

# Posttranslační úpravy a targeting proteinů

Jak u bakterií tak u eukaryot jsou některé proteiny určeny pro cytosol, jiné jsou součástí membrán a nebo jsou sekretovány mimo buňku. V eukaryotických buňkách jsou některé proteiny po dokončení jejich syntézy posílány do buněčných organel, např. do lysosomů, mitochondrií buněčného jádra a u rostlin do chloroplastů. Odeslání nových proteinů k místu jejich určení se nazývá **targeting** (angl. target = místo určení, cíl).

## Signální sekvence polypeptidu, volné a vázané ribozómy

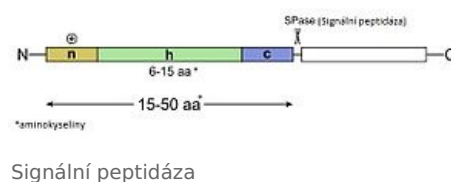
Cytosolové proteiny jsou syntezovány na **volných** cytosolových **ribosomech**, zatímco membránové bílkoviny, proteiny organel a bílkoviny uvolňované mimo buňku se syntetizují na ribosomech vázaných na hrubé endoplazmatické retikulum (ER). Volné a vázané ribosomy jsou strukturně a funkčně zcela stejné, o jejich vazbě na ER rozhoduje sekvence syntezovaného řetězce. Většina proteinů určených mimo cytosol má na N-konci tzv.

**signální sekvenci** o 13 - 16 aminokyselinách. I když se tyto sekvence od proteinu k proteinu liší, zastoupení několika hydrofobních aminokyselinových zbytků je zde charakteristické. Sekvence je rozpoznávána **částicí SRP** (signal recognition particle), skládající se ze šesti proteinových podjednotek a 7SL RNA. Naváže se na signální sekvenci syntezovaného proteinu a zastaví translaci v počáteční fázi. Membrána ER obsahuje receptory pro SRP. Jakmile se na ně komplex ribosom-SRP naváže, pak za účasti dalších dvou membránových proteinů, **riboforinu I a II**, pokračuje proteosyntéza a současně peptidový řetězec prochází membránou do cisterny ER. SRP se opět z receptoru uvolní do cytosolu.

Signální sekvence je pro translokaci rozhodující. Je-li genovou manipulací připojena k cytosolovému proteinu, např. hemoglobinu, pak je tato bílkovina uvolňována mimo buňku. Translokace peptidu je aktivní membránový proces, vyžadující energii (ATP). Prostup není poháněn translací, ribosomem. Teoreticky by mohl probíhat i po dokončení syntézy řetězce na volném ribosomu. Včasná vazba syntezovaného proteinu a ribosomu na ER je však výhodná a většinou potřebná, neboť po syntéze na volném ribosomu by protein mohl zaujmout konformaci, která by translokaci přes membránu znemožnila.

Těsný prostor mezi místem translace a translokace nedovolí, aby se řetězec konformoval dříve než na druhé straně membrány nebo v ní. Některé proteiny zůstanou zakotveny v membráně, což je dáno též jejich primární sekvencí.

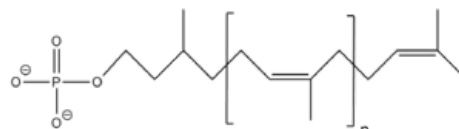
Membránové proteiny totiž kromě signální sekvence mají ještě **zakotvující, stop-transferasovou sekvenci**, která translokaci přes membránu ukončí a protein zůstane zakotvenou součástí membrány. Signální sekvence těchto proteinů může být i poněkud vzdálená od N-konce. Některé mají takových sekvencí dokonce několik, střídají se se stop-transferovými úseky, takže jsou v membráně zakotveny několikerým způsobem, někdy i několikanásobně (viz obrázek). Signální sekvence sekretovaných proteinů bývá ještě v průběhu translokace odštěpena membránovou **signalasou**. Protein proniká do cisterny ER. Zde a zejména pak v Golgiho aparátu, je kovaletně modifikován (viz Posttranslační glykosylace proteinů) a potom dopraven na místo své funkce.



## Posttranslační glykosylace proteinů

Po translokaci do cisteren ER se mnohé proteiny dále upravují. Odštěpí se signální peptid, vytváří se disulfidové vazby. Později se může proteolyticky z polypeptidového řetězce vyštěpit určitý úsek, a tím se protein funkčně aktivuje (hormon, enzym). Funkce řady proteinů může být modifikována fosforylací, acetylací nebo ADP-ribosylací (str.OOO). Mnoho proteinů získá v ER a v Golgiho aparátu oligosacharidové zbytky, takže se z nich stanou **glykoproteiny**. Uvedené změny hotového peptidového řetězce se nazývají **posttranslační úpravy proteinů**, nebo též jejich kovalentní modifikace. Toto strukturní a funkční zrání proteinu je velmi významné pro regulaci biochemických pochodů.

Oligosacharidy se vážou buď N-glykosidovou vazbou na asparaginový zbytek nebo O-glykosidovou vazbou na serinový nebo threoninový zbytek proteinu. Prekurzory oligosacharidů se syntetizují na isoprenovém nosiči - **dolicholfosfátu**, obsaženém v membráně ER. Pokud je jeho fosfátová skupina na cytosolové straně membrány, navazují se na ni postupně dva N-acetylglukózaminy a pět mannos. Dolicholfosfát s tímto heptasacharidem je pak v membráně orientován tak, že oligosacharid je na lumenární straně membrány, směřuje do cisterny ER. Zde se na něj z jiného dolicholfosfátového prekurzoru přenesou další čtyři mannosa a tři glukózy (viz obrázek).



Vzorec dolicholfosfátu (n = 15 až 19)

Takto aktivovaný oligosacharid se přenesou na Asn peptidu, fosfatasa odštěpí jeden z fosfátů dolicholpyrofosfátu a regenerovaný dolicholfosfát může opět vstoupit do reakčního cyklu. Zmíněnou fosfatasa blokuje antibiotikum **bacitracin**. Připojení Glc-NAc na dolicholfosfát je inhibováno antibiotikem **tunicamycinem**.

Ještě v ER se od N-vázaného oligosacharidu odštěpí tři glukózy a jedna mannosa. Protein je pak přemístěn do **Golgiho aparátu (GA)**. V jeho váčcích se na protein navazují oligosacharidy též O-glykosidovou vazbou. N-vázané oligosacharidy se dále upravují. Postupně je odštěpeno šest mannos a připojeny další GlcNAc, galaktosy, fukosa a

nakonec **sialová kyselina (kys. N-acetylneuraminová)**. Tyto úpravy v Golgiho aparátu se nazývají **terminální glykosylace** na rozdíl od **základních glykosylací** (core glycosylations) probíhajících již v ER. Oligosacharidy glykoproteinů určených pro lysosomy jsou specificky fosforylovány.

Během všech procesů po přemístění proteinu do cisteren ER jsou peptidy v membránách orientovány tak, že oligosacharidové zbytky jsou na lumenální straně membrány (v cisterně, ve váčcích GA, v transportních váčcích). Pokud transportní váčky splynou s plazmatickou membránou, oligosacharidy glykoproteinu se dostanou na zevní, extracelulární stranu membrány. Zachovává se určitá **asymetrie membrán**.

Ukázalo se, že oligosacharidy glykoproteinů jsou někdy signálem, jakou si *adresou*, podle které jsou proteiny z Golgiho aparátu odeslány na správné místo své funkce. Existuje **mukolipidosa** (I-cell disease), jejíž příčinou je genetická chyba v úpravě oligosacharidových zbytků lysosomálních enzymů. U nemocných je v nich místo mannosu-6-fosfátu pouze mannosu. Následkem této odchylky lysosomální enzymy nejsou přemísťovány do lysosomů, nýbrž ven z buňky a lze je zjistit v krevní plazmě. V lysosomech se naopak hromadí nerozložené glykosaminy a glykolipidy. Pacient trpí psychomotorickou retardací a deformitami kostry.

**Glykosylace většiny proteinů však má asi jinou funkci než opatřit molekulu směrovacím signálem.** Oligosacharidové zbytky glykoproteinů zvyšují jejich rozpustnost a pomáhají orientovat molekulu proteinu směrem k vodné fázi. Další úlohou oligosacharidů je chránit protein (např. imunoglobulin) před účinkem proteas. Sacharidy jsou markerem pro vychytávání a následnou degradaci plazmatických glykoproteinů v játrech. Další význam je spatřován v tom, že kinetika úprav glykoproteinů v ER a GA udává krok v průchodu těchto proteinů buněčnými organelami, a tím je zajištěn čas potřebný k přesnému třídění syntezovaných proteinů.

## Targeting nezávislý na glykosylaci proteinů

Sekreční proteiny a bílkoviny plazmatické membrány nepotřebují ke správné lokalizaci oligosacharidový signál. Předpokládají se jiné typy signalizace (konformace proteinu, určitý trojrozměrný motiv v jeho struktuře). Tyto proteiny mohou být nějakým způsobem „odeslány“ do apikální nebo bazolaterální části plazmatické membrány, nebo jsou tříděny pro dvojí typ sekrece: **konstitutivní sekrece**, která je neustálá a rychlá, proteiny se v sekrečních váčcích nezahušují, nebo **řízená sekrece**, kdy se proteiny skladují a koncentrují ve vezikulech a uvolní se z buňky až na hormonální popud. Pak teprve váčky splynou s cytoplazmatickou membránou a jejich obsah se uvolní mimo buňku. Příkladem řízené sekrece je uvolňování trávicích enzymů z acinárních buněk pankreatu nebo uvolňování peptidových hormonů z endokrinních buněk.

## Targeting mitochondriálních proteinů

Většina mitochondriálních proteinů je syntezována na volných cytosolových ribosomech a postranslačně vestavována do mitochondrií. Některé bílkoviny jsou určeny pro zevní, jiné pro vnitřní mitochondriální membránu, další pro intermembránový prostor a pro matrix. O lokalizaci proteinu rozhoduje sekvence N-koncového úseku řetězce, tzv. mitochondriální vstupní sekvence, která je bohatá na bazické aminokyselinové zbytky a na serin a threonin. Pokud má protein zakotvit v zevní mitochondriální membráně, pak za vstupní sekvencí následuje zakotvující sekvence a druhý pozitivně nabitý úsek.

K prostupu proteinu vnitřní mitochondriální membránou je třeba protonový transmembránový gradient. Prostup zevní membránou tento energetický zdroj nevyžaduje. Vstupní sekvence bývá po průchodu vnitřní (nikoli zevní) membránou proteolyticky odštěpena.

Protein přenášený z cytosolu do matrix se nejdříve naváže svou presekvencí na receptor na zevní mitochondriální membráně. V místě prostupu zevní a vnitřní membrána na sebe nalehnou a protein prostupuje oběma najednou. V matrix je přenesený protein odštěpen od membránově zakotvené presekvence.

Intermembránové proteiny (např. cytochrom b) se nejdříve zakotví ve vnitřní mitochondriální membráně a speciální proteasa je pak odštěpí z mezimembránového prostoru. Některé mezimembránové bílkoviny (cytochrom c) zůstanou navázány na vnitřní membránu.

Během průchodu přes membránu se mitochondriální proteiny úplně rozvinou a pak zase obnoví terciární strukturu.

Také bakterie rozesílají syntezované proteiny pomocí signálních sekvencí. Některé jejich proteiny jsou určeny pro plazmatickou membránu, jiné pro zevní membránu, další pro periplazmatický prostor, nebo jsou zřídka uvolňovány mimo buňku. Translokace je poháněna protonovým gradientem. Analogie s mitochondriálním targetingem je tedy zřejmá.

## Targeting jaderných proteinů

Jaderné proteiny (histony, polymerasy a j.) jsou syntezovány na volných cytosolových ribosomech. Do jádra pak vstupují póry v jaderné membráně. Tyto póry se otvírají na zvláštní signál, jehož povaha zatím většinou není známa. V případě T-antigenu viru SV40 byla objevena mezi 127 a 131 pozicí sekvence aminokyselin, která je rozhodující pro vstup proteinu do jádra (jaderná lokalizační sekvence). Záměna jediné aminokyseliny tohoto úseku znemožní bílkovině opustit cytosol. Pokud je experimentálně tato sekvence vložena do struktury jiného proteinu, objeví se tato bílkovina v jádře i když jaderným proteinem není.

## Rozhodovací mechanismus k destrukci nefunkčních proteinů

Také proteiny určené k destrukci a odstranění z buňky podléhají specifickému targetingu. Biologický poločas cytosolových proteinů je velice různý, od několika minut až po více než dvacet hodin. O délce existence těchto bílkovin rozhoduje jejich N-koncová aminokyselina. Met, Gly, Ala, Ser, Thr a Val je aminokyselina č.1 stabilnějších proteinů (poločas delší než 20 hod). N-koncový Ile nebo Glu signalizují asi půlhodinové *přežití* peptidu. Pro, Leu, Phe, Asp, Lys a Arg zajistí poločas pouze několika minut. Takový krátký poločas je významný u regulačních peptidů, např. hormonů, aby změny v regulaci byly dostatečně rychlé. Tato signalizace vznikala v časně fázi vývoje života, neboť je známa u bakterií, kvasinek i savců. Mechanismus popsaného targetingu není zcela objasněn. Důležitou úlohu hraje protein **ubiquitin** (Mr=8500), který je ve všech eukaryotických buňkách. C-koncový Gly ubiquitin je kovalentně navazován na ε-NH<sub>2</sub> lysinu bílkoviny určené k degradaci. Je zajímavé, že ubiquitin je nejdříve aktivován pomocí ATP a tří enzymů a je při tom navazován na jejich skupiny -SH. Tato aktivace tedy připomíná aktivaci mastných kyselin nebo syntézu aa-tRNA (aktivaci aminokyselin), což je jeden z příkladů obecného principu, s jakými se v biochemii setkáme častěji.

## Receptorem zprostředkovaná endocytóza

Předchozí kapitoly se zabývaly targetinem vnitrobuněčných proteinů. Princip usměrňování se však uplatňuje též při příjmu proteinů z mimobuněčného prostoru endocytózou, která je zprostředkována interakcí proteinu s membránovým receptorem na povrchu buňky.

### Receptor

Zmíněným receptorem je glykoprotein, nacházející se na speciálních místech membrány, tzv. potažených jamách (coated pits). Na cytosolové straně těchto míst je plášť z klathrinu. **Klathrin** díky své trojramenné struktuře je schopen vytvářet síťovitý plášť kolem jamek membrány nebo kolem různých cytoplazmatických vezikulů, vakuol. Po dodání ATP může být klathrinová síť enzymově rozrušena a klathrin využit k dalším interakcím.

Po navázání pohlcovaného proteinu na receptor se jamka prohloubí, a klathrin nakonec vytvoří uzavřenou síť, takže se z membrány do cytoplazmy uvolní **opláštěný měchýřek** (coated vesicle). Ten pak rychle ztratí klathrinový plášť a mění se na **endozom** neboli **receptozom**. Obvykle se zvětšuje tím, že splývá s jinými endozomy. Funkce těchto organel spočívá v tom, že se v nich rozhodne, kam má být pohlcený protein dopraven. Důležitým mechanismem při tom je **okyselení obsahu endozomu**. Stane se tak činností ATP-závislé H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> – pumpy v membráně endosomu.

*Pohlcený **transferin** v kyselé prostředí uvolní Fe a předá ho do cytosolu na ferritin. Endosom pak splyne s cytoplazmatickou membránou. Komplex receptoru s apotransferinem se objeví na povrchu buňky, v prostředí s vyšším pH, ve kterém se apotransferin uvolní k novému použití.*

## Proteiny po pohlcení

Jiné proteiny pohlcené receptorem řízenou endocytózou čeká v endozomech jiný osud. **LDL-apoprotein**, přenášející cholesterol, je po navázání na membránový receptor a po endocytóze předán do lysozomu. Zde je odbourán lysozomálními proteázami, zatímco receptor je znovu použit na povrchu buňky. **Imunokomplexy**, **inzulín** nebo některé **růstové faktory** jsou v lysozomech odbourány i se svými receptory. To je příklad modulační účinku proteinových hormonů, neboť tímto způsobem se sníží jejich koncentrace v krvi i počet receptorů v cílových buňkách.

## V praxi u člověka

Receptorem zprostředkovanou endocytózou jsou transportovány IgG z mateřského mléka střevními enterocyty novorozence. Na opačné straně buňky, sousedící s kapilárou endozom přenášející komplex IgG-receptor splyne s cytoplazmatickou membránou a protilátka se uvolní do krevního oběhu dítěte i s fragmentem receptoru zvaným **sekreční složka**.

## V praxi u virů

Popsaná receptorem zprostředkovaná endocytóza se uplatňuje též při **vstupu některých virů do hostitelské buňky**. Po fúzi endozomu s lysosomem kyselé prostředí vede ke splynutí virionového obalu s lysozomální membránou, čímž se nukleokapsid s virovou nukleovou kyselinou uvolní do cytosolu.

V konečné fázi virové reprodukce se naopak nově syntetizované virové nukleokapsidy uvolní z buňky tím, že z ní *vypučí*, při čemž se obalí plazmatickou membránou.

- Také **bakteriální toxiny** (difterický a cholerní toxin) vstupují do buňky receptorem zprostředkovanou endocytózou.

## Odkazy

### Související články

*Další kapitoly z knihy **ŠTÍPEK, S.: Stručná biochemie uchování a exprese genetické informace**: [ukázat]*



**Struktura nukleových kyselin:** Základní složky nukleových kyselin • Primární struktura nukleových kyselin • Řetězec nukleové kyseliny lze štěpit neenzymovou nebo enzymovou hydrolýzou • Metody sekvencování •

**Sekundární a vyšší struktura nukleových kyselin:** Sekundární struktura DNA • Denaturace a reasociace řetězců nukleových kyselin, molekulární hybridizace • Sekundární struktura RNA • Topologie DNA; • Interakce DNA s proteiny, struktura chromosomu • Bakteriální chromosom • Eukaryotické chromosomy • DNA mitochondrií

**Biosyntéza nukleových kyselin:** Replikace DNA • Transkripce

**Biosyntéza polypeptidového řetězce - translace:** Transferové RNA (tRNA) • Aktivace aminokyselin, syntéza aminoacyl-tRNA • Funkce ribozómů v translaci • Translace u prokaryotů • Struktura ribozómů • Iniciace translace • Elongace peptidů • Terminace translace • Inhibitory bakteriální translace • Translace u eukaryotů • Struktura ribozómů • Iniciace eukaryotické translace • Elongace eukaryotické translace • Terminace eukaryotické translace • Inhibitory eukaryotické translace

**Genetický kód**

**Biosyntéza nukleových kyselin a proteosyntéza v mitochondriích:** Replikace mitochondriální DNA • Mitochondriální transkripce • Mitochondriální translace

**Řízení genové exprese a proteosyntézy:** Řízení genové exprese a proteosyntézy u prokaryot • Regulace na úrovni transkripce • Regulace sigma-faktory • Jacobův-Monodův operonový model • Regulační význam cAMP u bakterií • Variace operonového řízení genů • Tryptofanový a arabinosový operon • Řízení terminace transkripce • Regulace bakteriální proteosyntézy na úrovni translace • Řízení genové exprese a proteosyntézy u eukaryot • Regulace na úrovni uspořádání genů • Regulace na úrovni transkripce • Regulace posttranskripčních úprav pre-mRNA • Regulace na úrovni translace • Řízení rychlosti degradace mRNA • Regulace funkce proteinu kotranslačními a posttranslačními úpravami

**Posttranslační úpravy a targeting proteinů:** Signální sekvence polypeptidu, volné a vázané ribozómy • Posttranslační glykosylace proteinů • Targeting nezávislý na glykosylaci proteinů • Targeting mitochondriálních proteinů • Targeting jaderných proteinů • Rozhodovací mechanismus k destrukci nefunkčních proteinů • Receptorem zprostředkovaná endocytóza

**Biochemie virů:** Reprodukce DNA virů • Reprodukce RNA virů • Interferony

**Biochemie genového inženýrství:** Štěpení DNA na definovaném místě řetězce • Účinné dělení fragmentů DNA elektroforézou • Identifikace restrikčních fragmentů • Syntéza umělé DNA • Pomnožení a exprese izolovaného nebo umělého genu v hostitelské buňce

## **Zdroj**

- ŠTÍPEK, Stanislav. *Stručná biochemie : uchování a exprese genetické informace*. 1. vydání. Praha : Medprint, 1998. ISBN 80-902036-2-0.

## **Použitá literatura**

- ŠTÍPEK, Stanislav. *Stručná biochemie : uchování a exprese genetické informace*. 1. vydání. Praha : Medprint, 1998. ISBN 80-902036-2-0.