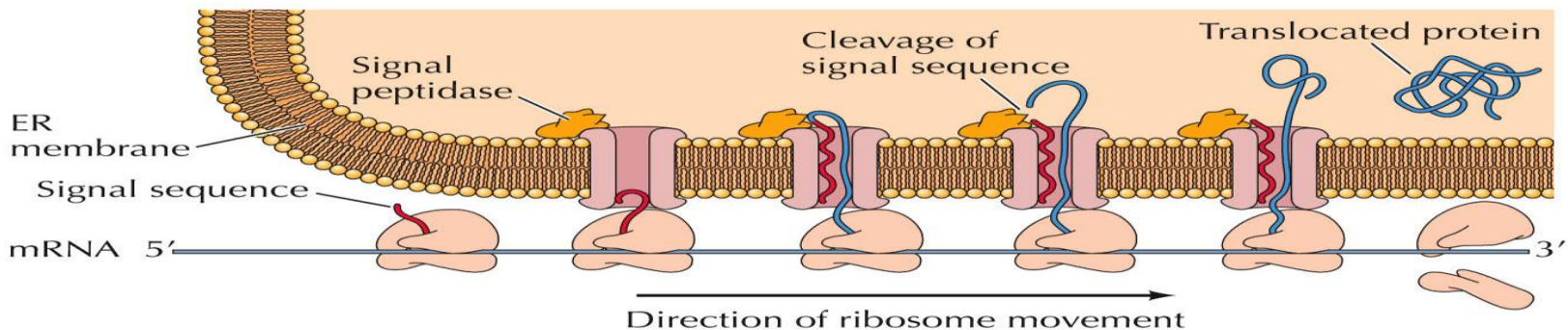
*"for his discovery of Prions –
a new biological principle of infection".*



Cięcie białek

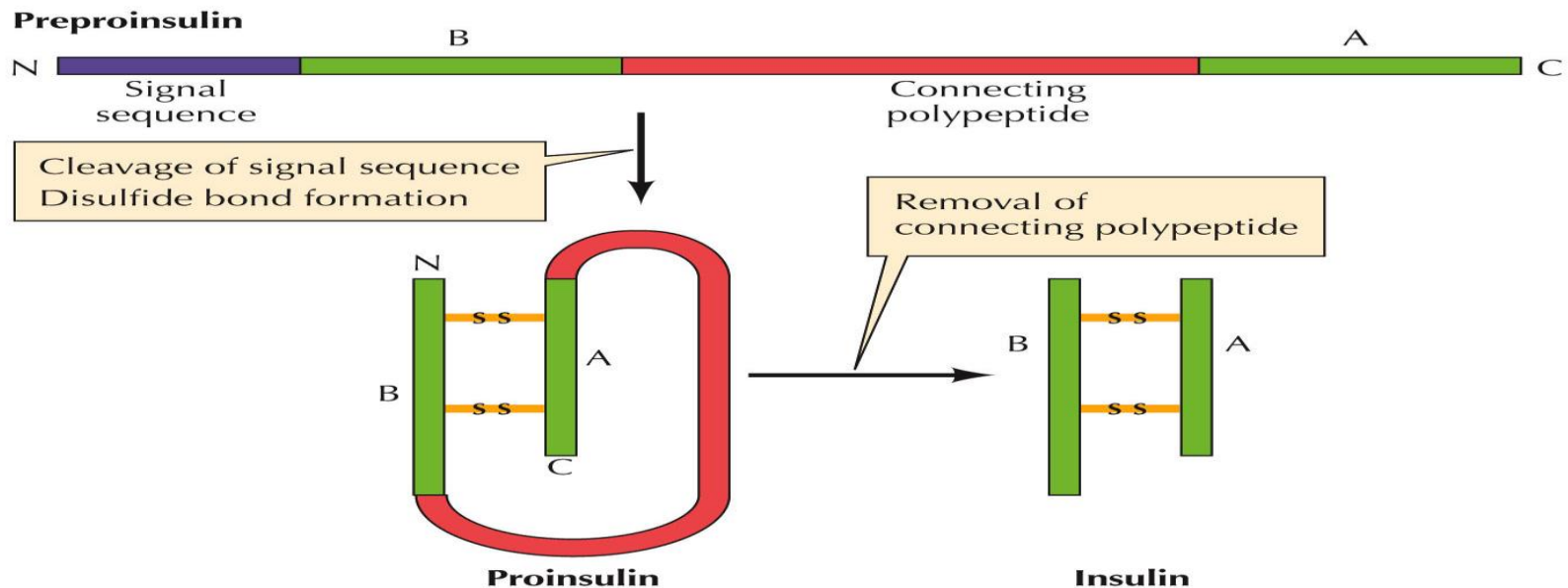
Proteoliza jest ważnym etapem w dojrzewaniu wielu białek i wiąże się z cięciem łańcucha polipeptydowego

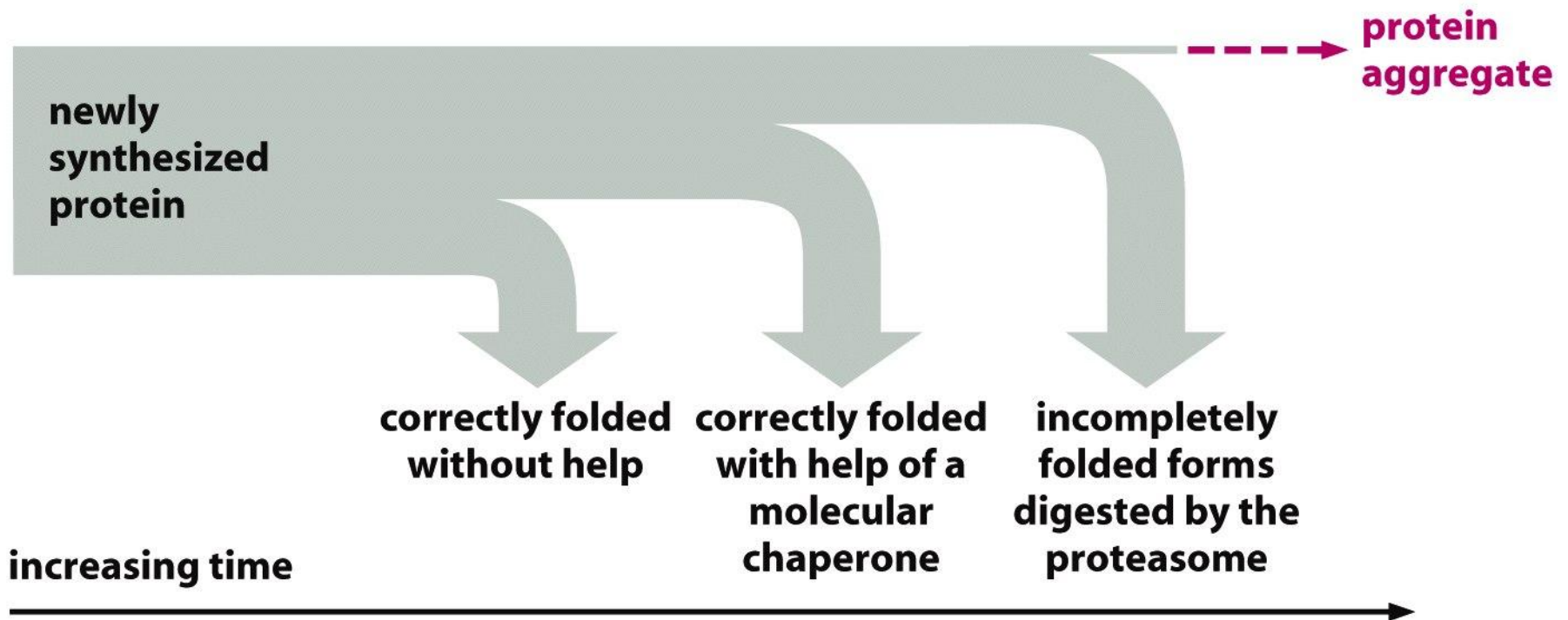
Sekwencje sygnałowe pozwalają na właściwą lokalizację białek w komórce, np. w retikulum endoplazmatycznym jeszcze w czasie trwania translacji



Cięcie białek

- Peptydazy sygnałowe należą do rodziny proteaz błonowych, które odcinają sekwencję sygnałową w czasie przechodzenia białka przez kanał błonowy podczas translacji
- Aktywne enzymy lub hormony, takie jak insulina powstają poprzez cięcie większych prekursorów



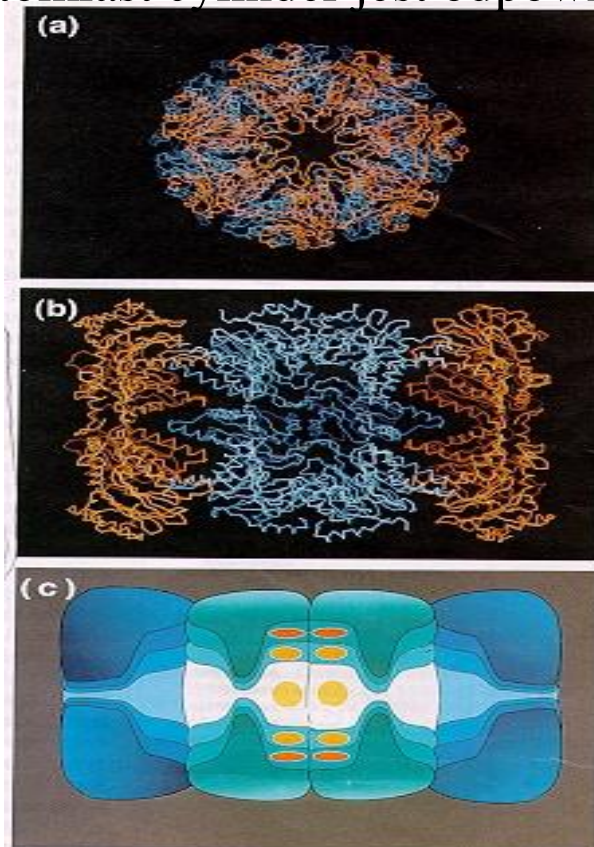


Główne systemy proteolityczne w komórce:

- **Zależny od ubikwityny i ATP**
- **Lizosomalny**
- **Zależny od jonów wapniowych**

Proteasom - wieloenzymatyczny kompleks utworzony z proteaz, odpowiedzialny za degradację enzymów i białek regulatorowych.

Zbudowany jest z cylindra 20S i dwóch regulatorowych kompleksów 19S znajdujących się na obydwu końcach cylindra. Podjednostka 19S rozpoznaje białko, które jest przeznaczone do degradacji i odpowiada za jego rozwinięcie i skierowanie do cylindra. Natomiast cylinder jest odpowiedzialny za ich fragmentację.



**Proteasom degradowuje tylko naznaczone wcześniejsz bialka.
Znacznikiem tym jest ubikwityna.**

Wchlonięte przez proteasom bialko rozkladane jest do pojedynczych aminokwasow i krótkich peptydow zlozonych z 10-12 aminokwasow.

Podjednostka 19S rozpoznaje bialko, które jest przeznaczony do degradacji i odpowiada za jego rozwinięcie i skierowanie do cylindra. Natomiast cylinder jest odpowiedzialny za ich fragmentacje.

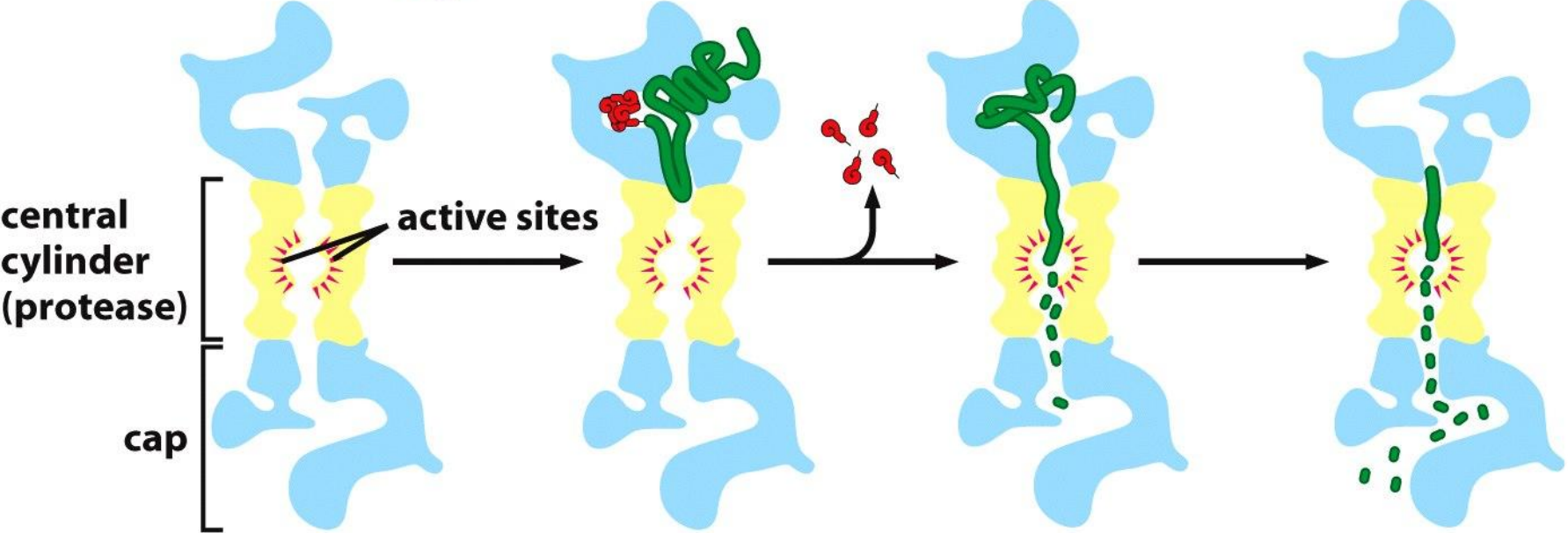


Figure 6-90 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)

Ubikwityna

Masa cząsteczkowa wynosi 8,5 kDa i ma długość 76 aminokwasów.

Struktura ubikwityny jest bardzo konserwatywna - ubikwityna człowieka i drożdży różni się tylko trzema resztami.



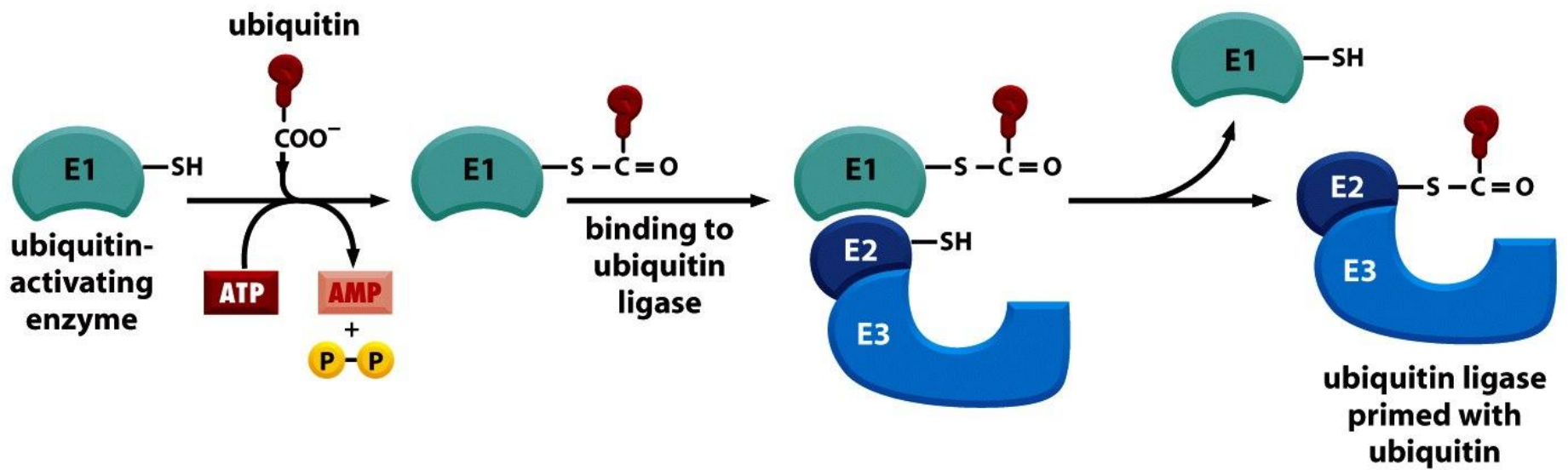


Figure 6-92b *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

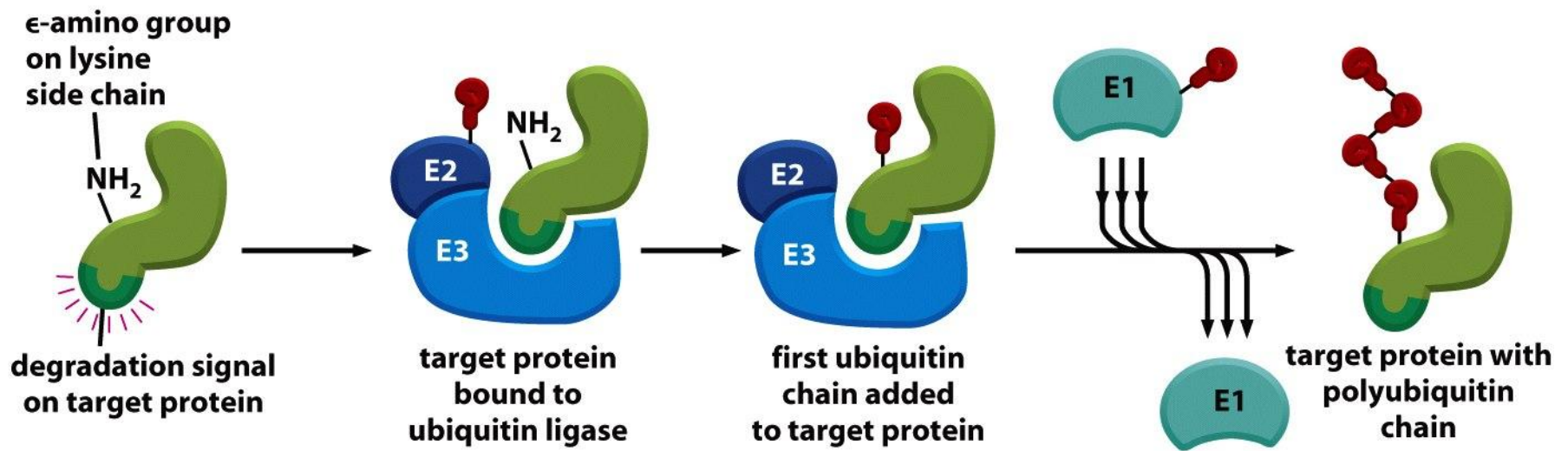


Figure 6-92c *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

**MONO-
UBIQUITYLATION**



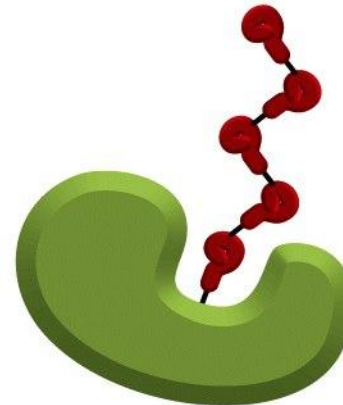
histone regulation

**MULTI-
UBIQUITYLATION**

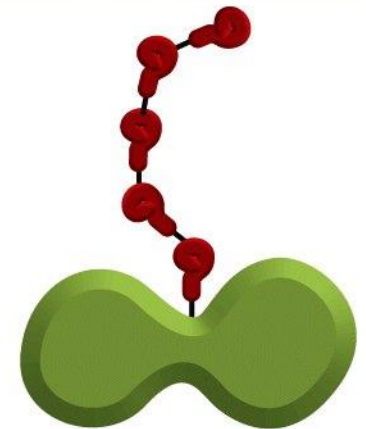


endocytosis

POLYUBIQUITYLATION

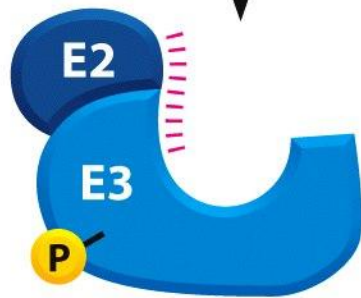
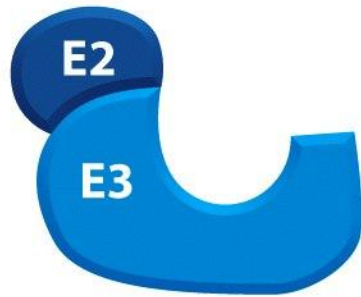


**proteasomal
degradation**

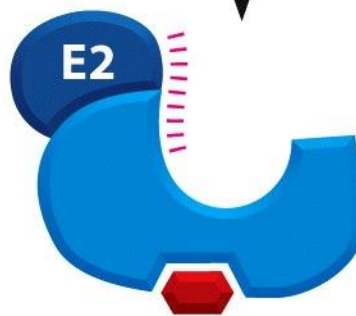
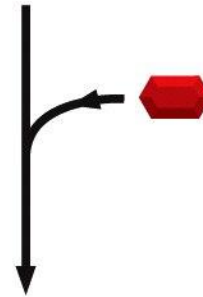
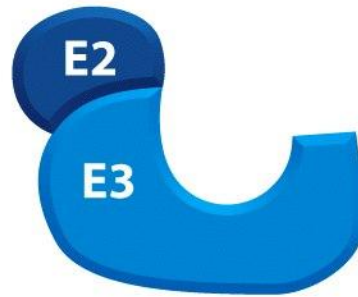


DNA repair

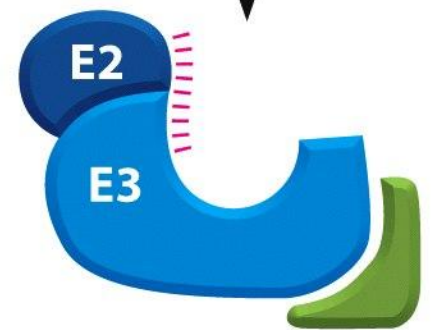
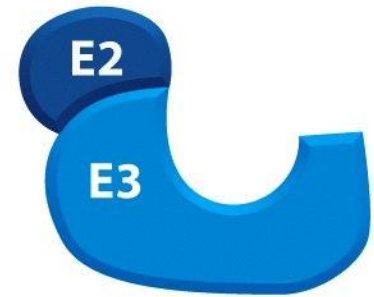
ACTIVATION OF A UBIQUITIN LIGASE



**phosphorylation
by protein kinase**

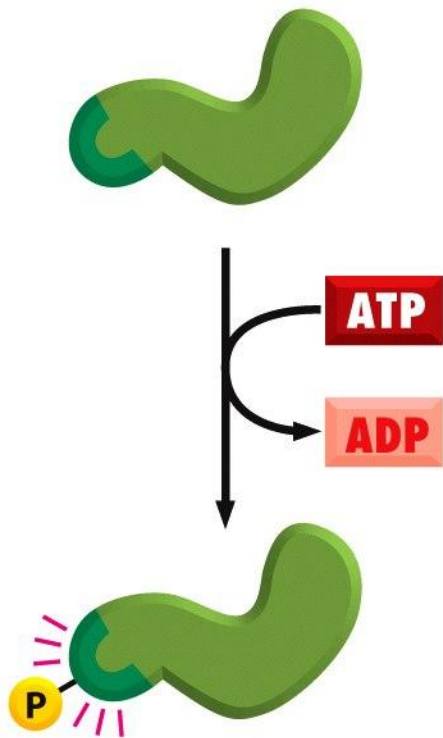


**allosteric transition
caused by ligand binding**

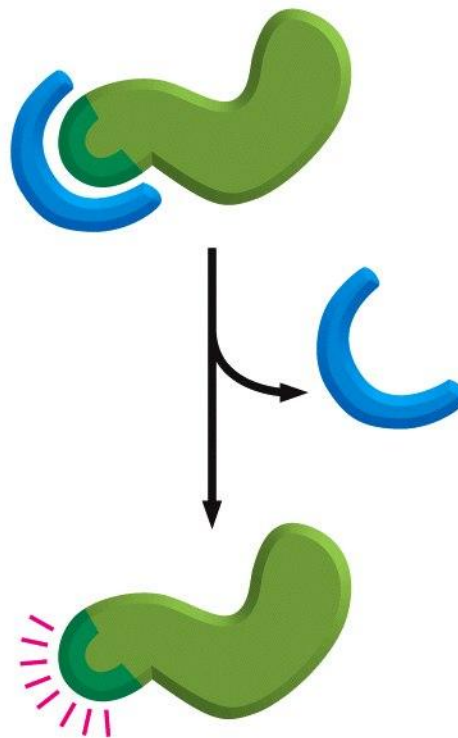


**allosteric transition
caused by protein
subunit addition**

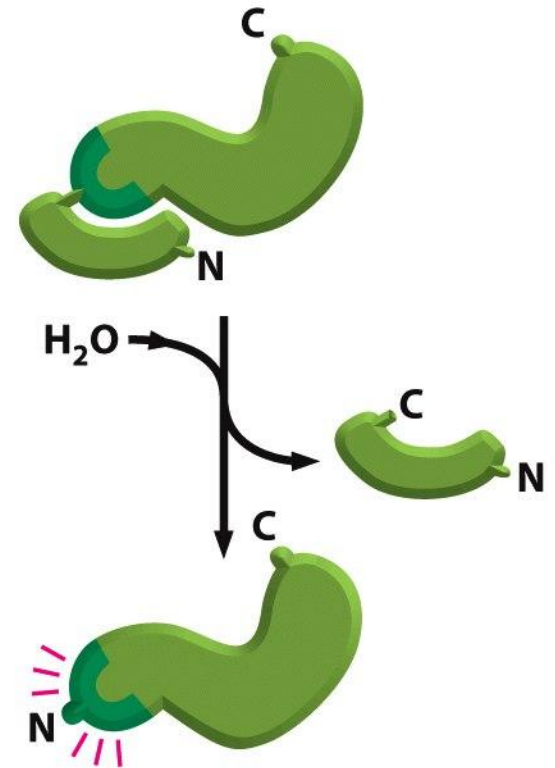
ACTIVATION OF A DEGRADATION SIGNAL



**phosphorylation
by protein kinase**



**unmasking by
protein dissociation**



**creation of destabilizing
N-terminus**

Proteoliza zależna od ubikwityny zaangażowana jest w następujące procesy w komórce:

- regulacja cyklu komórkowego i podziałów komórki
- regulacja różnicowania
- odpowiedź na stres komórkowy i czynniki zewnętrzne
- morfogeneza połączeń nerwowych
- modulacja receptorów powierzchniowych
- naprawa DNA
- regulacja transkrypcyjna
- pamięć długotrwała
- rytmy dobowe
- regulacja reakcji zapalnych i odpornościowych
- biogeneza organelli

- **Proteoliza zależna od ubikwityny zależy od żywienia – zwiększa się w stanie głodu i niedożywienia białkowego.**
- **Aktywność fizyczna zmniejsza, a bezczynność mięśni zwiększa intensywność proteolizy zależnej od ubikwityny.**
- **Sepsa, choroba nowotworowa, zakwaszenie zwiększają proteolizę tego typu, ma ona znaczący udział w powstawaniu wyniszczenia.**

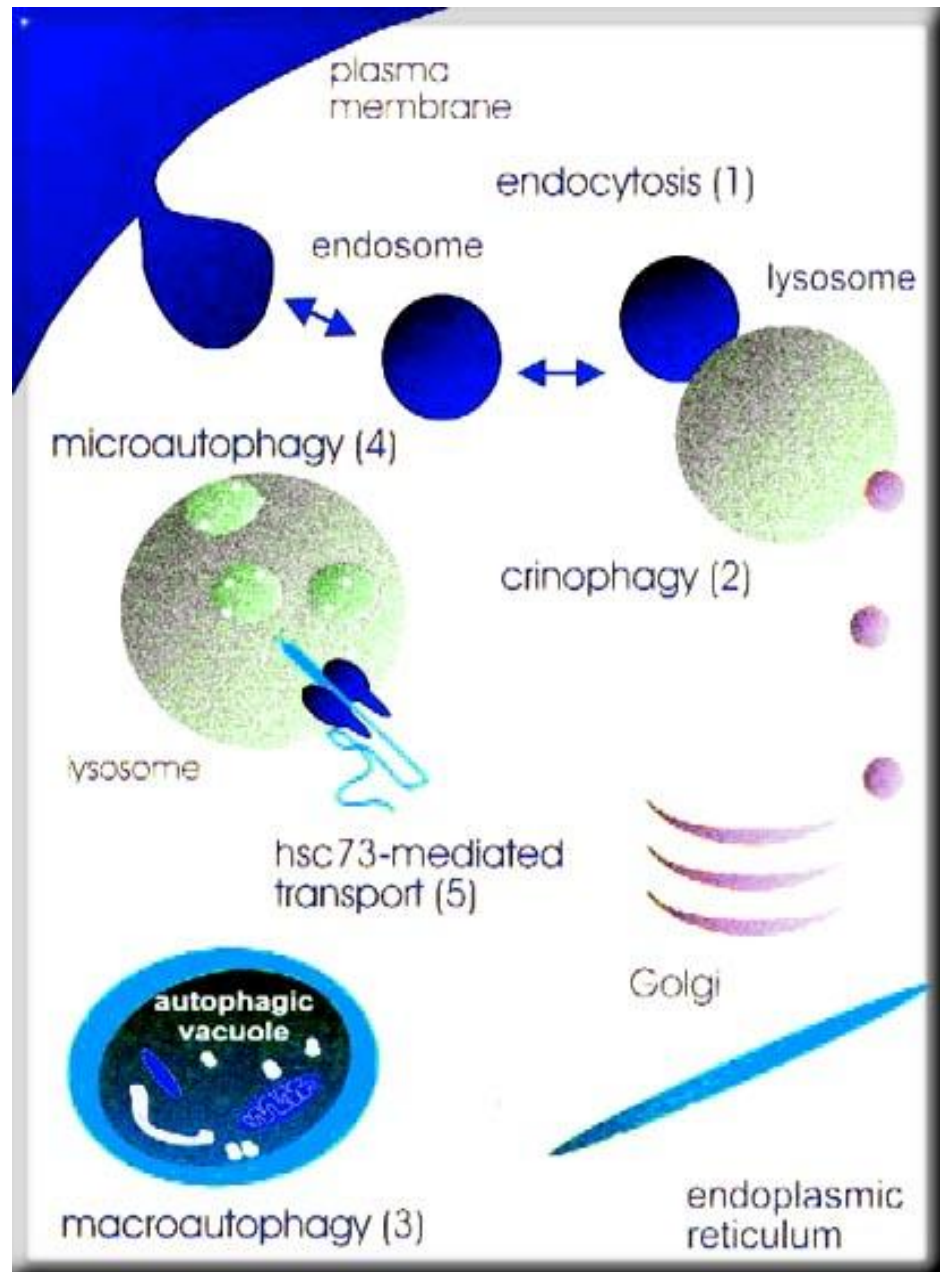
Główne systemy proteolityczne w komórce:

- Zależny od ubikwityny i ATP
- **Lizosomalny**
- Zależny od jonów wapniowych

Degradacja lizosomalna

- Lizosomy - organelle zawierające liczne hydrolazy
- pH lizosomalne między 4 i 5
- Proteazy lizosomalne - *katepsyny* - mają optimum pH w tym zakresie
- Proteazy lizosomalne działają na białka pobierane drogą endocytozy z zewnątrz komórki, z jej powierzchni lub wnętrza
- Lizosomalne proteazy są zdolne do degradowania białek aż do aminokwasów.

- **Mikroautofagia** - małe porcje cytoplazmy tworzą wgłębienia na powierzchni lizosomów - odpowiedzialna za ciągłą degradację długożyjących białek
- **Makroautofagia** - duże fragmenty cytosolu lub całe organelle zostają otoczone przez wakuole - powstają autofagosomy - po fuzji z lizosomami następuje proteoliza
- **Krinofagia** - pochłanianie przez lizosomy pęcherzyków aparatu Golgiego - ograniczenie wydzielania



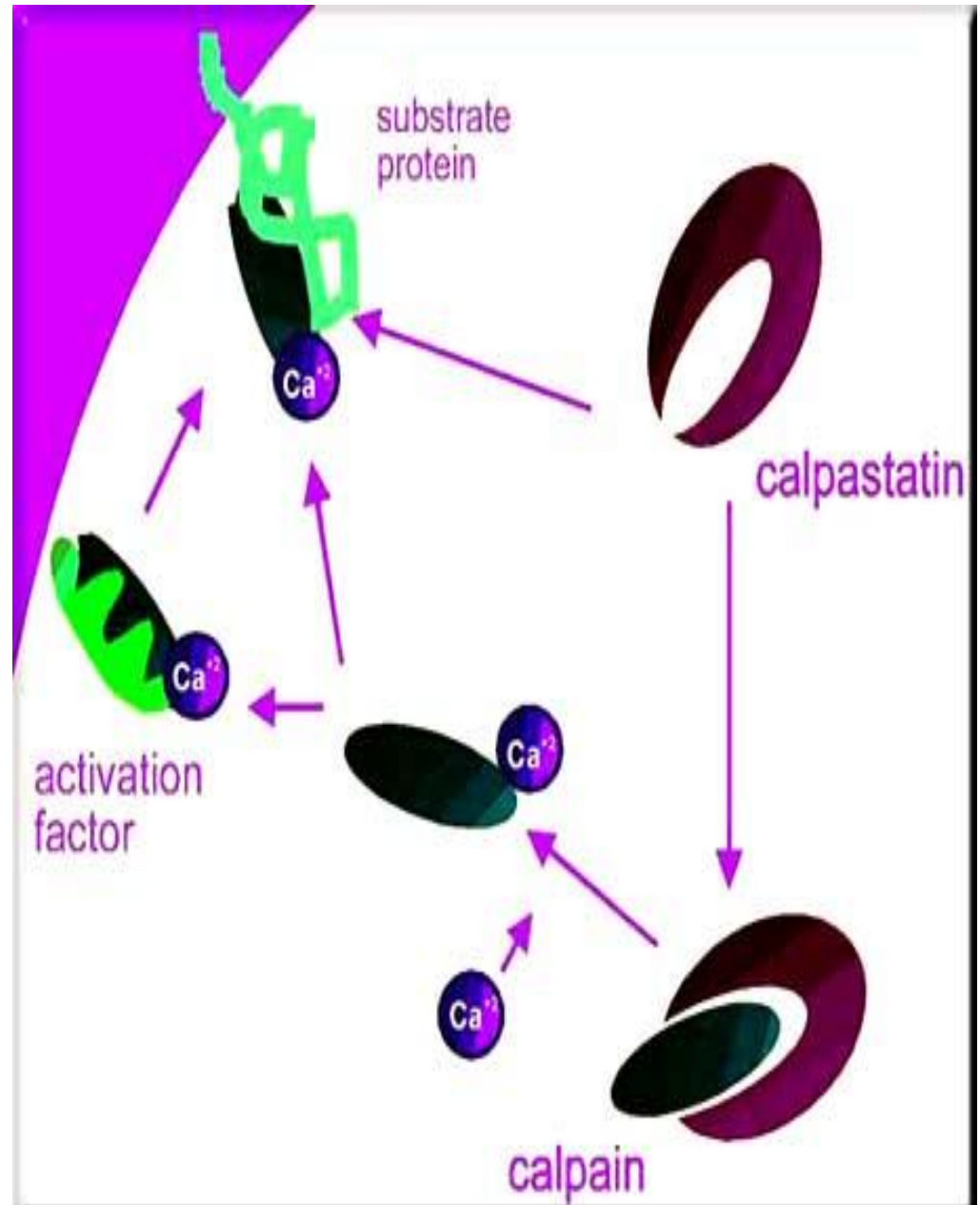
- **Makroautofagia w wątrobie odpowiedzialna za prawie całą proteolizę, zwłaszcza w okresie głodzenia.**
- **Czynniki hamujące makroautofagię:**
 - **aminokwasy**
 - **insulina**
 - **puchnięcie komórki**
 - **rozerwanie cytoszkieletu**

Główne systemy proteolityczne w komórce:

- **Zależny od ubikwityny i ATP**
- **Lizosomalny**
- **Zależny od jonów wapniowych**

Kalpainy (proteazy)

- unieczynniane przez wewnątrzkomórkowe inhibitory – **kalpastatyny**
- uaktywniane pod wpływem przeniesienia w okolice błony komórkowej i ograniczonej autolizy, jonów wapniowych i innych czynników aktywujących.



- Kalpainsy degradują białka błonowe i cytoszkieletu, a także enzymy związane z błonami.
- Działają podczas fuzji błon.
- Substratami są np. kinazy białkowe i erytrocytarny transporter anionowy.
- Proteoliza kinaz białkowych wskazuje na ich wpływ na przeniesienie sygnałów informacyjnych wewnątrz komórki. Aktywowane są przez czynniki regulacyjne.
- Przypuszczalnie odgrywają rolę w podziałach komórek

- Rozkładają niektóre czynniki transkrypcyjne. Regulacja ekspresji genów?
- Zaangażowane są w programowaną śmierć komórki - apoptozę w niektórych typach komórek w przypadku działania określonych czynników stymulujących.
- Zaangażowane w wiele stanów patologicznych związanych z zaburzeniami wewnątrzkomórkowej homeostazy wapniowej.

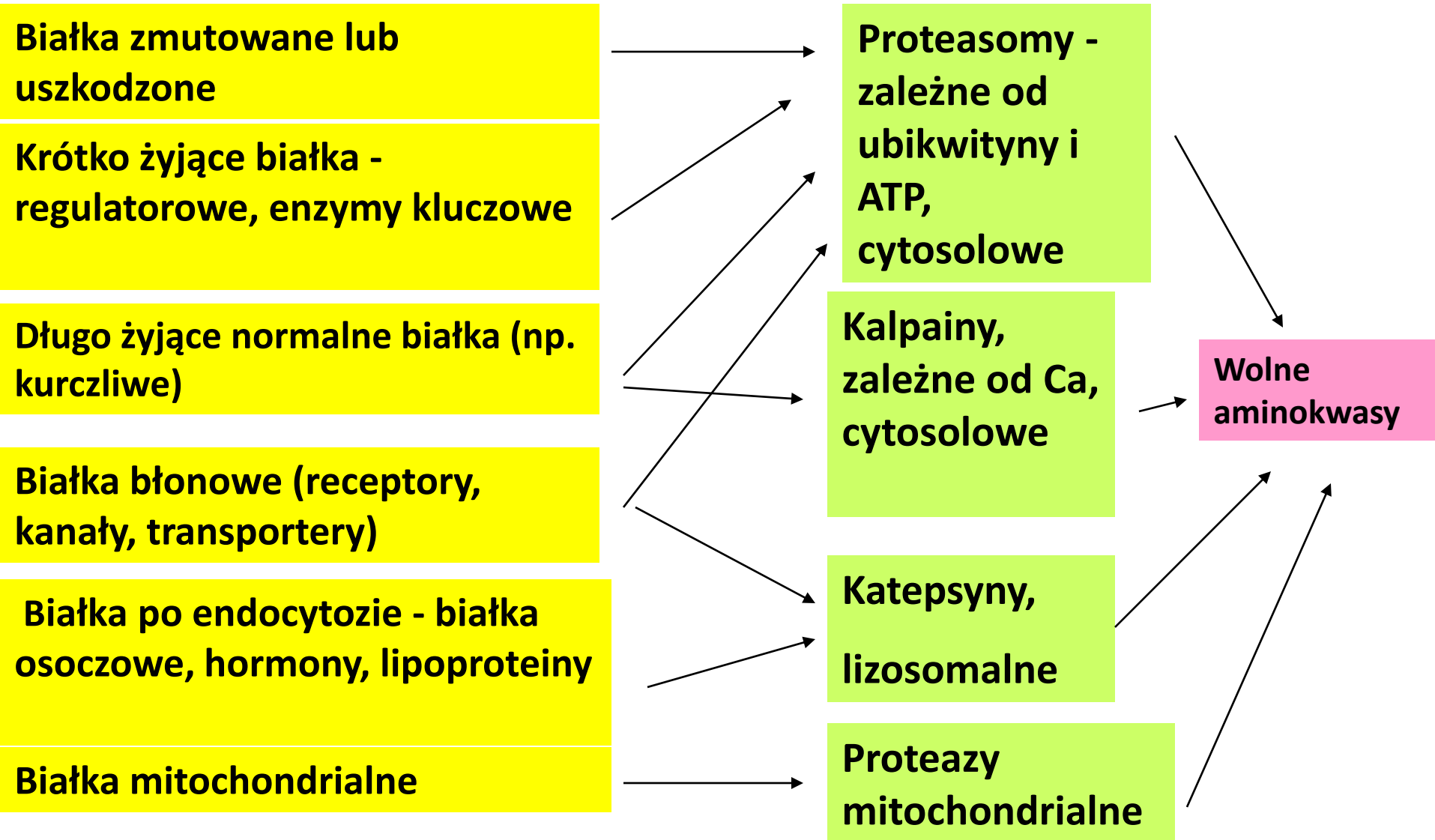
Choroby związane z podwyższoną aktywnością kalpain

- **Choroba Alzheimera** - w korze mózgu 3x wyższa aktywność kalpainy i tyle samo niższa kalpastatyny.
- **Katarakta** - napływ wapnia (1 mM lub więcej) aktywuje m-kalpainę, która rozkłada białko krystalinę. Fragmenty krystaliny tworzą agregaty - kataraktę.
- **Dystrofia mięśni - choroba Duchenne** - utrata białka błonowego, dystrofiny, powoduje napływ wapnia, wzrost aktywności kalpain i intensywną proteolizę.
- **Zawał mięśnia sercowego** - w miejscach niedotlenienia wzrost poziomu wapnia. Kalpainy degradują białka desminę i alfa-spektrynę.

Choroby związane z podwyższoną aktywnością kalpain

- **Stwardnienie rozsiane** - wszystkie główne białka mieliny są substratami kalpain. Aktywność kalpain wzrasta pod wpływem zmian zapalnych. Inhibitory kalpain hamują degradację neurofilamentów.
- **Udar mózgu** - aktywność kalpain wzrasta, a poziom kalpastatyny ulega obniżeniu w miejscach niedotlenienia. Kalpainty uczestniczą zarówno w apoptozie, jak i nekrozie komórek nerwowych. Inhibitory kalpain zmniejszają degradację spektryny.

Rola komórkowych systemów proteolitycznych



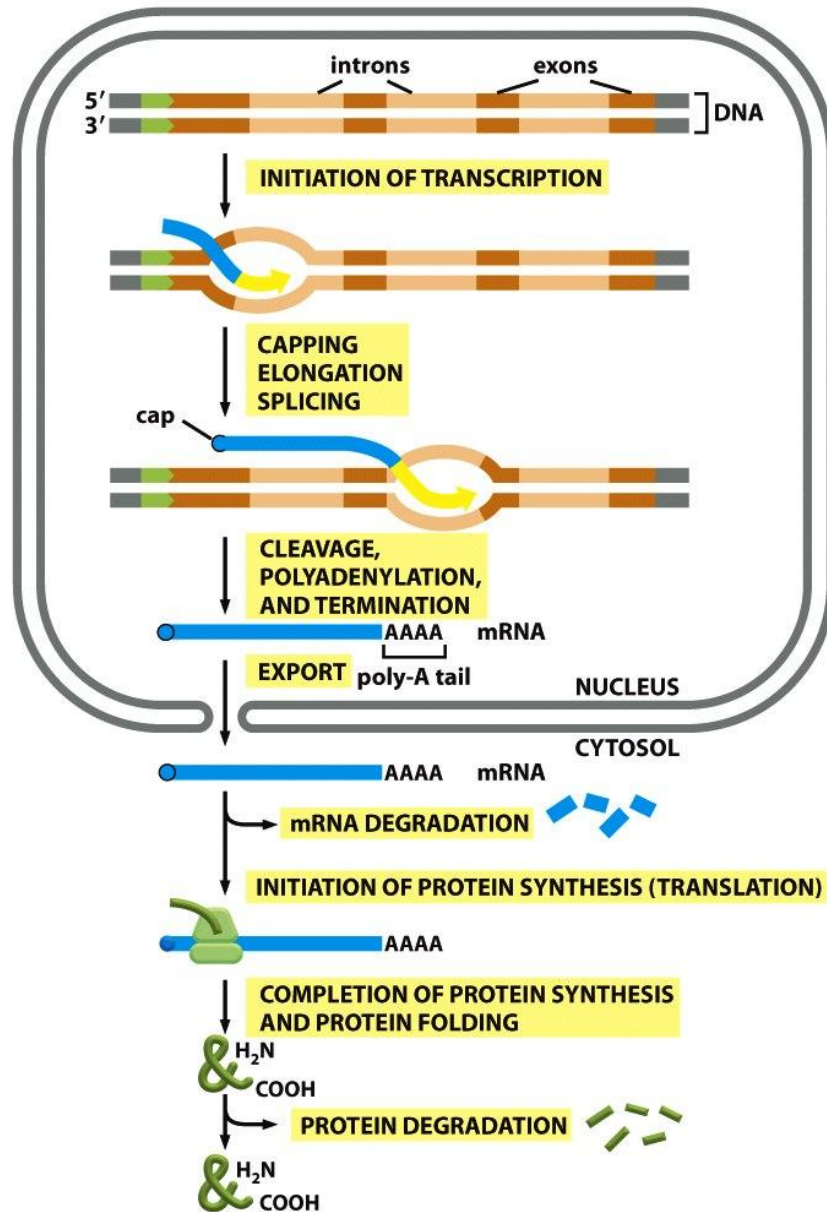


Figure 6-97 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)