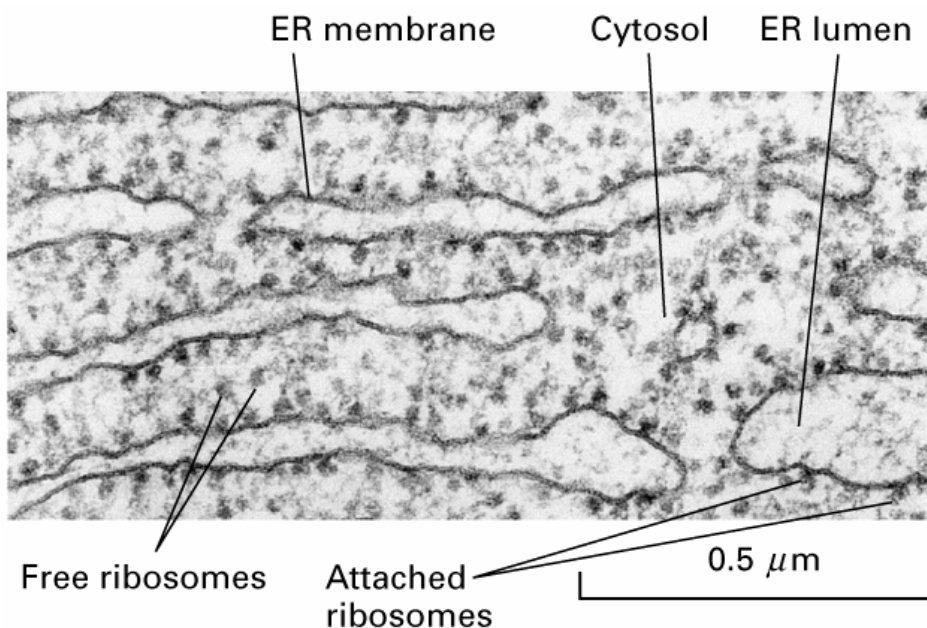
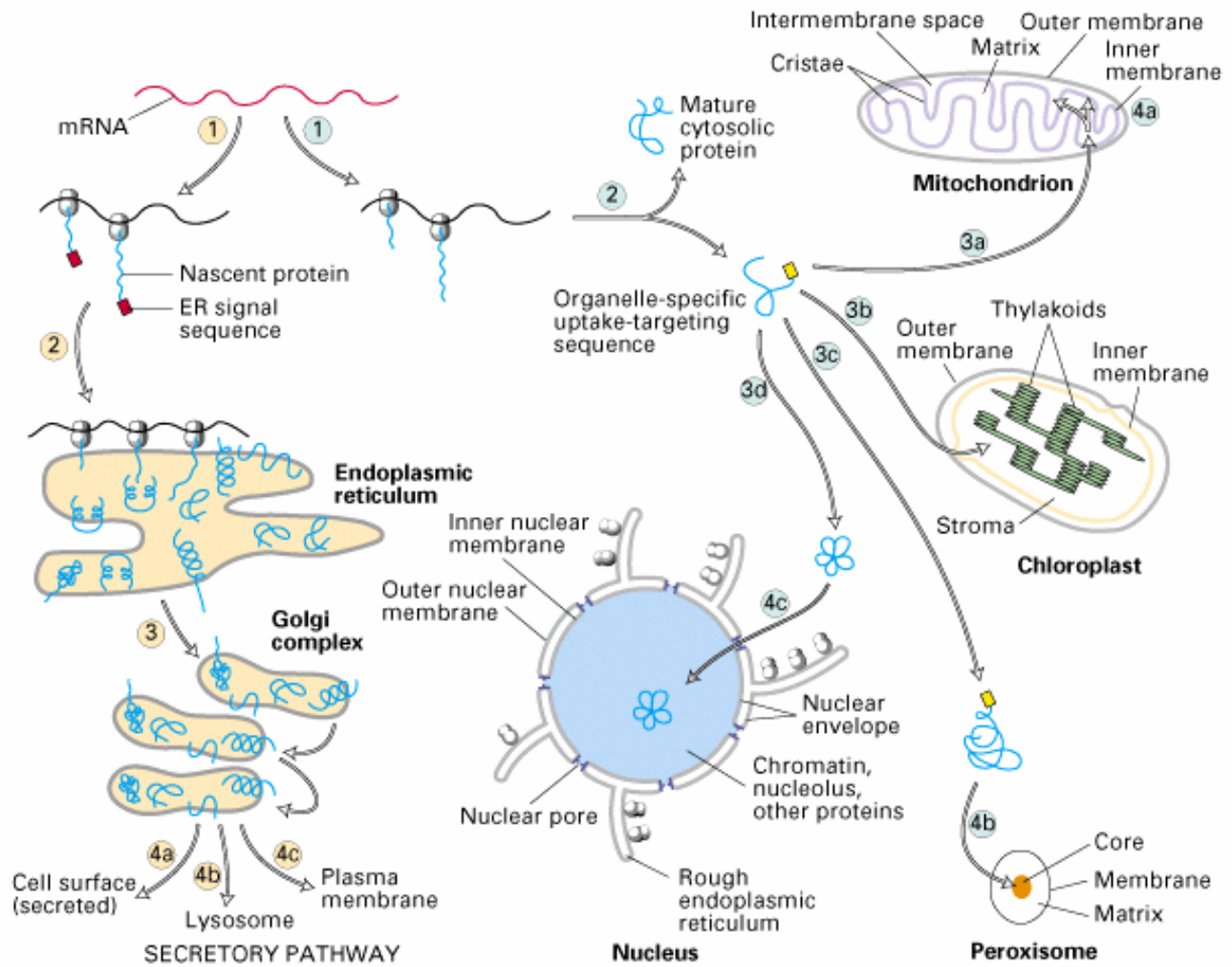
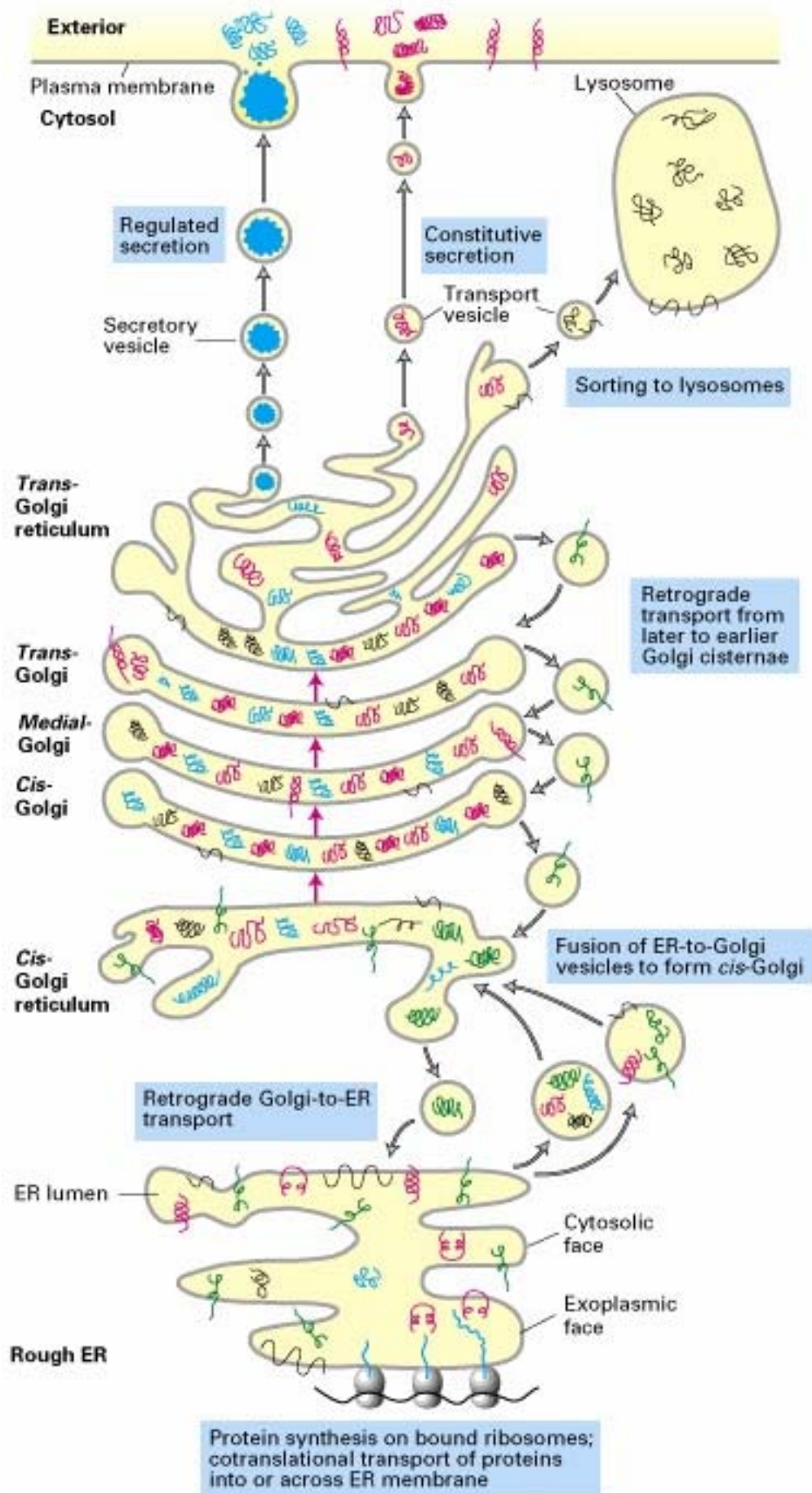
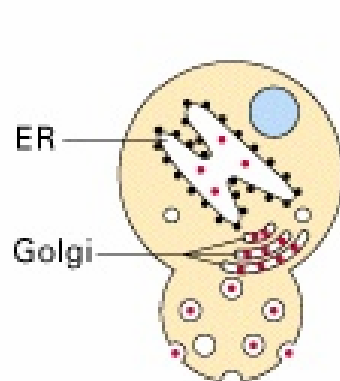


Transport - protein sorting

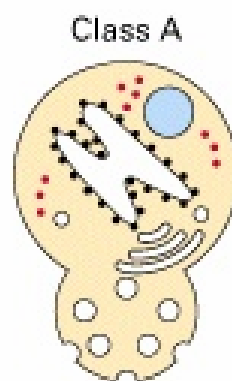






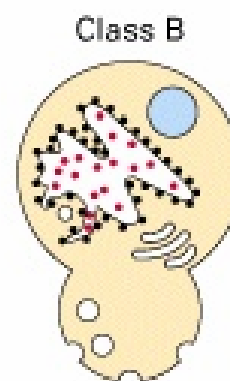
Fate of secreted proteins
Normal secretion

Defective function



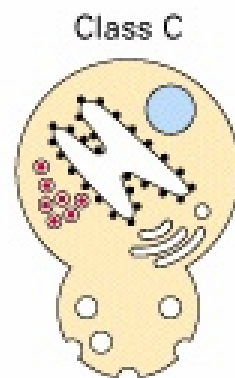
Class A
Accumulation in the cytosol

Transport into the ER



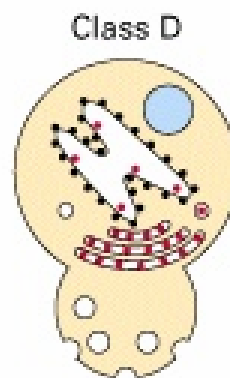
Class B
Accumulation in rough ER

Budding of vesicles from the rough ER



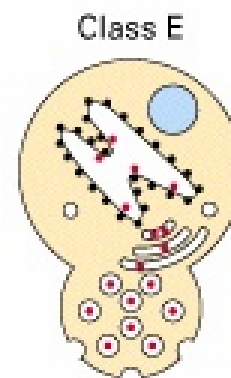
Fate of secreted proteins
Accumulation in ER-to-Golgi transport vesicles

Defective function
Fusion of transport vesicles with Golgi



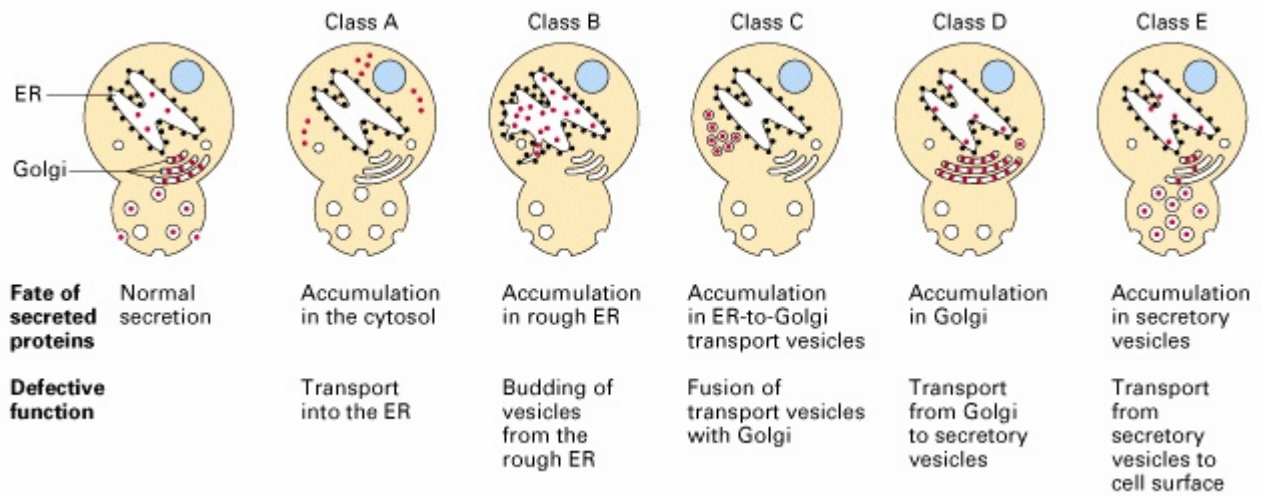
Class D
Accumulation in Golgi

Transport from Golgi to secretory vesicles



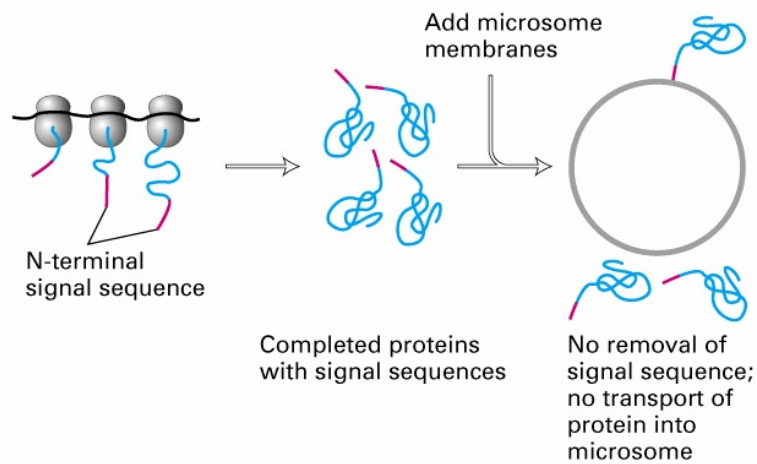
Class E
Accumulation in secretory vesicles

Transport from secretory vesicles to cell surface

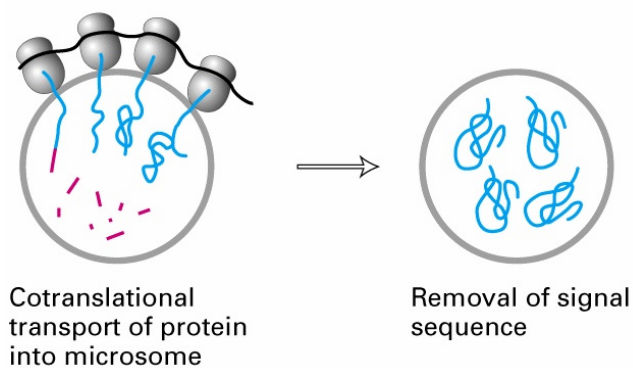


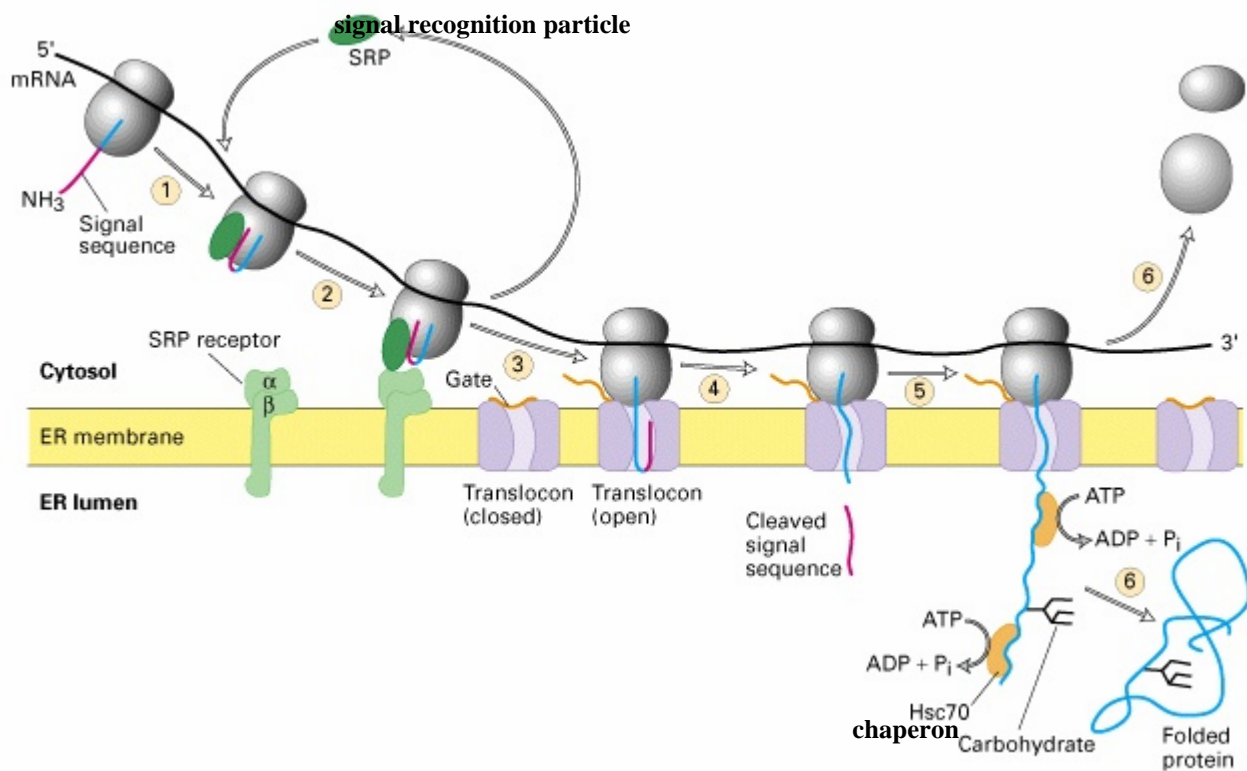
Translokace proteinů přes membránu ER

(a) Cell-free protein synthesis; no microsomes present

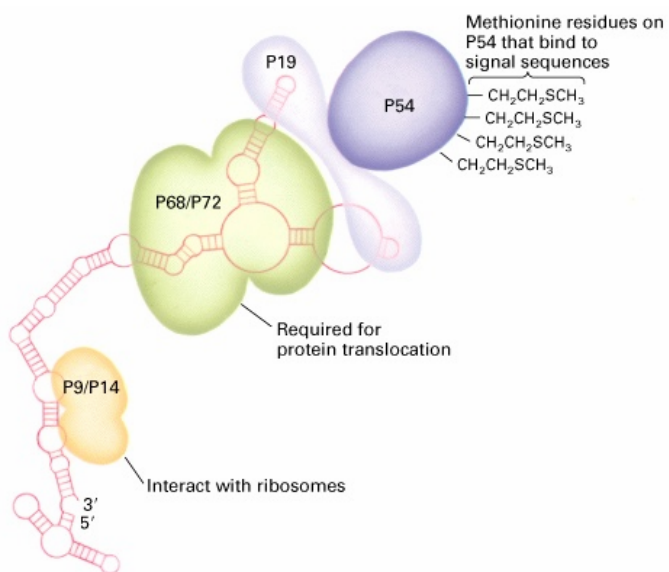


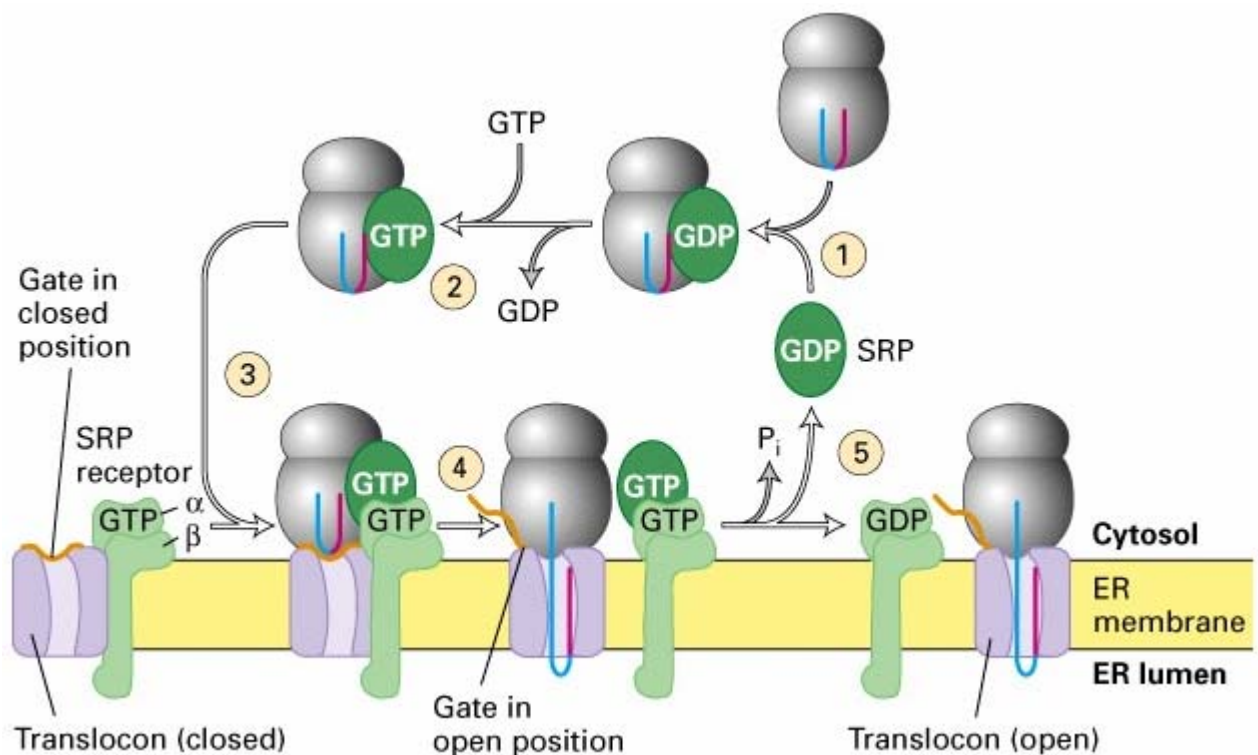
(b) Cell-free protein synthesis; microsomes present



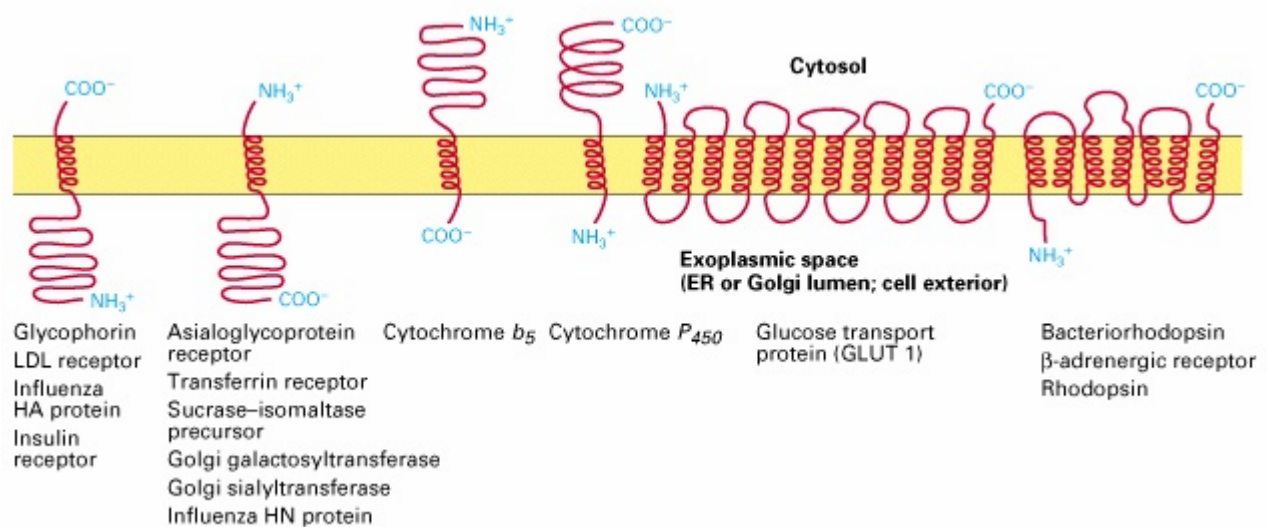


signal recognition particle

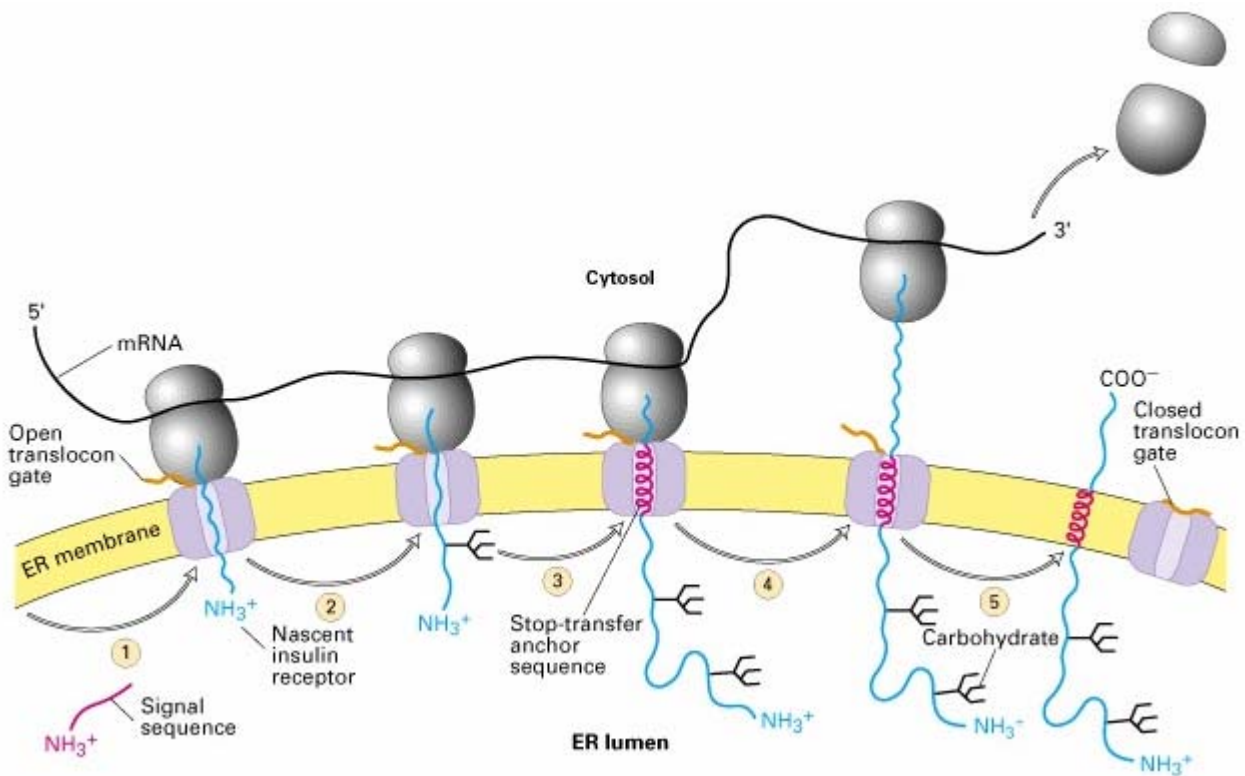




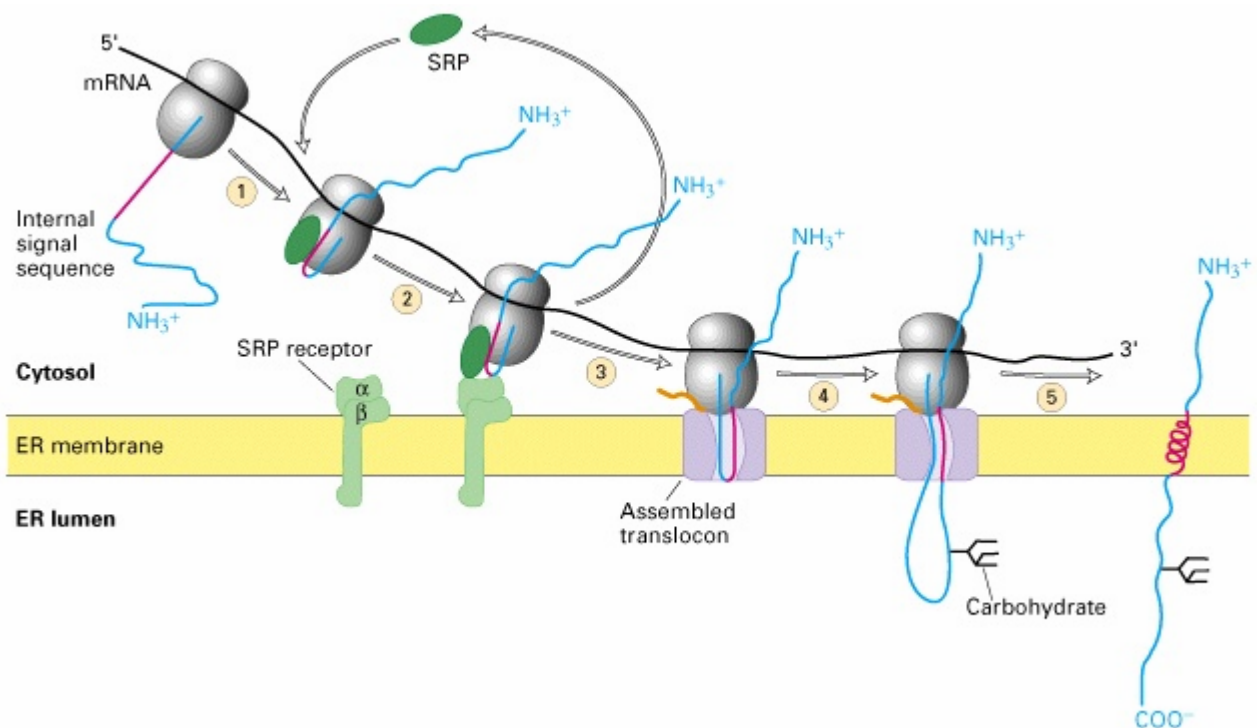
Inserce membránových proteinu do membrany ER



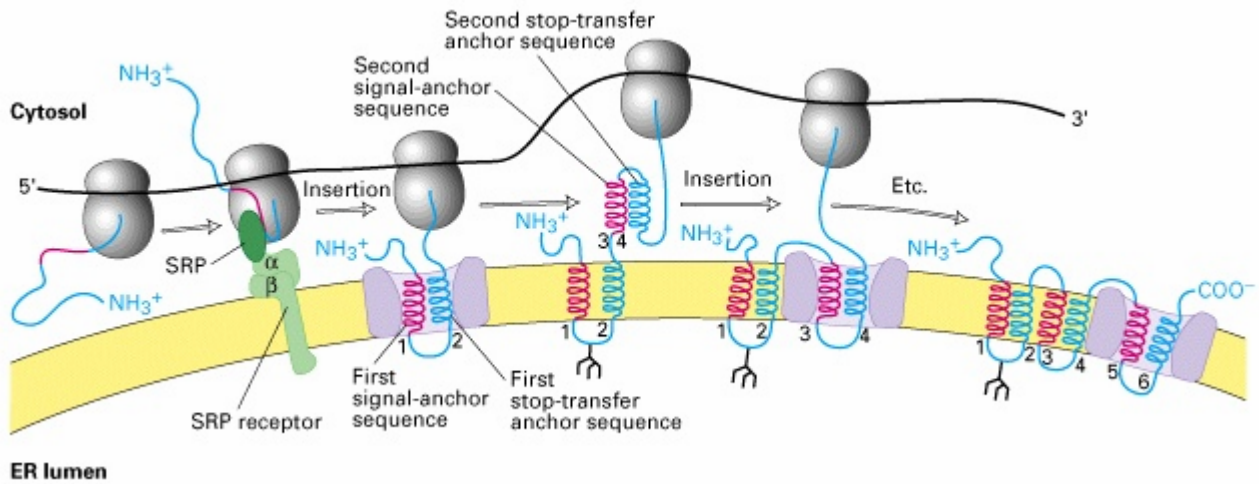
Insertce insulinového receptoru (a podobných proteinu) - vnitřní “stop-transfer membrane-anchor” sekvence



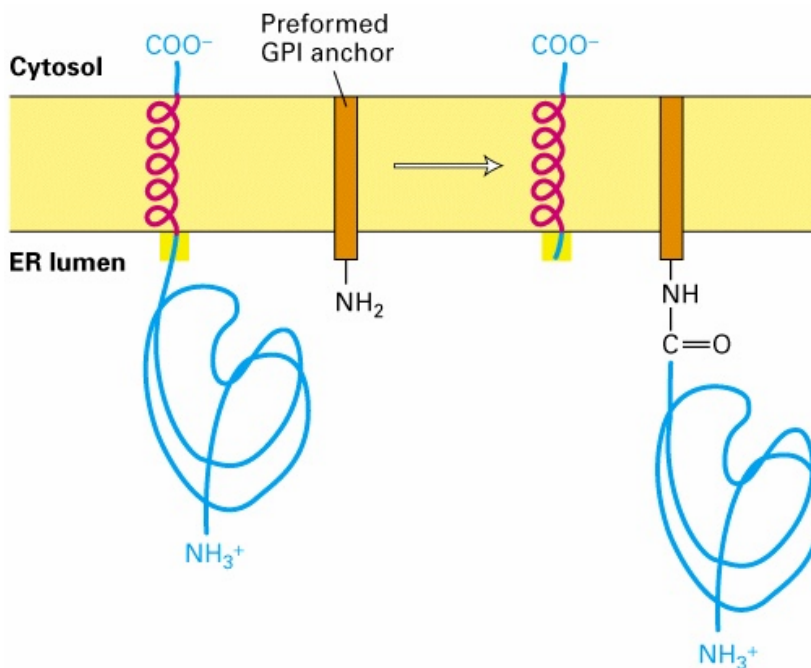
Insertce asialoglykoproteinového receptoru (a podobných proteinu) - vnitřní “signal-anchor” sekvence



Transmembranové proteiny s více transmembránovými doménami - “multiple topogenic” sekvence



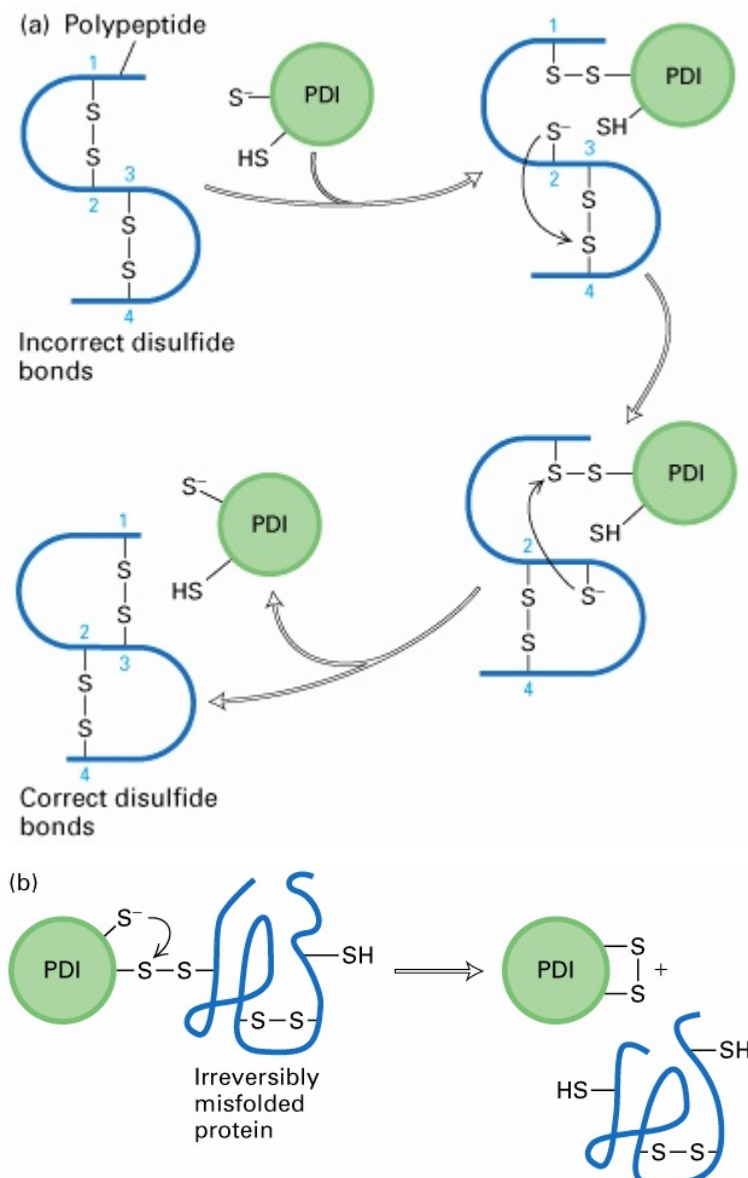
Některé proteiny po inserci do ER membrány - transport k GPI kotvě



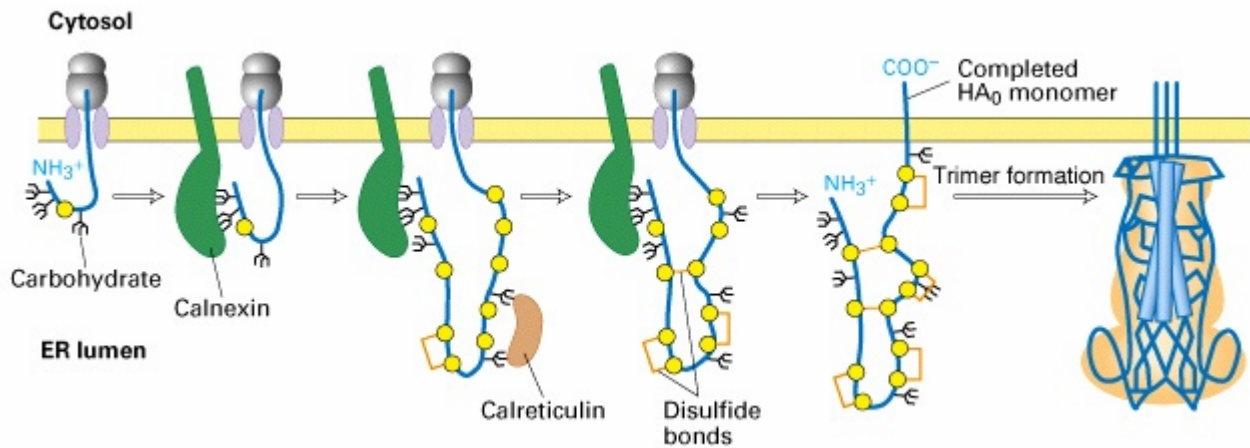
Post-translační modifikace a “kontrola” kvality proteinu v drsném ER

1. Tvorba disulfidických mustku	drsné ER
2. Správný “folding”	drsné ER
2. Připojení a úprava carbohydratu	drsné ER + další
3. Specifické proteolytické štěpení	drsné ER + další
4. “Assembly” multimerních proteinu	drsné ER

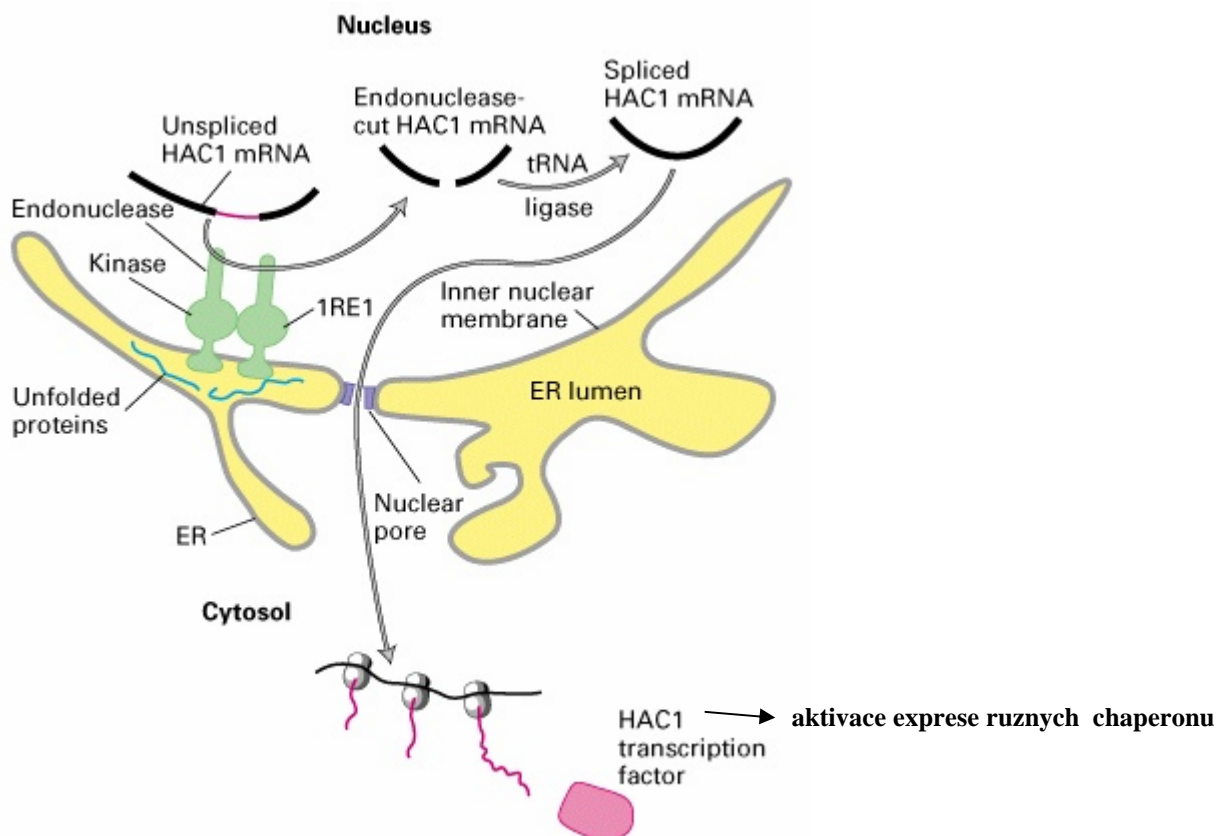
1. Tvorba disulfidických mustku (-S-S-)



2. Správný “folding” - zprostředkován řadou proteinu ER



Kontrola správně sbalených proteinu pro transport ER - GA

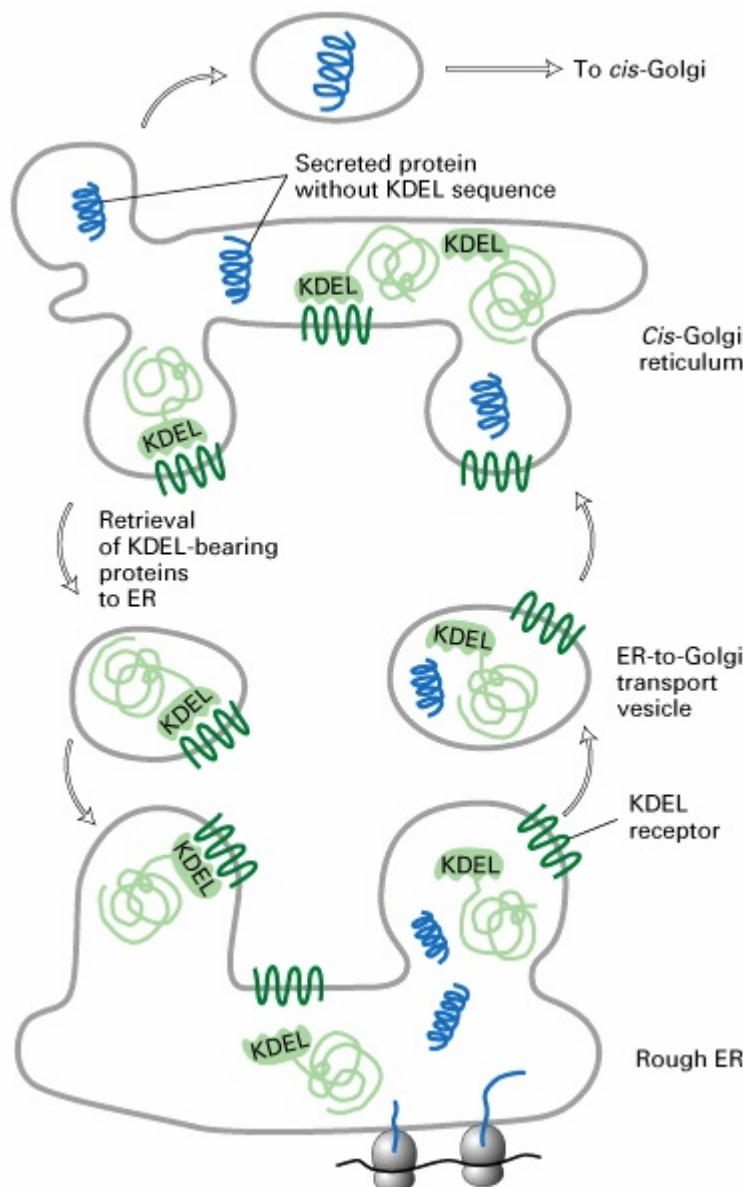


Mnoho špatně assemblovaných proteinů je z ER transportováno do cytosolu a degradováno

- “špatné” sekretorické i membránové proteiny - degradace za 1-2 hod-
- transport zpět do cytoplasmy přes “translokon”
- degradace prostřednictvím ubiquitin/proteasomu
- 2 ubiquitin konjugující enzymy - lokalizace na cytosolickou stranu ER
- ? Mechanismus rozpoznání a transportu ven z ER

Proteiny ER se do ER vrací zpět z Cis-Golgi cisteren

- “residentní” proteiny ER (Hsc70, PDI ...)
- specifická C-koncová sekvence KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) - nezbytná a dostačující pro udržení proteinu v ER.



- KDEL receptor - “záchytává” proteiny s KDEL sekvencí, lokalizace v membránách malých transportních vesíků mezi cis-Golgi a ER + v cis-Golgi

- + ER proteiny - oligosach. řetězce s modifikacemi specifickými pro cis-Golgi

Glykosylace proteinů v ER a GA

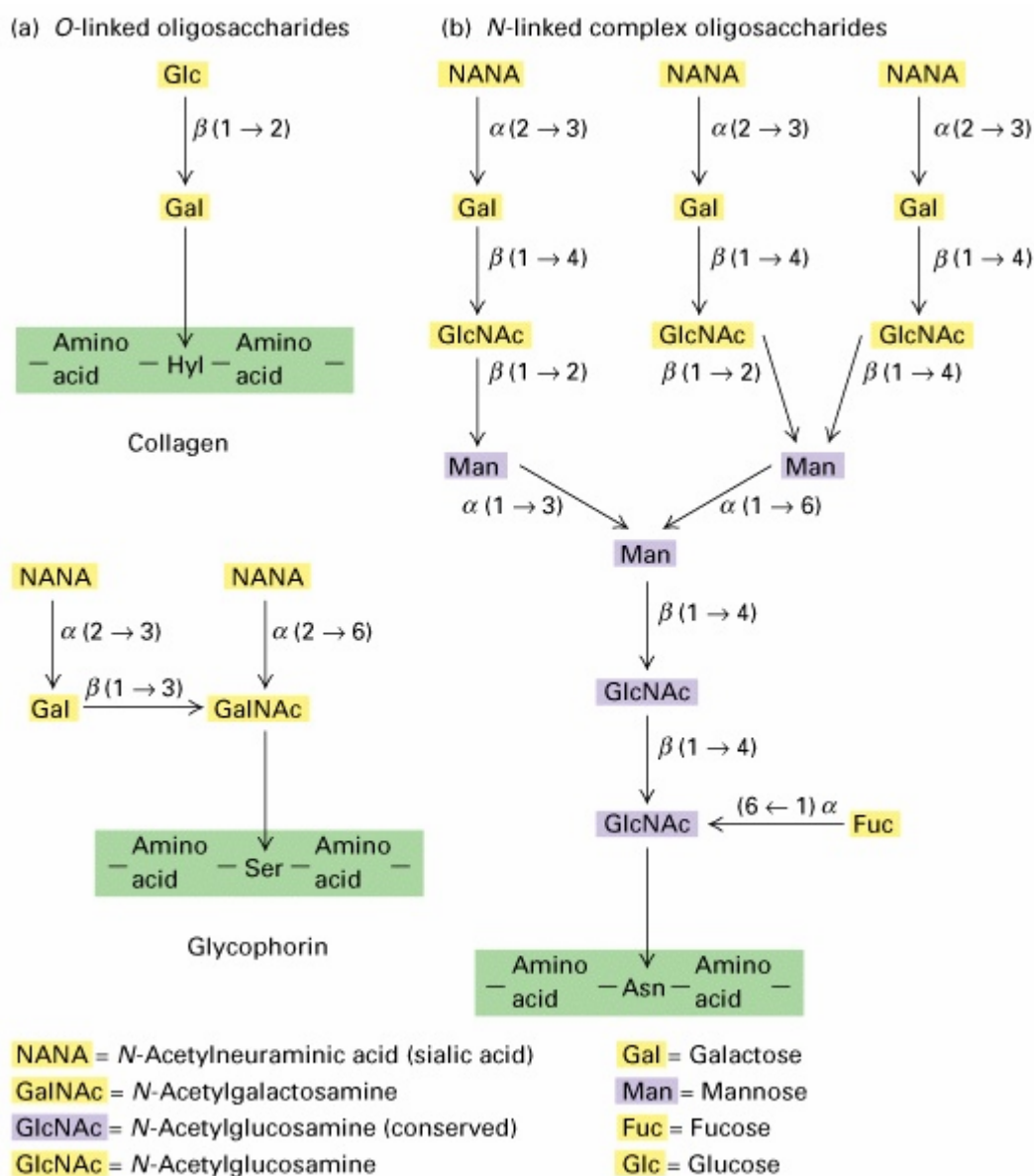
N a O glykosylace: velmi odlišné, různé cukerné zbytky

O-glykosylace: oligosacharidy připojeny a) k hydroxylové skupině Ser nebo Thr prostřednictvím N-acetylgalactosaminu nebo b) k hydroxylové skupině hydroxylysinu přes galaktosu (kolageny).

- oligosacharidy krátké (1-4 cukerné zbytky)
- biosynthesa: přidávání cukru „po jednom“, různé GLYKOSYLTRANSFERASY

N-glykosylace: N-acetylglukosamin je připojen k amidoskupině Asn

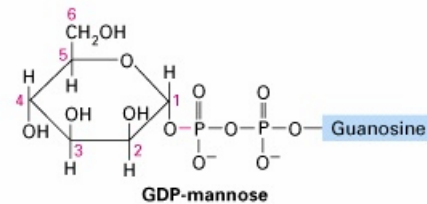
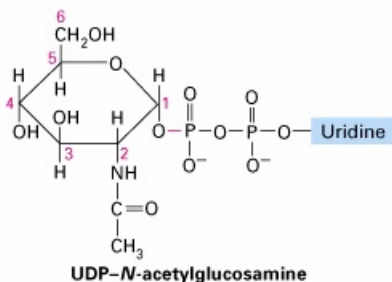
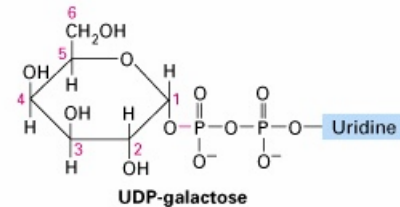
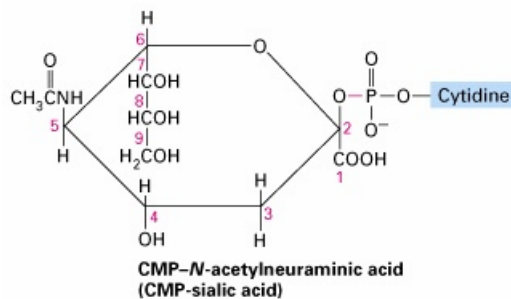
- složité oligosacharidy (manosa, k.sialová, větvení)
- biosynthesa: připojování dlouhých „preformovaných“ oligosacharidu (14 cukerných zbytků)



Většina cytosolických a jaderných proteinů není glykosylována (vyjimka - některé transkripční faktory + proteiny lokalizované v komplexu jaderného póru).

O-glykosylace

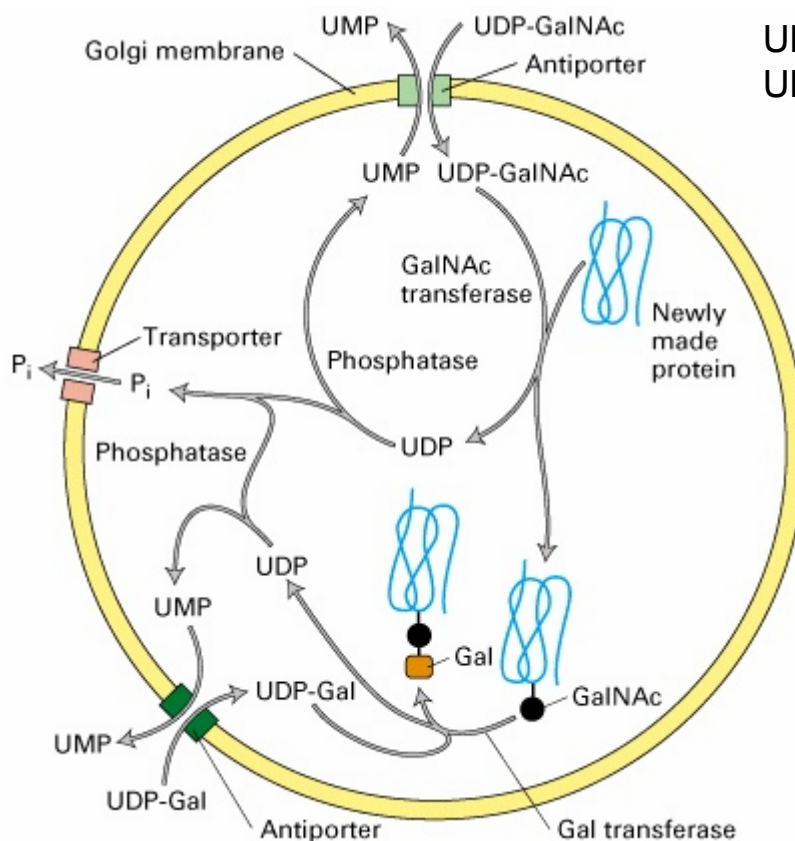
Prekursory: nucleoside di-P nebo mono-P cukry



Glykosyltransferasy: integralní membránové proteiny, specifické - donor / akceptor

Nucleotid-cukr: - syntéza v cytosolu z NTP a cukr-fostátu.

- import do ER a GA - specifické antiportrové proteiny (nukleotidy ven, UMP, CMP, GMP)



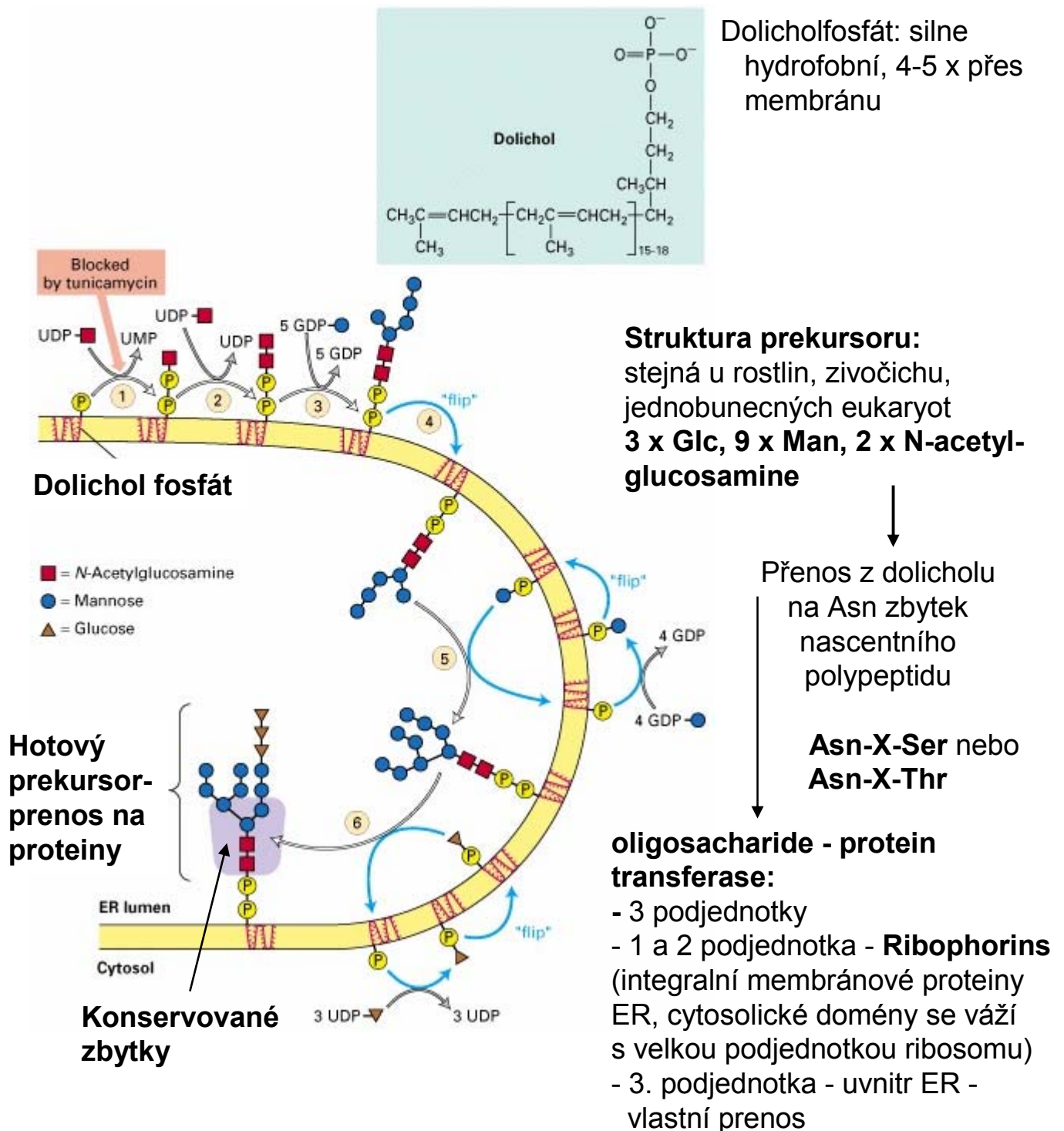
UDP-Gal = UDP-galaktosa

UDP-GalNAc = UDP- N-acetyl-galaktosamine

N-glykosylace

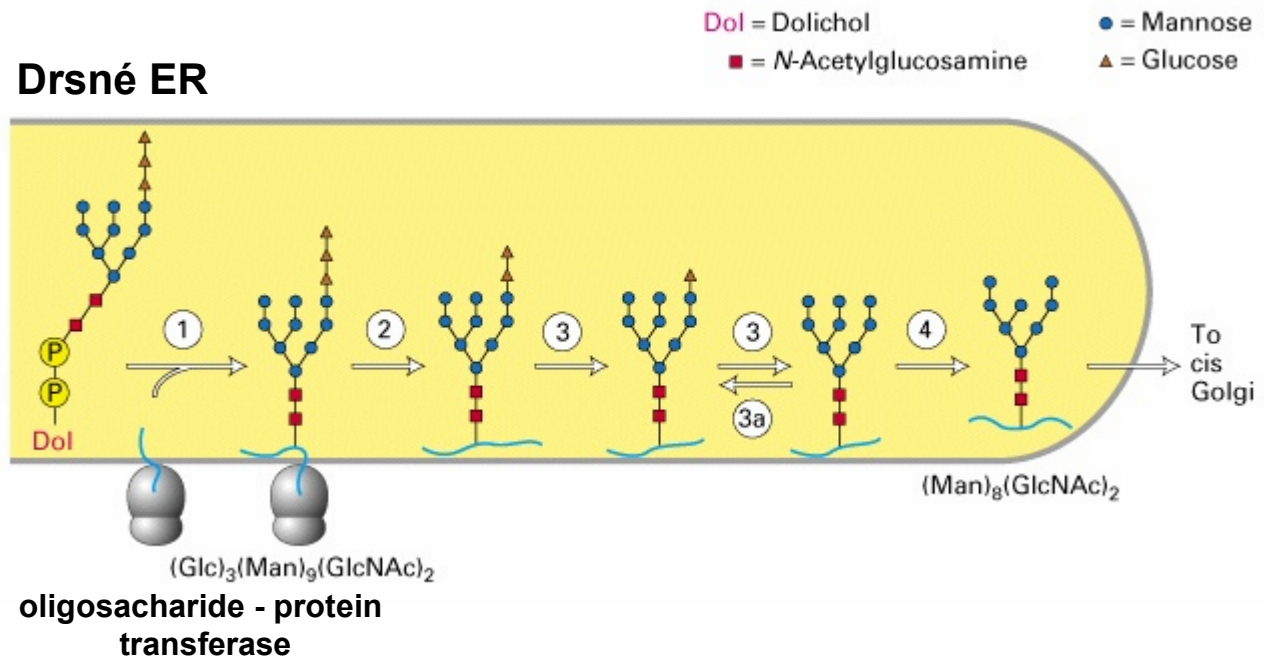
Biosynthesa N-oligosacharidu začíná v drsném ER připojením dlouhého prekursoru - vázán na **DOLICHOL**= polyisoprenoid lipid (79-95 C) v membráně ER "**prenasec oligosacharidu**".

Dolichol pyrophosphoryl oligosacharid - tvorba na ER membráně. Oligosacharid - orientován směrem do lumen ER.



Ne všechny sekvence Asn-X-Ser nebo Asn-X-Thr glykosylovány

Drsné ER



3 Glc + 1 Man jsou odstraněny

Glc zbytky - ? signál, že oligosacharid je připraven k přenosu na protein

Glucosyltransferasa - lumen ER - znovu přidává 1 Glc zbytek

- glukosylace špatně sbalených proteinů (ne nativních)

Calnexin, Calreticulin: selektivní vazba na re-glukosylované oligosacharidy, zabrání "sbalení" sousedních AA segmentu, po uvolnění deglukosylace.

↓ **Přechod do GA -**

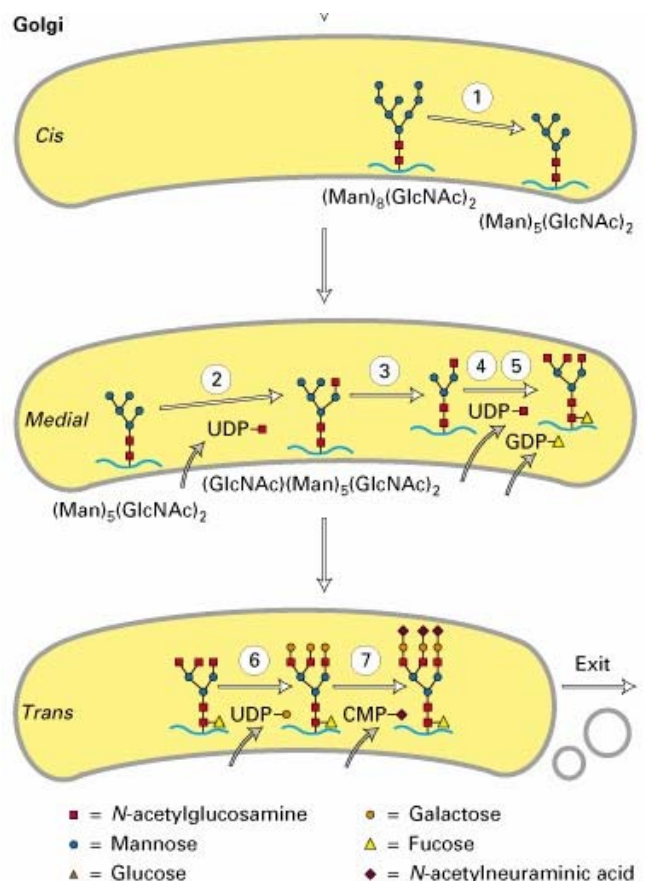
další modifikace

(různé enzymy v cis, medial a trans GA)

- **variabilita** - některé modifikace proběhnou, jiné ne

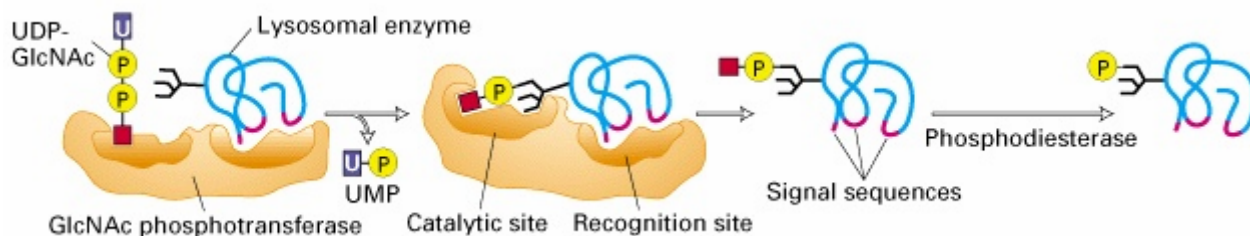
Oligosacharidy:

- někdy nutné pro **správný "folding"**, x řada sekretorických proteinů se "sbalí" správně a je transportována i bez glykosylace.
- rozdíly ve **stabilitě** - glykosylované obvykle stabilnější než neglykosylované



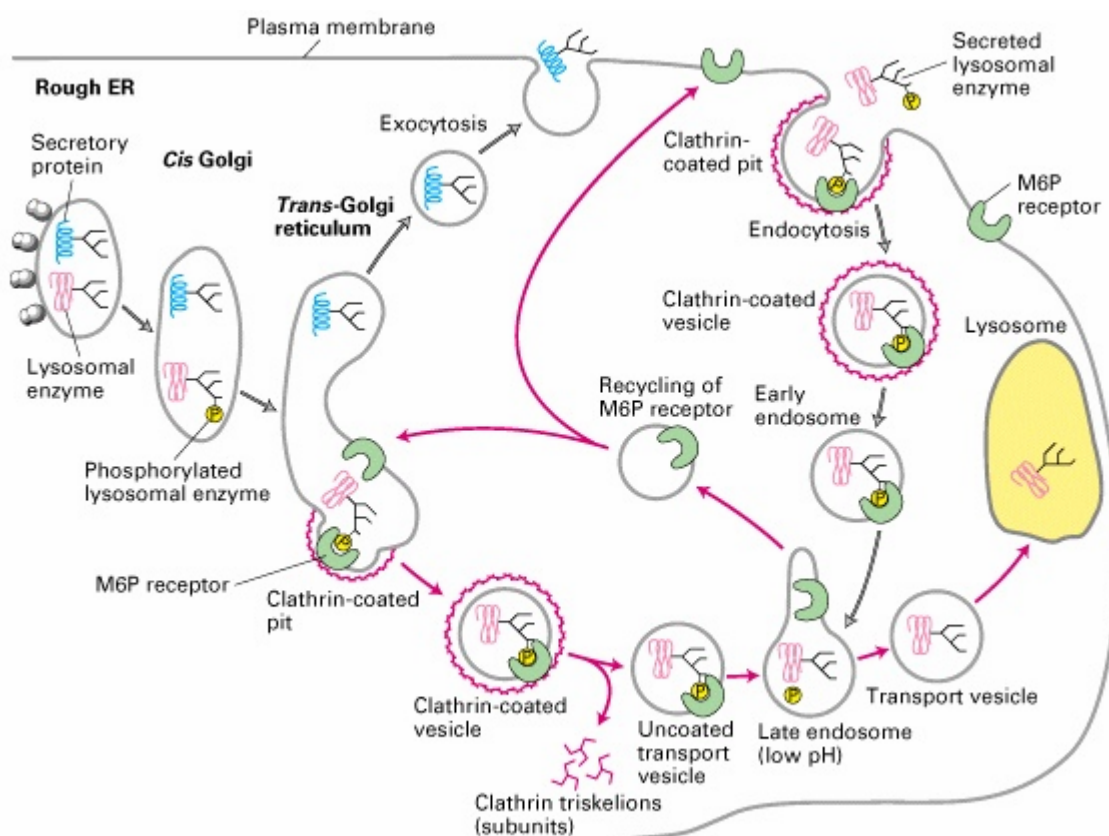
Některé N-oligosacharidy - smerování lysosomálních enzymů do lysosomu

- přidání a počáteční processing oligosacharidových prekurzorů v drsném ER je stejný pro membránové, sekretorické i lysosomální enzymy.
- **v cis-Golgi** - manosové zbytky (1-více) **FOSFORYLACE** - 2 kroky:
 - a) připojení N-acetyl-glucosamin fosfátu (GlcNAc fosfotransferasa)
 - b) odstranění N-acetyl-glucosaminu fosfodiesterasou - zůstává **mannosa-6P**



mannosa-6P - vazba mannosy 6-P receptory - v trans Golgi

- **VESIKLY** obsahující M6P receptory - “pucení” z trans Golgi a fúze s organelami “**late endosomy**” (vnitřní pH 5.5).
- M6P váže M6P-receptory při pH > 6, M6P se uvolní v endosomech + fosfatasa uvnitř endosomu - defosforylace lysosomálního enzymu



Z “**late endosomu**” - pucí 2 typy vesiklu. 1) obsahují lysosomální enzymy, ale nikoli M6P receptory - fusují následně s **LYSOSOMY**; 2) recyklují M6P-receptory (zpět do trans-Golgi nebo na buněčný povrch)
 M6P-receptor- přenáší neaktivní lysosomální **proenzymy**, aktivace v “late endosomü” nebo lysosomu

Protein “sorting” a “processing” - Golgi a post-Golgi

Golgi-enzymy: inserce do membrány drsného ER, pohyb transportními vesikly do GA. Různé GA-lokalisované enzymy (napr. glykosylací) - podobná struktura: N-terminální doména (cytosol), 1 x transmembránový alpha-helix (**důležitý pro lokalisaci v Golgi, zabránění transportu dále, ? mechanismus**), C-koncová doména (GA-lumen) s katalytickým místem

• Kontinuální versus regulovaná (reakce na stimul) sekrece proteinu

Sorting do regulované dráhy - kontrola selektivní agregací proteinů.

- Nematurované vesikly (pucí z trans-Golgi) - zabalené do **CLATHRINU**, obsahují core tvorené agregovaným sekretorickým proteinem (k agregaci zřejmě dochází před inkorporací do vesiklu).
- Regulované sekretorické vesikly (savčí bunky) obsahují 2 proteiny **CHROMOGRANIN B** a **SECRETAGRANIN II** (agregují při inkubaci při pH 6.5 a Ca) jsou i v trans-Golgi. Agregáty se netvoří při neutrálním pH (v ER)
? Selektivní agregace regulovaných proteinu - sorting do regulovaných vesiklu

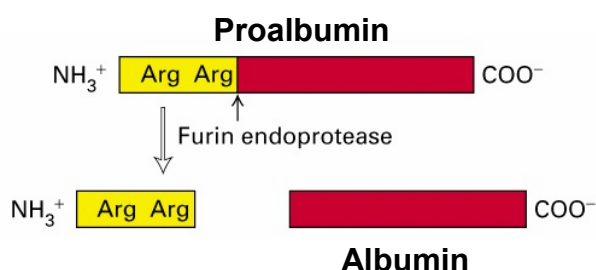
• Proteolytický “processing” pro-proteinu

- některé proteiny plasmatické membrány a většina sekretovaných proteinu - syntéza jako inaktivní prekursor (“proproteiny”) (albumin, insulin ...)
- většinou probíhá v sekretorických vesiklech odvozených z trans-Golgi

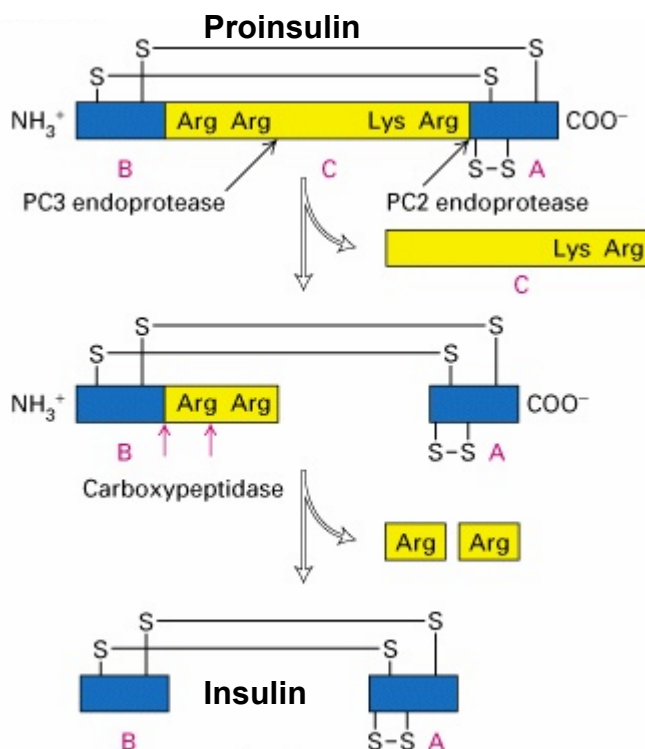
Endoproteasy:

Stepí za sekvencemi **Arg-Arg** nebo **Lys-Arg** (kvasinkový homolog KEX2) savčí bunky : **Furin, PC3, PC2**

A) Konstitutivní sekrece

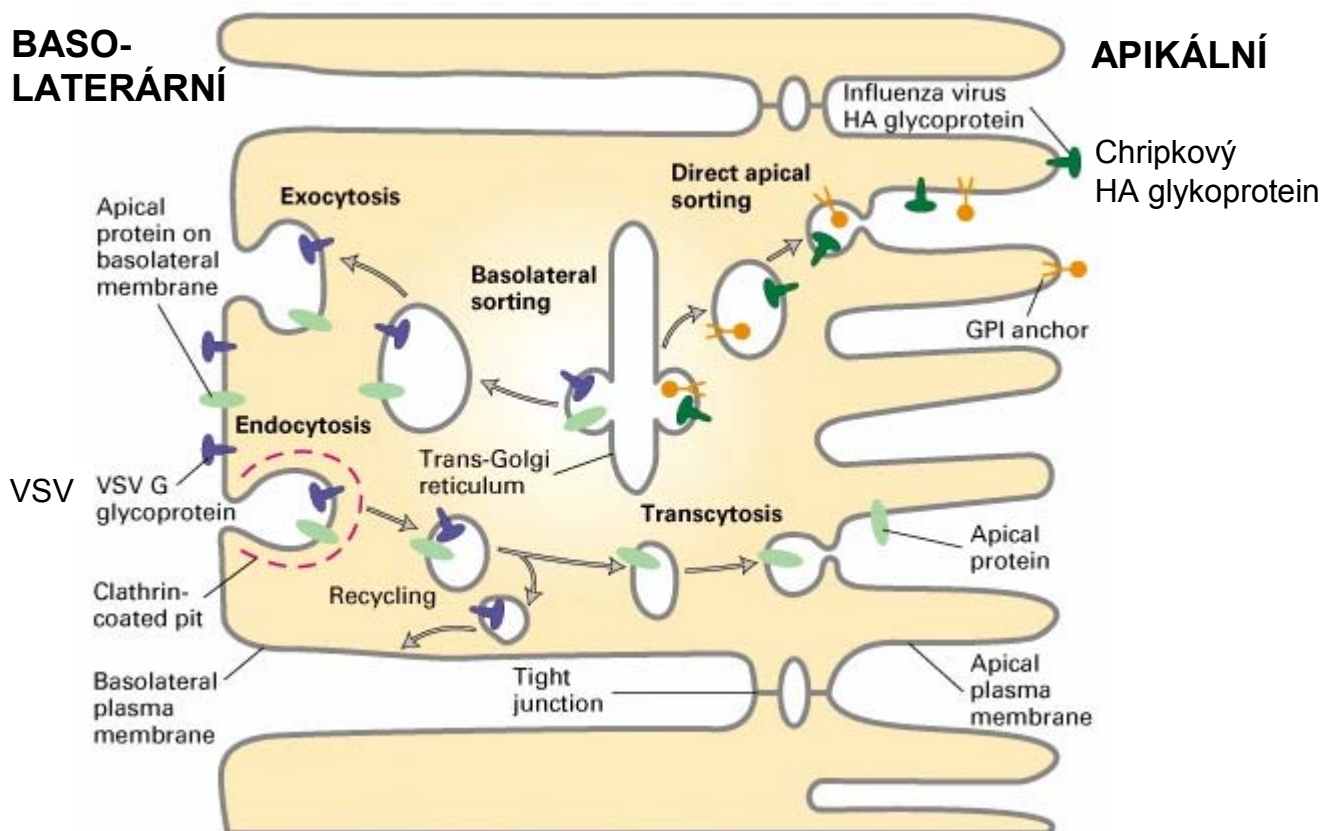


B) Regulovaná sekrece



• Sorting proteinu z GA do apikální nebo basolaterární membrány

- Plasmatická membrána polarisovaných epitheliálních bunek - 2 domény - apikální a basolaterární - různé proteiny - specifický sorting (rada mechanismu)
- sorting v **trans-Golgi** - proteiny, které finalně lokalizují na různých místech, v trans-Golgi nalezeny na stejné membráně. - 2 typy vesiklu “puči” z trans-Golgi
1 typ - fúzuje s apikální membránou, 2 typ fúzuje s basolaterární membránou. Vesikly obsahují specifické **Rab** a **V-SNARE** proteiny - role v lokalizaci do správného místa.
- napr. proteiny s GPI (glycosylphosphatidyl inositol) kotvou - v různých typech bunek specifické lokalisace
- kromě GPI kotvy nebyly identifikovány unikátní sekvence pro specifický targeting, ? Mnohonásobné sekvence
- Hepatocyty: všechny proteiny nejprve z trans-Golgi do basolaterární membrány, poté jak basolaterární tak apikální proteiny - endocytosa to vesiklu - dráhy se odliší, basolaterární se vrátí zpět, apikální se prostřednictvím transportních vesiklu dostanou do apikální membrány - **TRANSCYTOSA**
- role **cytoskeletu**



Infekce bunek VSV virem a chripkovým virem

Receptorem zprostředkovaná endocytosa, sorting internalisovaných proteinu

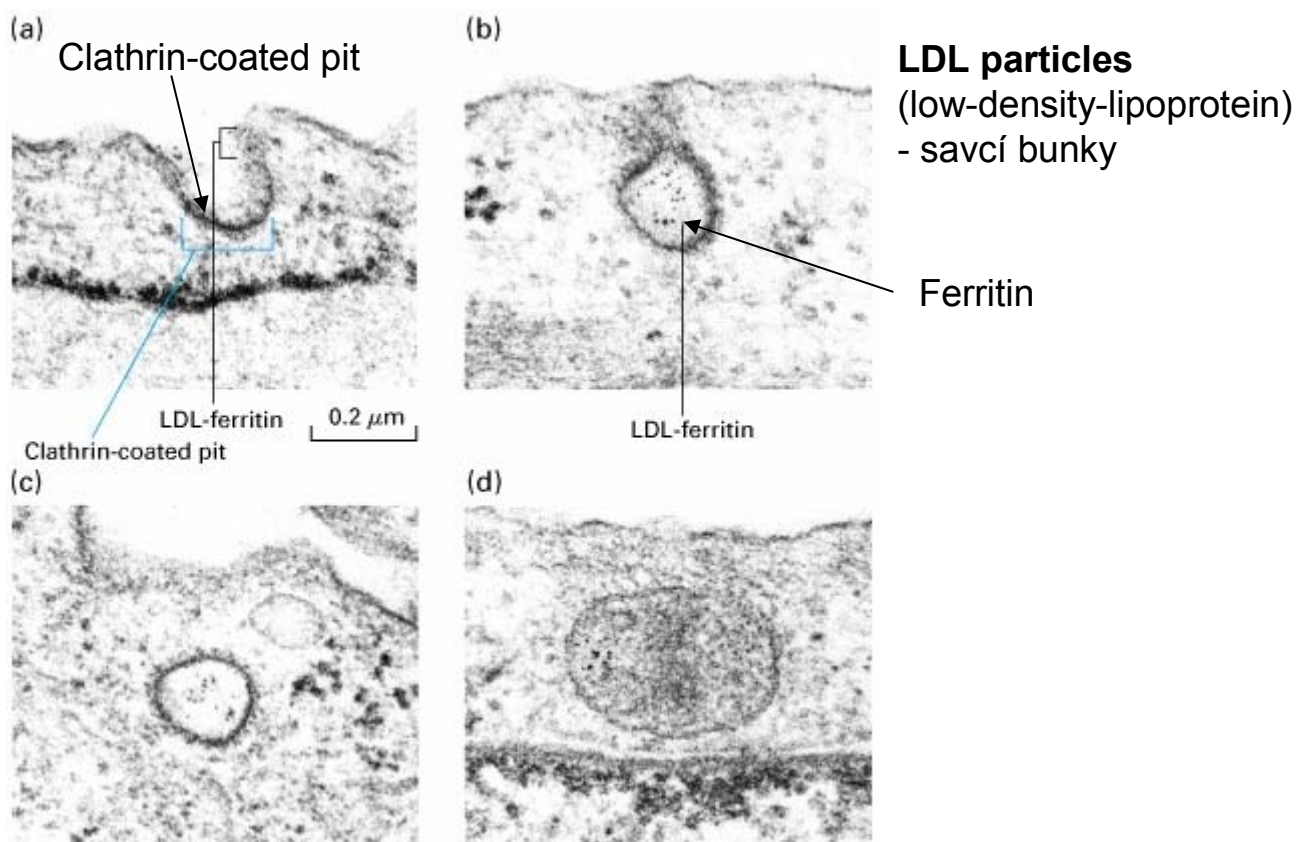
- Internalisace materiálu z okolí - **fagocytosa** (závislá na aktinu, pouze specialisované bunky) a **endocytosa** (tvorba membránových vesiklu o velikosti 0.05 - 0.1 μm ; vetsina eukaryotických bunek)

Endocytosa:

- pinocytosa** (nespecifická, příjem “kapek” z okolí)
- receptor-mediated endocytosis**: specifický receptor na bunecném povrchu - vazba na extracelulární makromolekulu (ligand) - endocytosa, receptor - ligand komplex - inkorporace do intracelulárního transportního vesiklu

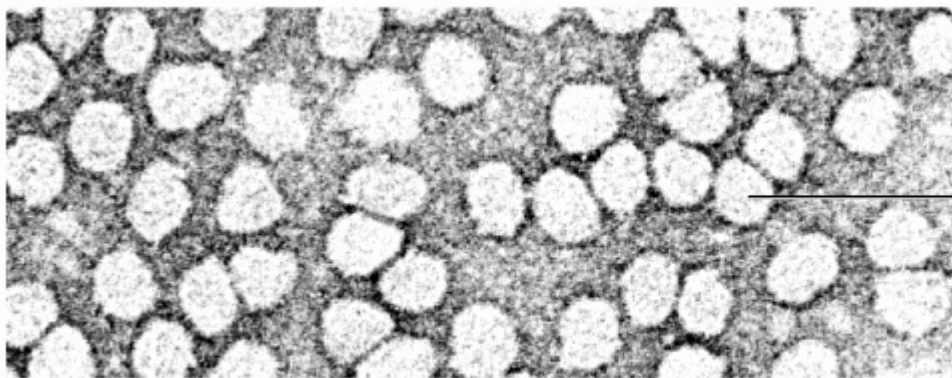
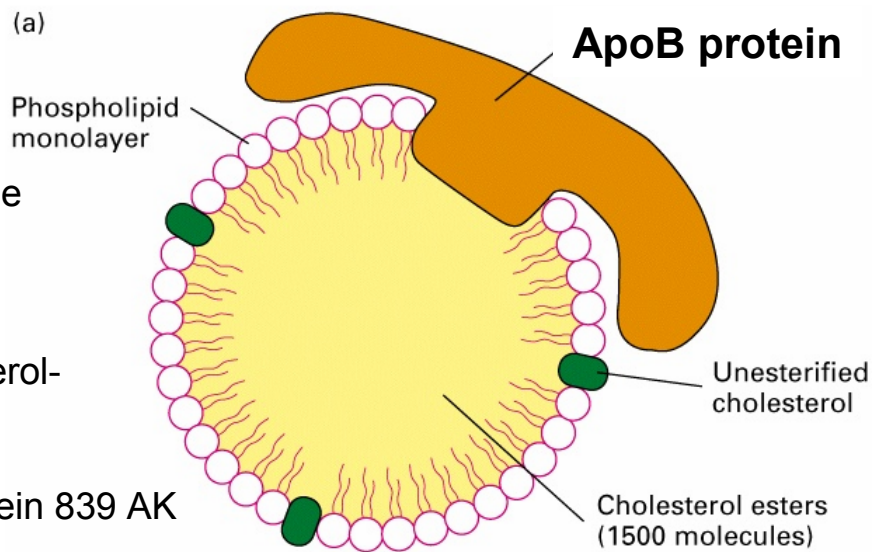
CAVEOLAE (invaginace plasmatické membrány) obsahují membránový protein **caveolin**, obsahují některé receptorové proteiny - specifický typ endocytosy

X nejcastejší receptor-endocytosa CLATHRINOVÉ VESIKLY (clathrin coated pits) - tvorí asi 2 % povrchu některých bunek (napr. hepatocyty a fibroblasty)



LDL (low-density lipoprotein) - PARTIKULE

- přenášejí cholesterol v krvi
- 20-25 nm v průměru (a)
- většina savčích buněk produkuje povrchový receptor, který váže a internalisuje LDL partikule
- po endocytose, LDL transport do lysosomu hydrolasy štěpí ApoB na aminokyseliny a cholesterol-estery na cholesterol a mastné kyseliny
- LDL receptor - glykoprotein 839 AK transmembránový

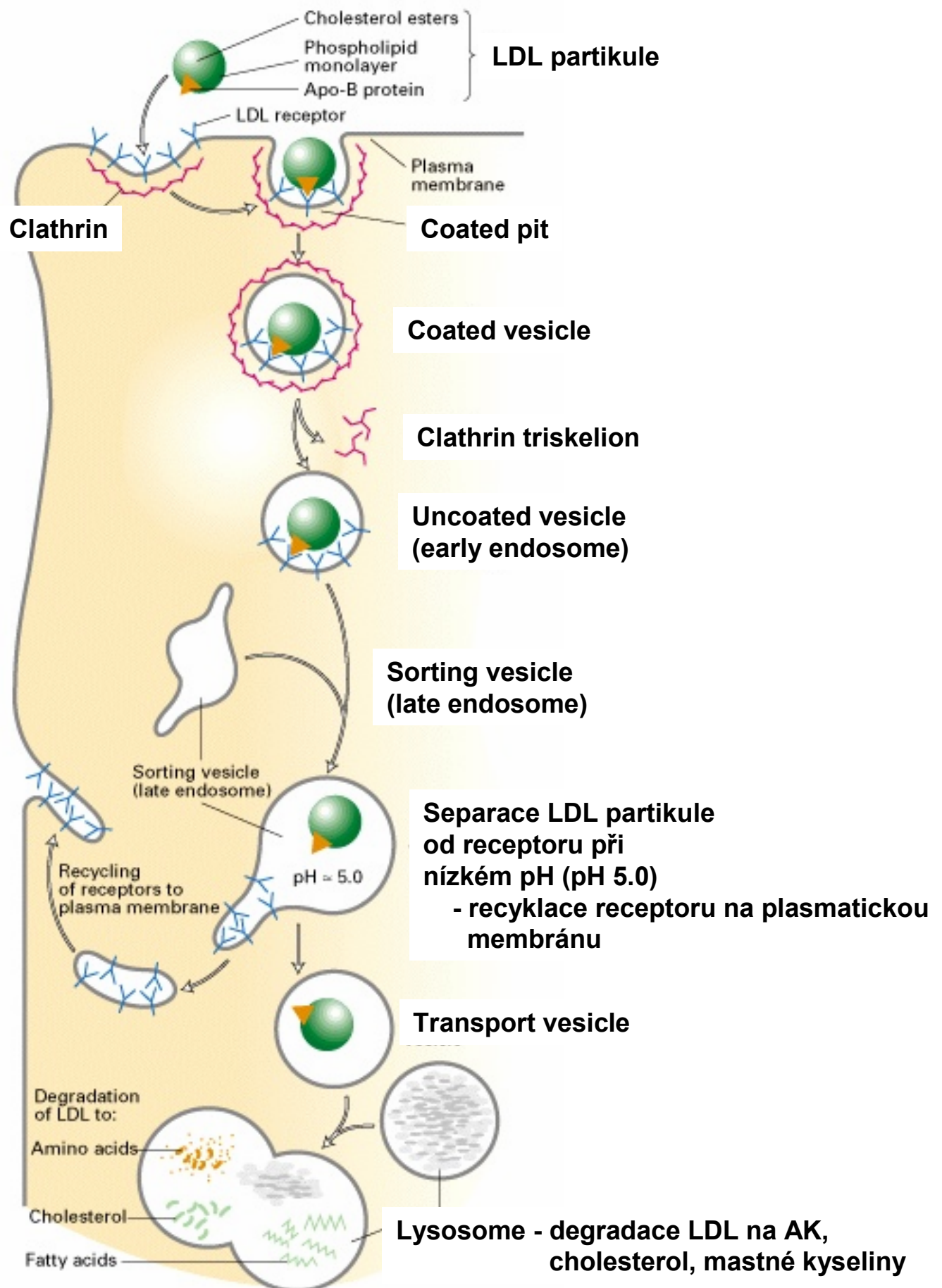


0.1 μm

LDL particle

“LATE ENDOSOMES” - acidické pH

- fibroblasty - internalisace cca 50 % povrchových proteinů / hod.
 - většina povrchových receptorů - opakovaně “umístí” ligand uvnitř buňky a vrátí se do membrány.
 - napr. LDL receptory - cyklus za 10-20 min
 - X některé receptory (napr. insulin, růstové faktory) - cyklus jen 2-3 x a poté degradovány v lysosomech (- snížení citlivosti buňky k hormonální signalizaci)
 - disociace receptoru a ligandu - obvykle v “late endosomech”
- “late endosomy”: obvykle blízko buněčného povrchu

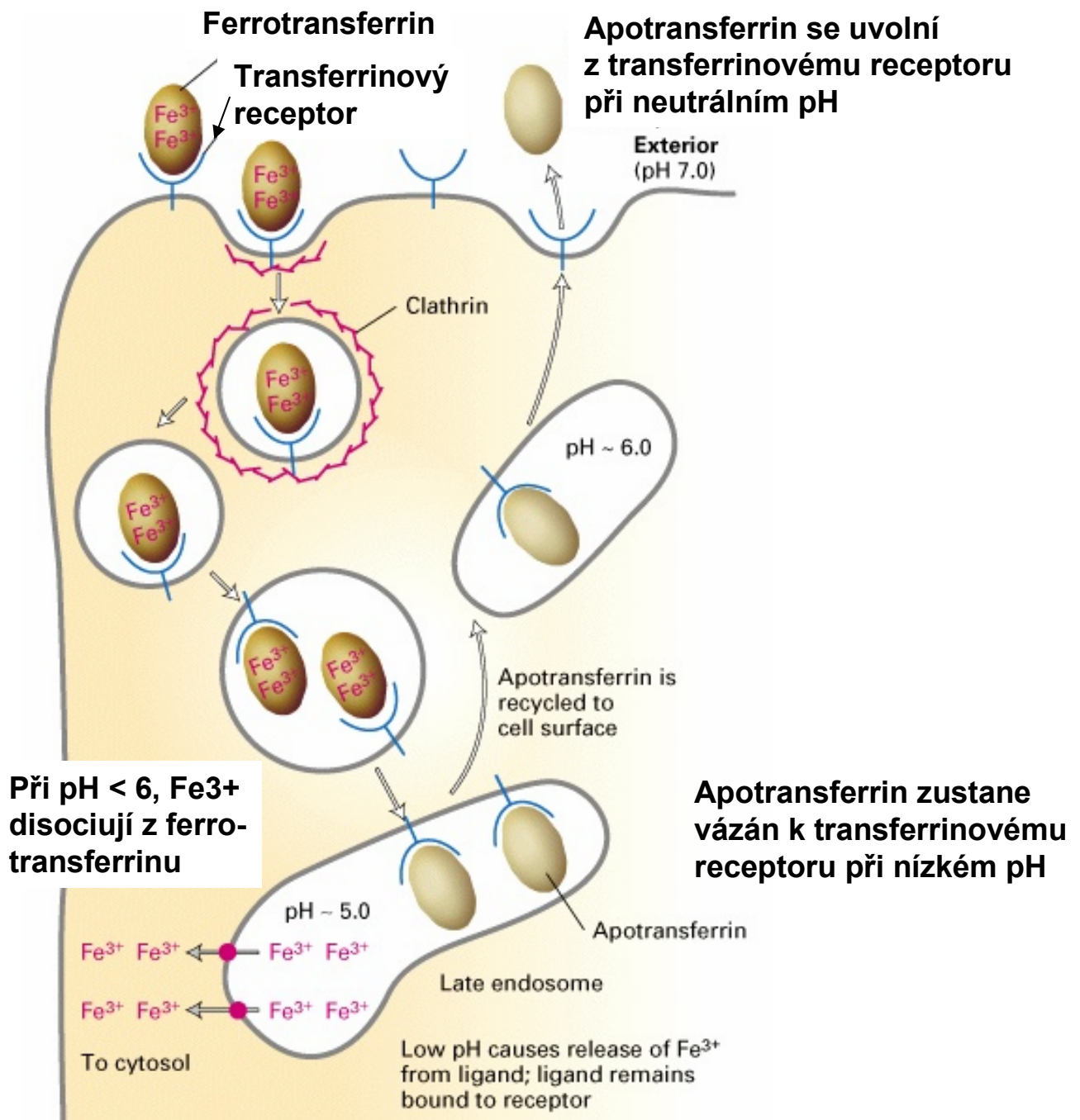


Transport Fe

Transferrin = majoritní glykoprotein krve, transportuje zelezo do bunek

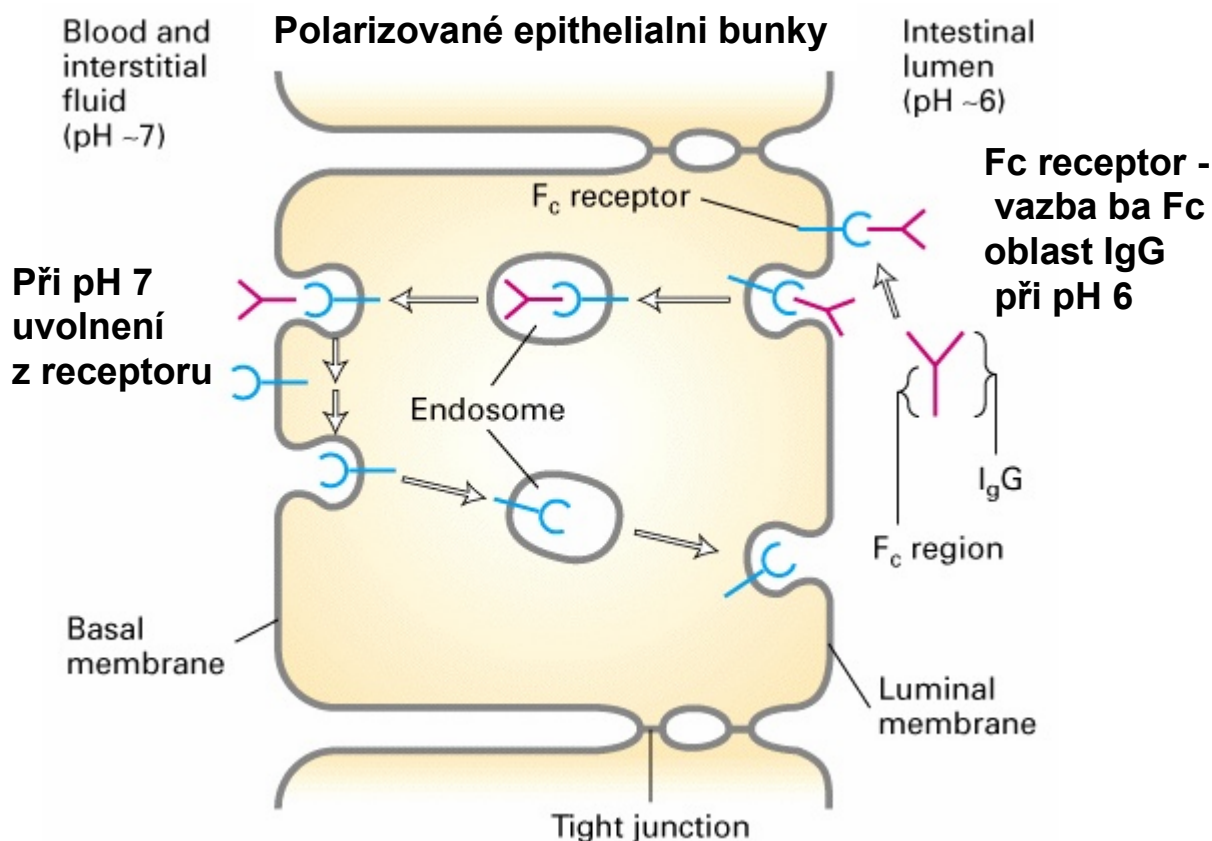
Apotransferrin - váže dva Fe^{3+} ionty a tvoří **ferrotransferrin**

Transferrinový receptor - váže ferrotransferrin při neutrálním pH - endocytosa



Transcytosa: pohyb ligand bunkou

Import extracelulárního ligandu na jedné straně bunky, transport cytoplasmou a export z druhé strany

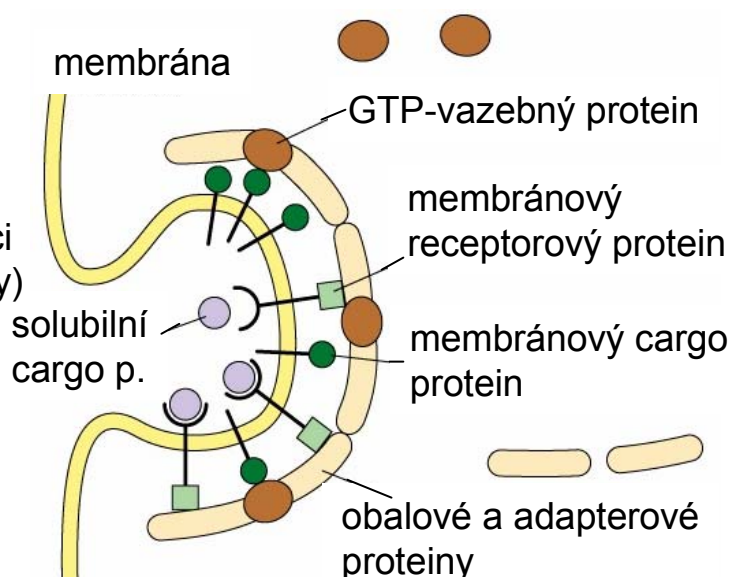


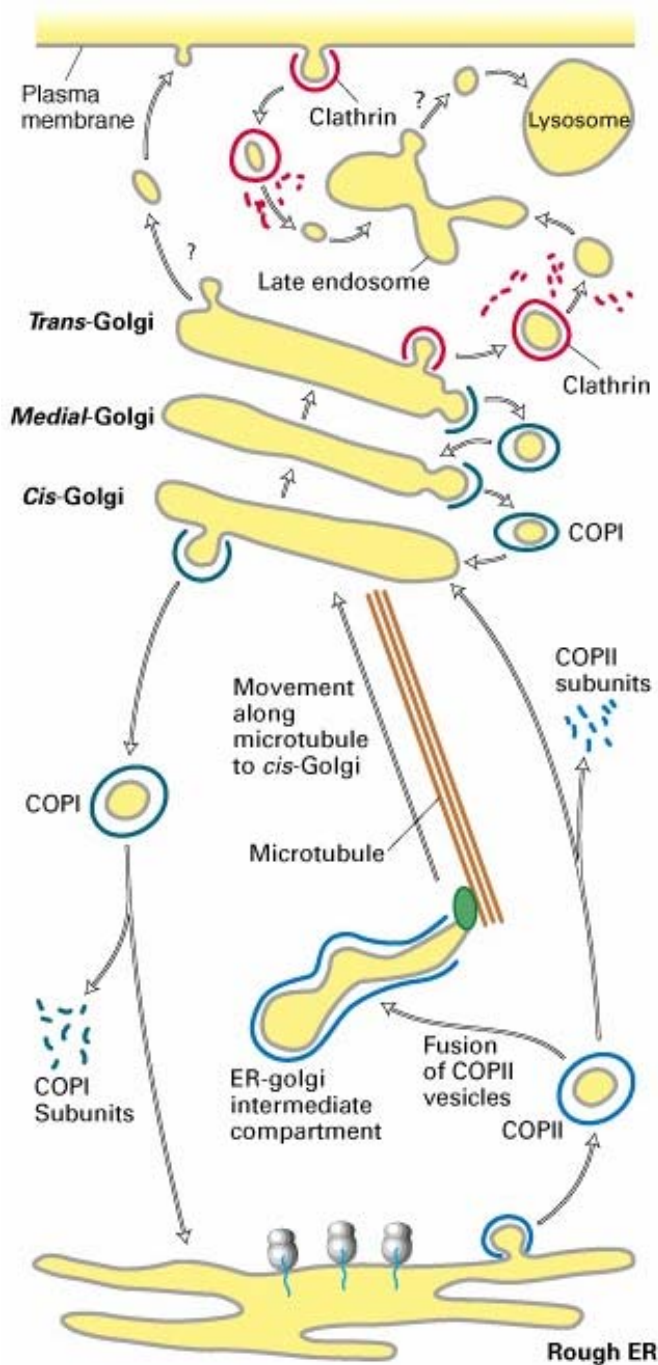
Molekulární mechanismy transportu pomocí vesiklu

3 typy "coated" vesiklu (mají proteinový "obal" na cytosolickém povrchu)

- transport proteinu ze "zdrojové" organely do "cílové" organely
- během tvorby vesiklu - subjednotky

- "obalového" proteinu - polymerace okolo vznikajícího vesiklu
- některé subjednotky "obalových" proteinu nebo s nimi asociovaných adapterových proteinu - role v selekci přenesených proteinu (cargo proteinu)
- cargo proteinu - mají specifické sekvence, které je směřují do specifického vesiklu
- Role GTP-vazebného proteinu regulujícího účinnost tvorby vesiklu





VESIKLY:

1. Clathrinové

- z lypasmatické membrány a trans-Golgi; do pozdních endosomu

2. COPI

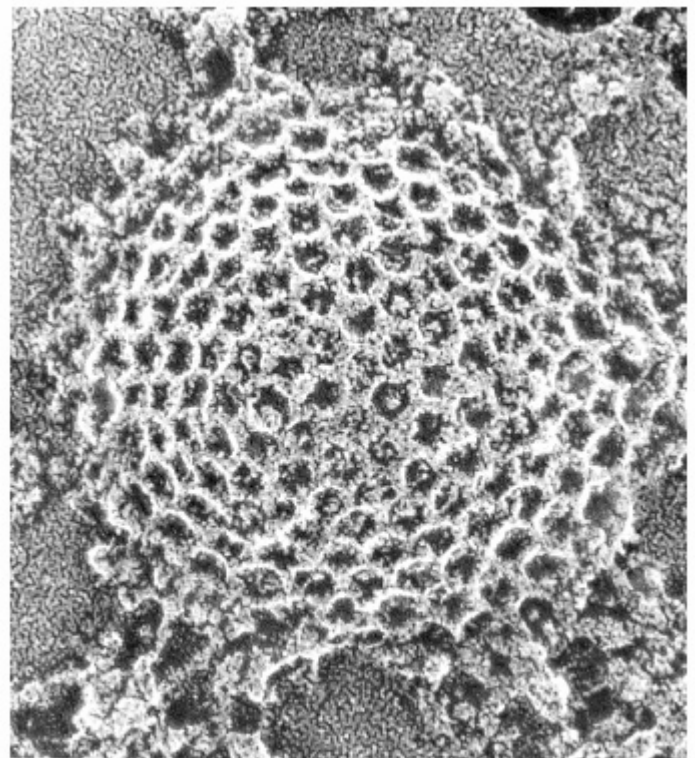
- retrograde směr mezi GA cisternami a z cis-Golgi do drsného ER

3. COPII

- z drsného ER do GA

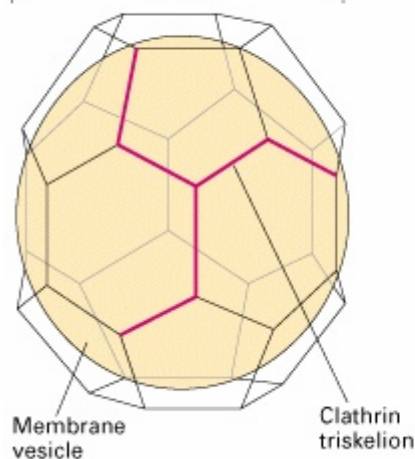
1. CLATHRINOVE VESIKLY

50-100 nm průměr - obal tvořený clathrinem (tězký a lehký řetězec)

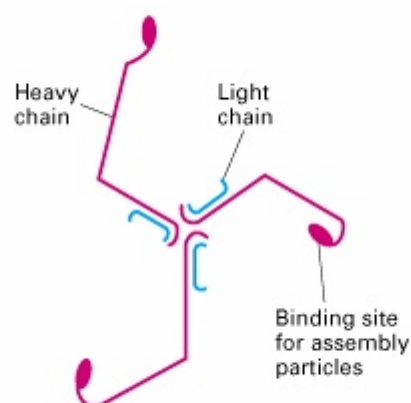


(a) Coated vesicle

50 nm



(b) Triskelion structure

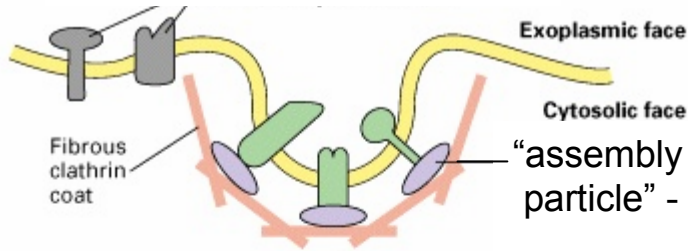


(c) Assembly intermediate



Triskelion -assembly i bez membránového vesiklu

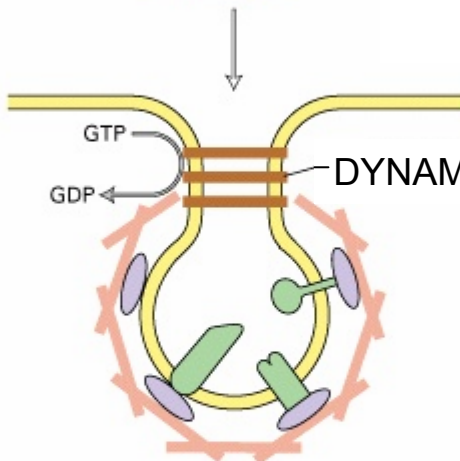
integrální proteiny “vyloučené” z transportního vesiklu



Triskelion - vazba k tzv. “**assembly particle**” - obsahuje adapterové proteiny

“assembly particle” - vazba i k membránovým proteinům - určení, které budou zahrnuty do “pucího” transportního vesiklu

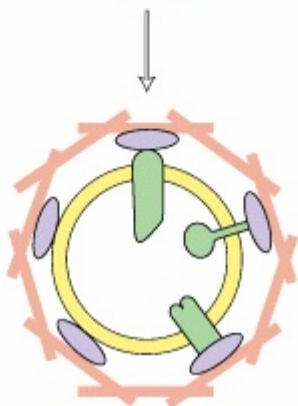
3 typy “assembly” partikulí - AP1, AP2, AP3 - různé adapterové proteiny



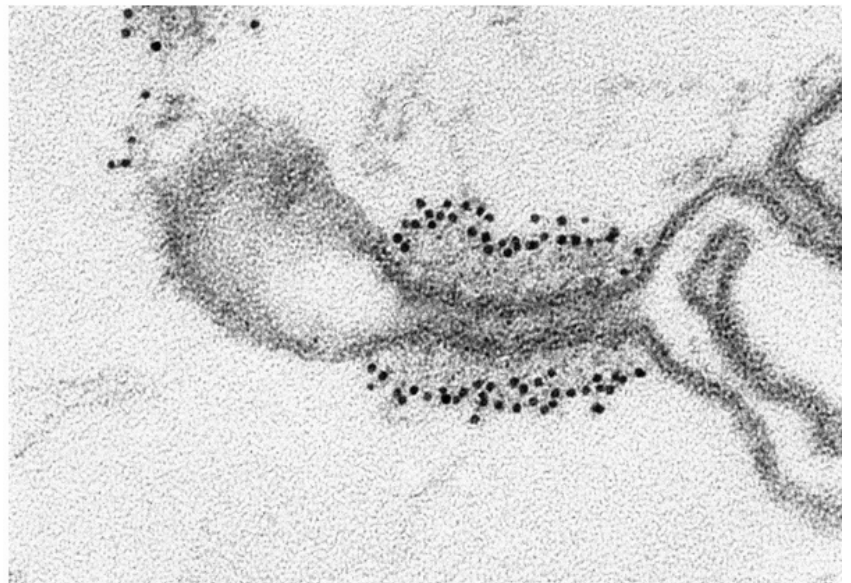
DYNAMIN - nezbytný pro tvorbu “clathrin-coated pit”

- vazba a hydrolyza GTP - ? regulace kontrakce a “odskrcení” vesiklu

- inkubace b.extraktu s derivatem GTP, který nemůže být hydrolysován - akumulace “clathrin-coated pits” s prodlouženými “krčky” s polymerovaným dynaminem - neuvolní se



CLATHRIN-COATED
VESICLE



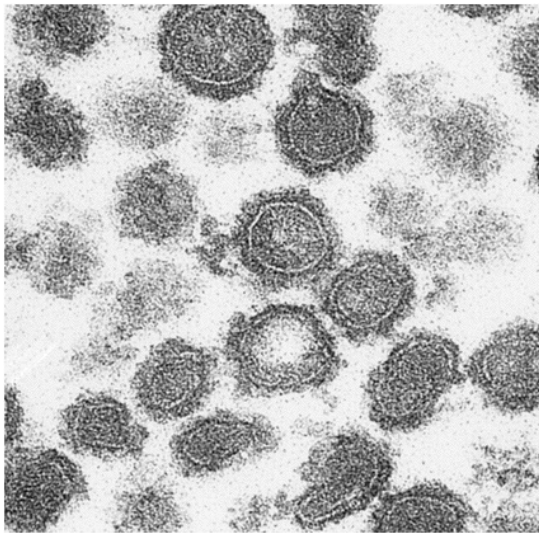
Další dva proteiny - nezbytné pro tvorbu clathrinových vesiklu:

AMPHYPHYSIN - vazba na dynamin a “assembly particle”

SYNAPTOJANIN - vazba na amphiphysin a dynamin

Depolymerace clathrinových vesiklu:

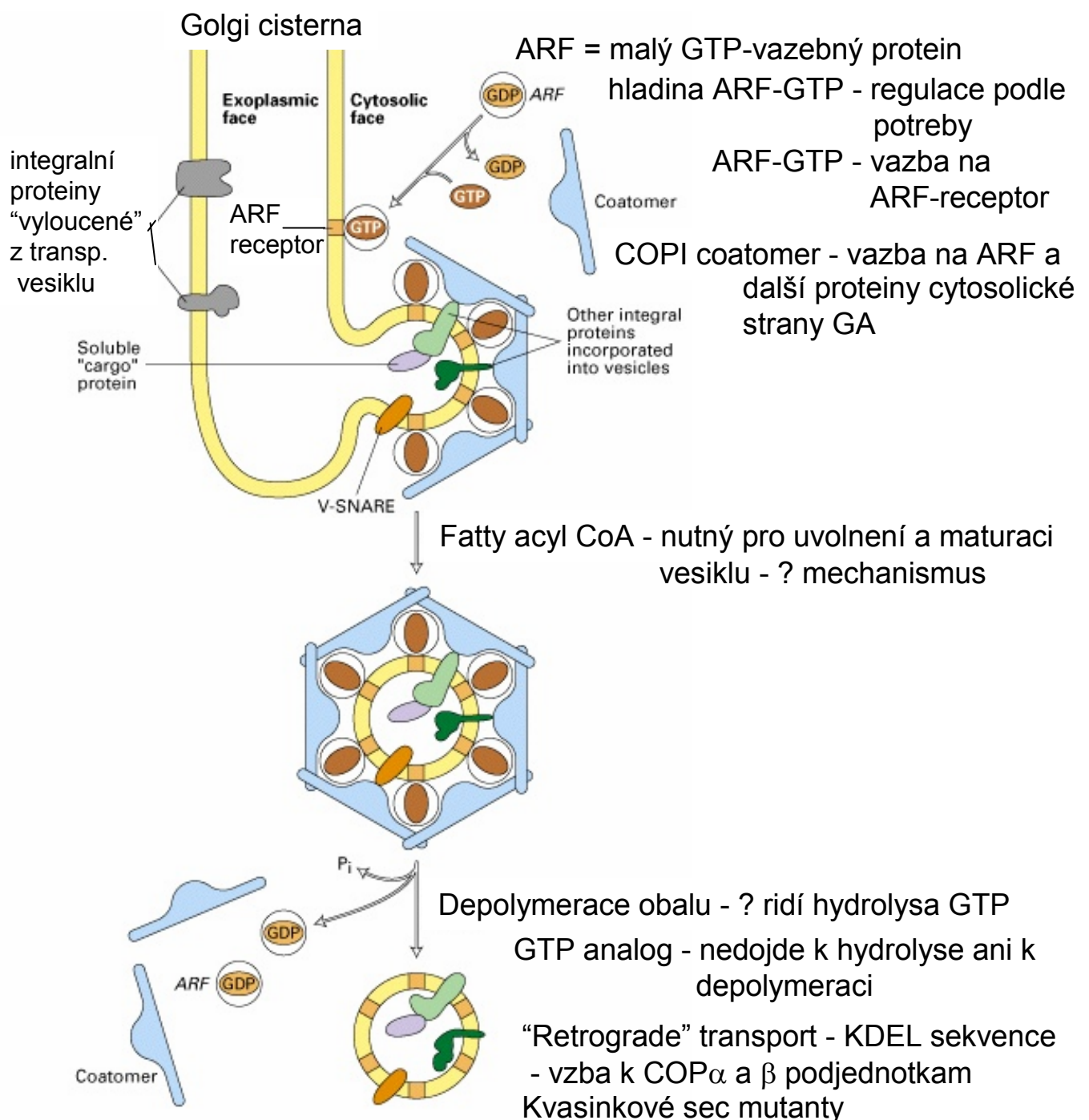
clathrinové vesikly - stabilní při pH a iontovém složení cytosolu X ztrácí clathrinový obal rychle po vzniku - asi role cytosolického Hsc70 (a dalších chaperonů) - clathrin - recirkulace na další vesikly



2. COPI VESIKLY

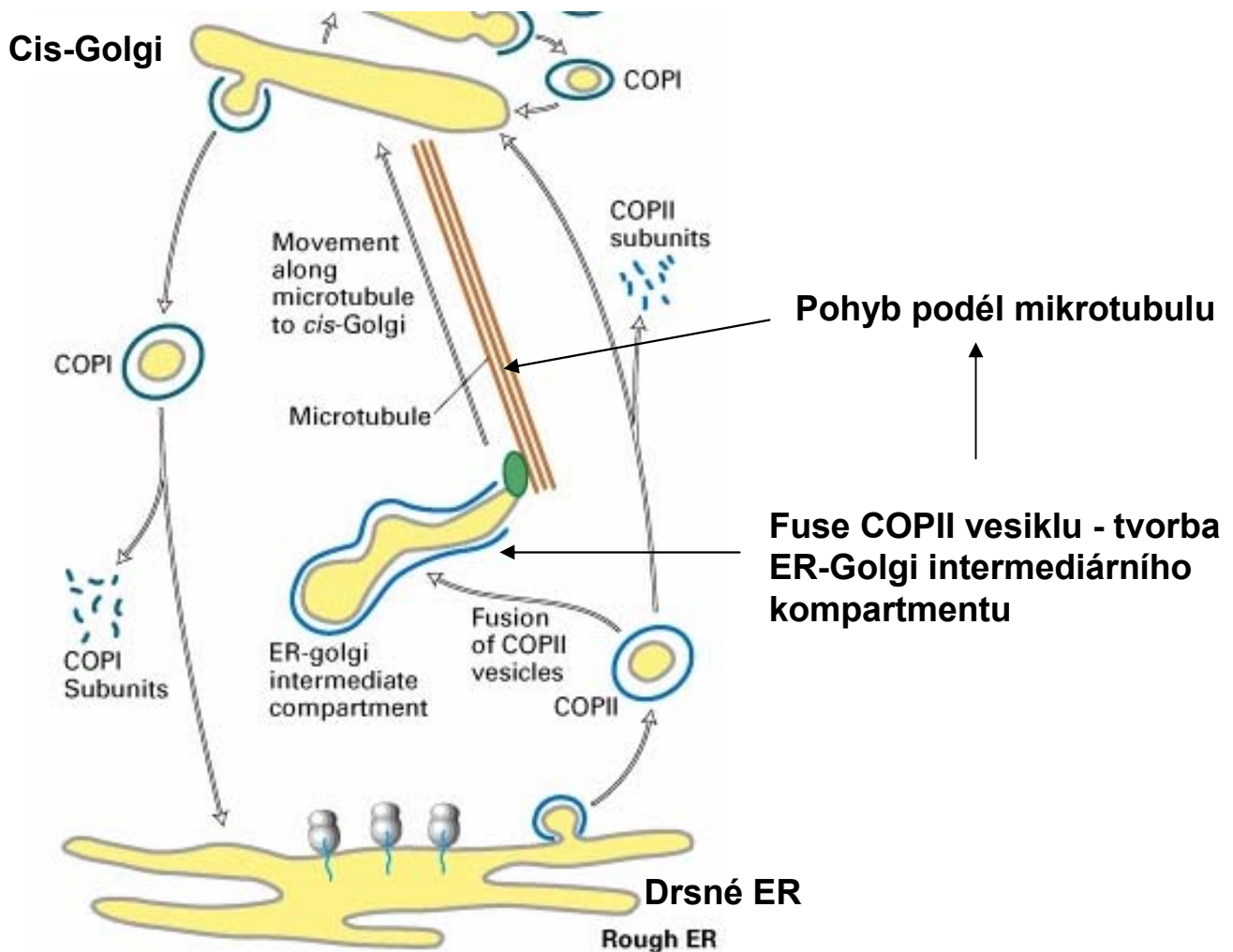
COPI vesikly - tvoreny z cytosolic-
kých komplexu “**coatomers**”
obsahujících 7 polypeptidových
podjednotek

- polymerace na povrchu “pucicích”
vesiklu a disociují pryč rychle po
jejich uvolnění
- některé podjednotky - spojka mezi
membránovým proteinem a obalem -
specifická inkorporace proteinu



3. COPII VESIKLY (transport z ER do GA)

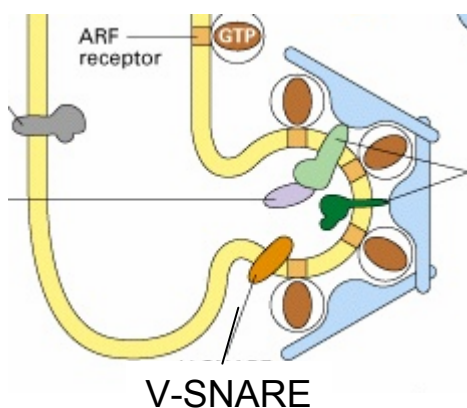
- tvorba podobná jako COPI (analog Arf proteinu je Sar1)
- sorting signál - Asp-X-Glu



Specifické fuse vesiklu

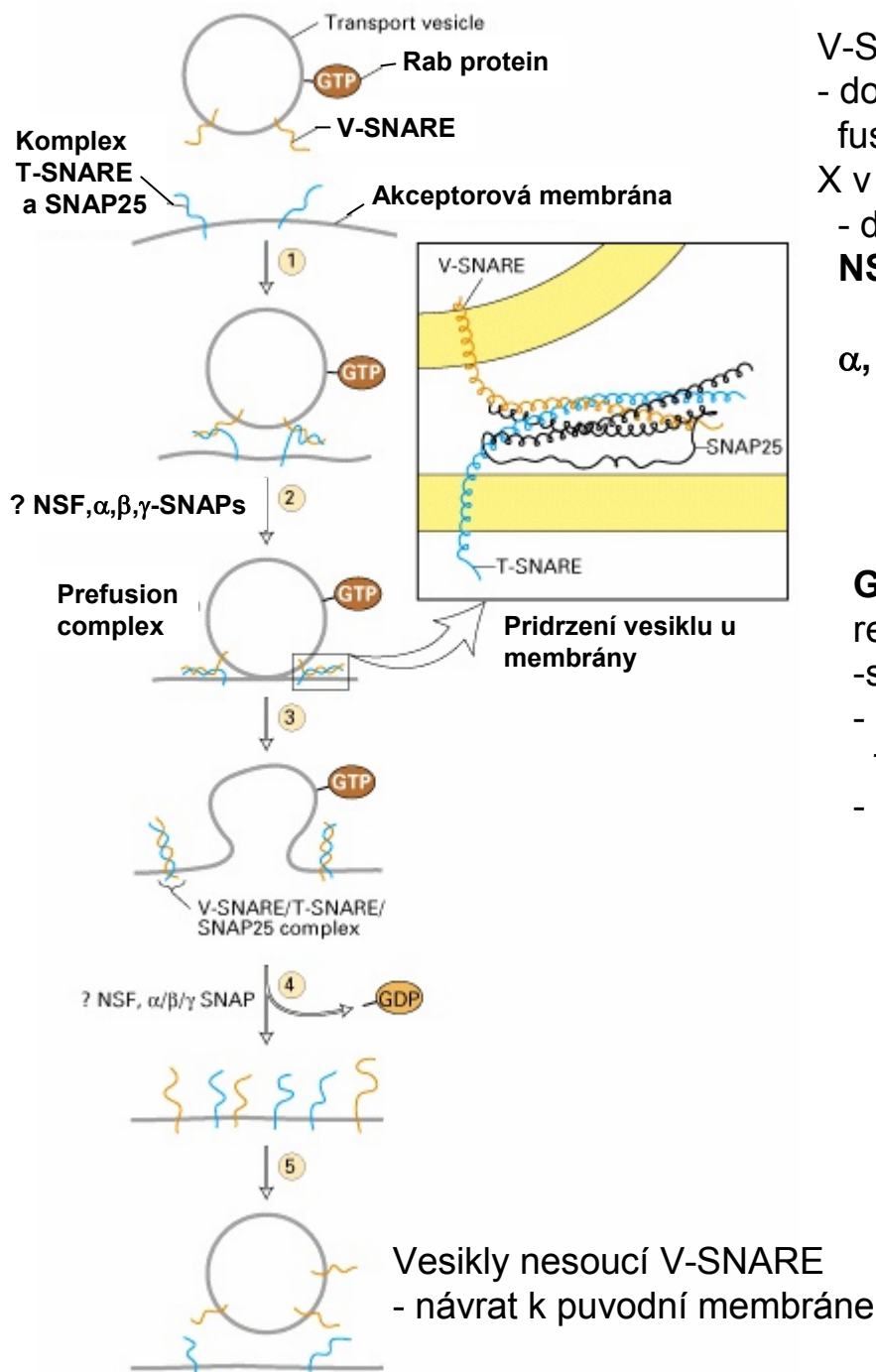
Fuse - poté co depolymerují obaly

- vyžadují "konservované skupiny proteinu nutné pro přivedení vesiklu k cílovému "partnerovi" a poté pro fusi



Depolymerace - odkryje specifické integrální membránové proteiny **V-SNARE** (inkorporované při "pucení") - pro každý typ vesiklu - přivedou vesikly k cíli

Membrány všech typu obsahují protein pro fusi (**SNAP25**) a 1-více integrálních membránových proteinu **T-SNARE** - kooperativní specifická vazba V-SNARE



V-SNARE, T-SNARE a SNAP25
 - dostatečné pro zprostředkování fuse (liposomy) - pomalu
 X v bunkách - fuse během sekund
 - další proteiny
NSF - tetramer, váže a hydrolyzuje ATP
 α , β a γ - **SNAPs** (soluble NSF attachment proteins) - vazba NSF k membránní vesiklu

GTP-vazebné Rab proteiny -
 - regulatory pohybu vesiklu
 - struktura podobná Ras
 - GTP hydrolyza - ? Regulace frekvence fuse
 - regulace poměru Rab-GTP : Rab-GDP

SYNTHESA A TARGETING DO MITOCHONDRÍÍ A CHLOROPLASTU

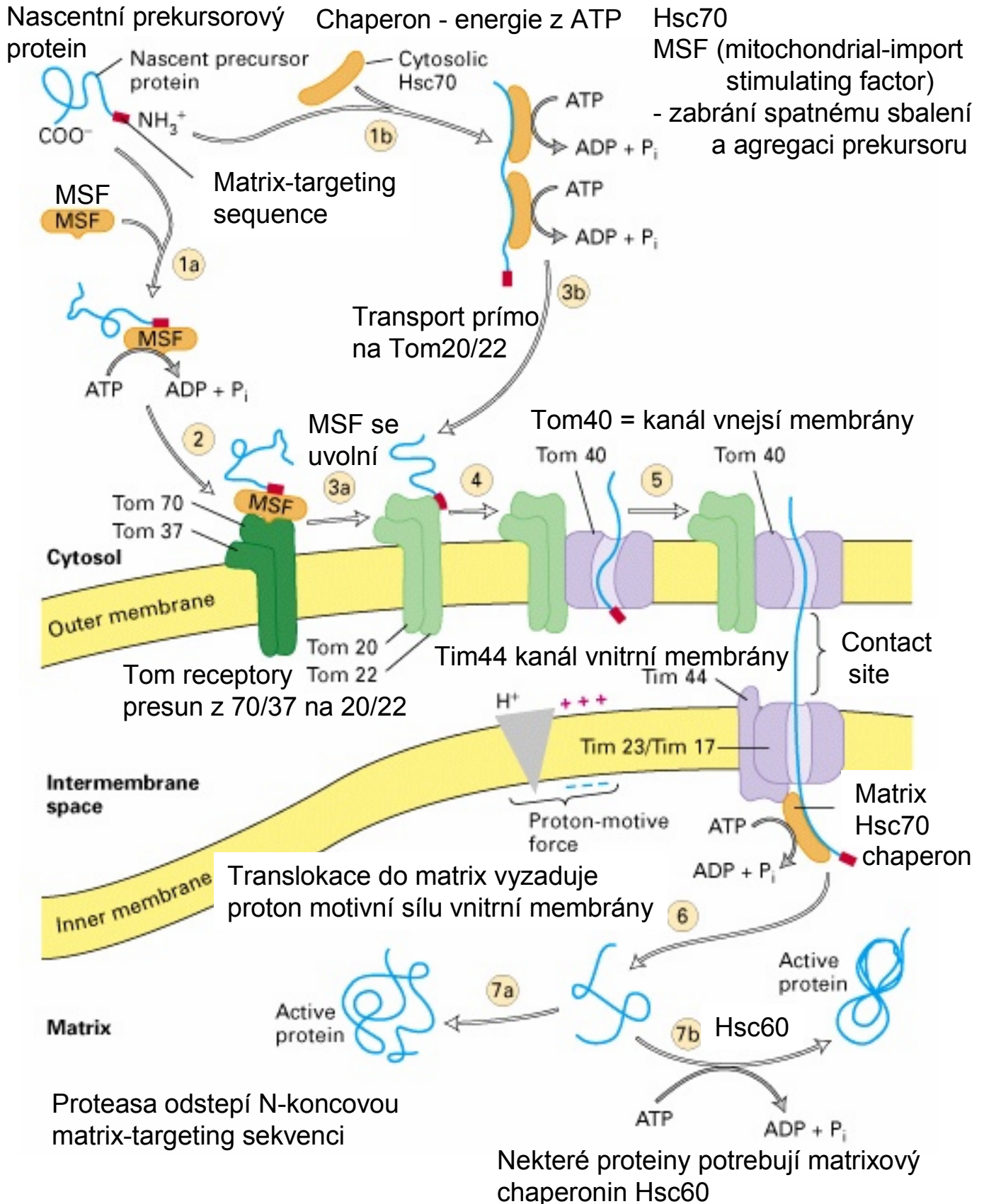
Mitochondrie a chloroplasty strukturně podobné

- dve membrány, chloroplasty navíc interní membránový kompartment - thylakoidy
- využívají proton-motivní sílu a F-ATPasy pro generování ATP
- podobné elektron transportní proteiny
- většina proteinů syntetizována na cytosolických ribosomech, které nejsou vázány na drsné ER - "uptake-targeting sequences"
- "příjem" proteinů většinou vyžaduje energii a závisí na integračních proteinech organel

Mitochondrie

- prekursorové proteiny - syntéza v bezbunecném systému, pak přidání mitochondrií - inkorporace prekursoru do organel + odstranění (většinou) sekvence

A) Transport do mitochondriální matrix



Hlavní charakteristiky importu do mitochondrií

- 1) informace pro targeting do matrix je v N-terminální targeting sekvenci (fusní proteiny - experimenty)
- 2) Pouze “nesbalené” proteiny mohou být importovány
- 3) Translokace probíhá pouze v místech, kde jsou vnitřní a vnější membrána v blízkosti

Transport do mitochondrií vyžaduje energii

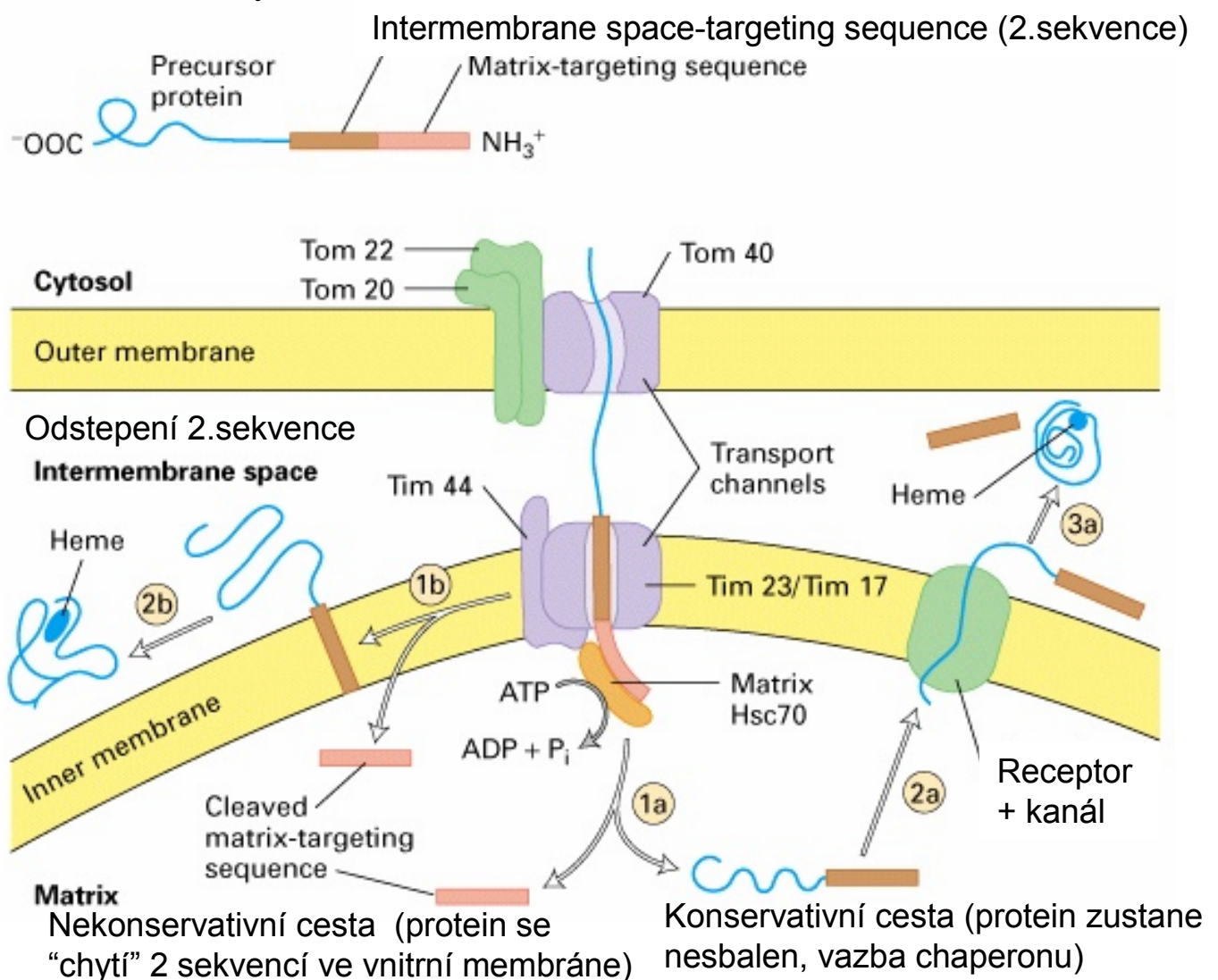
3 zdroje energie

- 1) ATP hydrolyza v cytosolu - chaperony - udržení proteinu v nesbaleném stavu
- 2) proton-motivní síla na vnitřní membráně - pro translokaci, ne pro vazbu na receptor
transmembránový potenciál (200 mV, matrix negativní)
- 3) ATP hydrolyza v mitochondriální matrix

B) Transport do dalších mitochondriálních kompartmentů

Mezimembránový prostor, (vnitřní membrána, vnější membrána)

- různé dráhy, často další sekvence

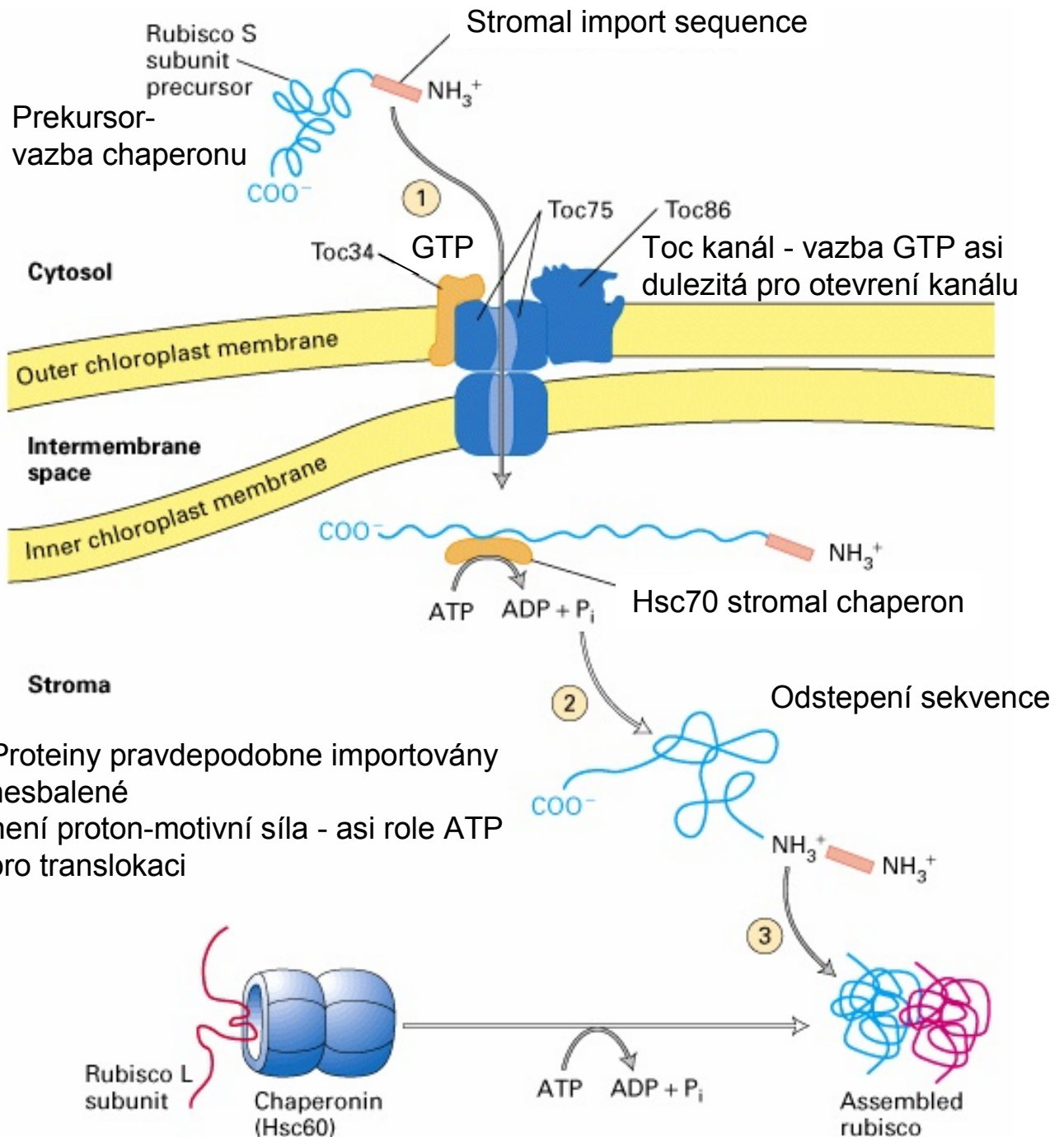


Proteiny vnitřní a vnější membrány - inkorporace pomocí kotevních sekvencí

Transport do chloroplastu

- N-koncová targeting sekvence, odstepena při transportu do stroma
- vyžaduje energii

A) Transport do stroma chloroplastu



- Proteiny pravdepodobne importovány nesbalené
- není proton-motivní síla - asi role ATP pro translokaci

A) Transport do thylakoidu

- další sekvence
- 4 thylakoid import systémy
- některé využívají pH gradient na membráne

SYNTHESA A TARGETING DO PEROXISOMU

Peroxisomy:

- malé rganely 0.2 - 1 μm
- jedna membrána
- všechny proteiny syntetizovány v cytoplasmě - volné ribosomy, inkorporace do peroxisomu
- proteiny se v cytoplasmě sbalí do maturované konformace před importem
- import vyžaduje ATP hydrolyzu, nevyžaduje elektrochemický gradient
- targeting sekvence SKL (Ser-Lys-Leu) na C-konci (katalasa)

