



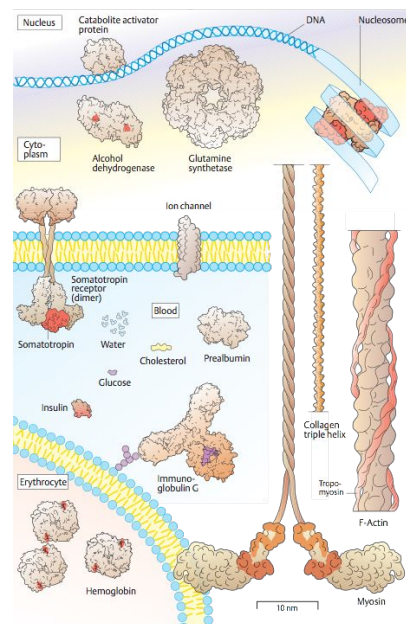
Inżynieria Białek

Synteza białek

Kierowanie białek

Peptydy i białka

- Tworzenie i utrzymywanie struktury.
 - Kolagen.
 - Histony.
- Transport.
 - Hemoglobina.
 - Prealbumin.
 - Kanaly jonowe.
- Ochrona i obrona.
 - IgG.
- Kontrola i regulacja.
 - Hormony i ich receptory.
 - Kataboliczne aktywatory .
- Kataliza.
- Ruch.
 - Filamenty aktynowe.
- Przechowywanie.

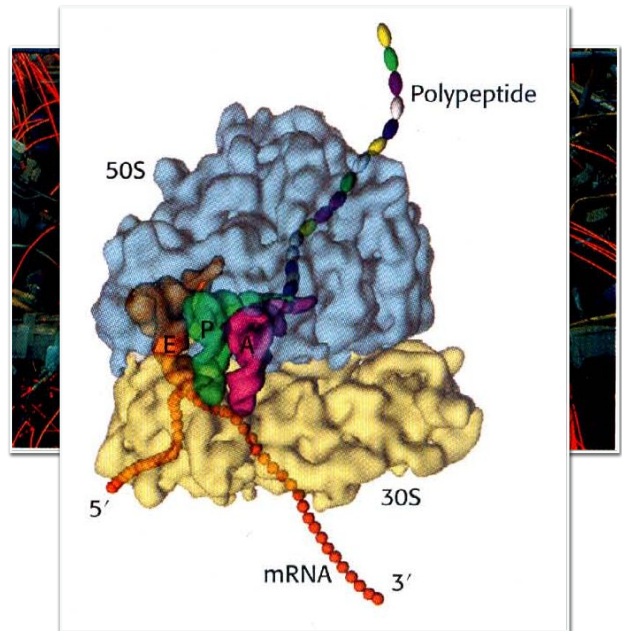


Szybkość procesu

Przepisanie DNA-mRNA to kopiowanie informacji 1:1.

Przepisanie mRNA-AA to tłumaczenie informacji na 'inny język'.

• *E. coli* przeprowadza translację w tempie ok 40 aminokwasów na sekundę.



Dokładność procesu

DNA/RNA jest kodem zdegenerowanym.

AA posiadają fizykochemiczne cechy charakterystyczne i jedynie w niewielkim stopniu mogą się wzajemnie zastępować.

• Częstość wprowadzania błędnego aminokwasu oscyluje wokół wartości 10^{-4} .

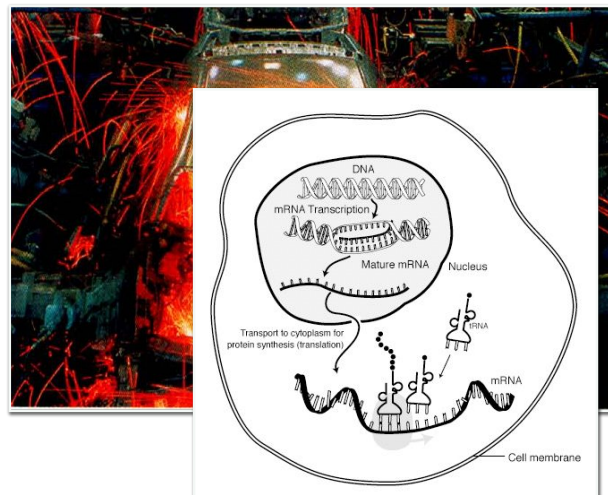
Frequency of inserting an incorrect amino acid	PROBABILITY OF SYNTHESIZING AN ERROR-FREE PROTEIN		
	NUMBER OF AMINO ACID RESIDUES		
	100	300	1000
10^{-2}	0.366	0.049	0.000
10^{-3}	0.905	0.741	0.368
10^{-4}	0.990	0.970	0.905
10^{-5}	0.999	0.997	0.990
10^{-2}	0.000	0.000	0.000
10^{-4}	0.000	0.000	0.000
10^{-3}	0.002	0.000	0.000
10^{-5}	0.000	0.000	0.000

Transportujący RNA (tRNA)

· mRNA, matrycowy (informacyjny, przekaźnikowy) RNA - rodzaj RNA, którego funkcją jest przenoszenie informacji genetycznej o sekwencji poszczególnych polipeptydów z genów do aparatu translacyjnego.

tRNA to swoista cząsteczka RNA rozpoznająca odpowiedni kodon poprzez parowanie zasad typu Watson-Crick.

· tRNA transferowe RNA - to cząsteczki adapterowe, oddziałujące ze swoistymi kodonami i dostarczające aminokwasy w celu ich włączenia do łańcucha polipeptydowego.



Struktura tRNA

Cechy wspólne tRNA:

- pojedynczy łańcuch 73-93 nukleotydów (ca. 25 kDa);
- 7-15 nietypowych zasad na cząsteczkę (np. metylowe lub dimetylowe pochodne A, U, C lub G);
- mniej niż połowa nukleotydów jest sparowana;
- koniec 5' wszystkich tRNA jest fosforylowany (pG);
- aktywny aminokwas jest przyłączany do grupy 3' sekwencji CCA.
- antykonon znajduje się w pętli będącej w przybliżeniu w środku sekwencji nukleotydowej cząsteczki tRNA.

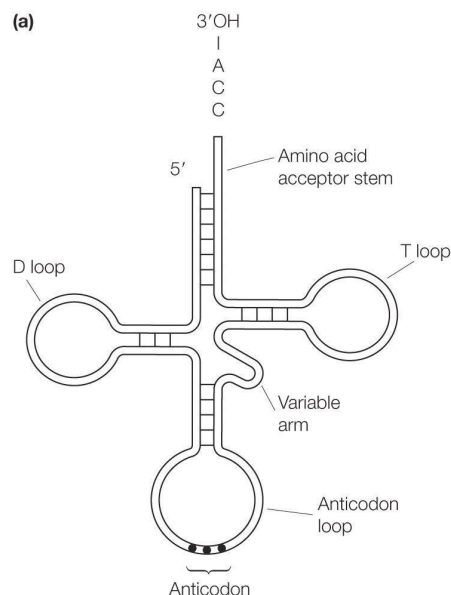
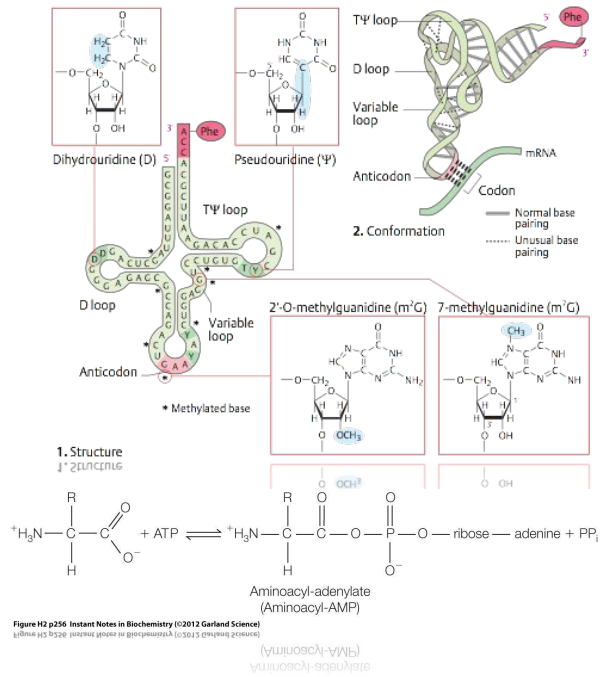


Figure G9.1a Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

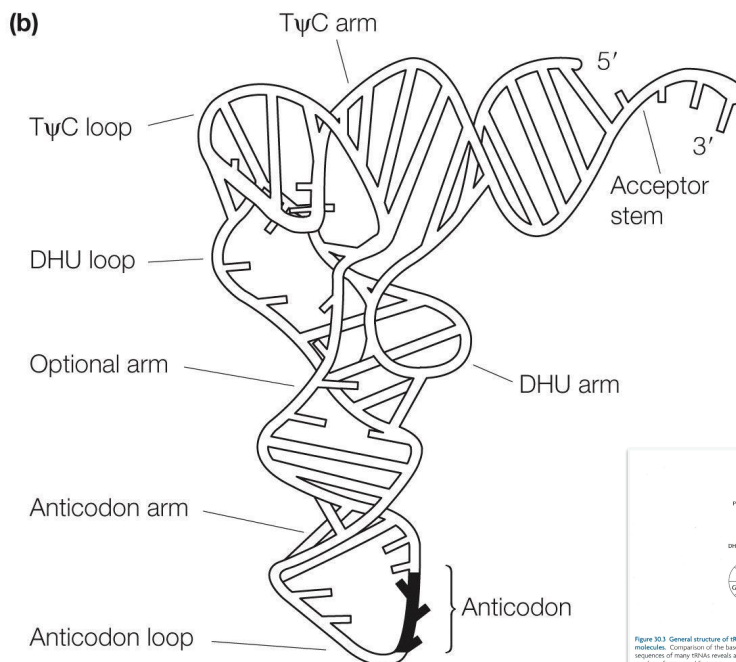
Struktura tRNA

› Niesparowane nukleotydy tworzą 5 grup:

- › ramię antykodonowe;
- › ramię D lub DHU zawierające *dihydrouacyl*;
- › ramię T lub TψC zawierające *pseudourydynę*;
- › ramię zmienne;
- › ramię aminokwasowe.



Struktura tRNA

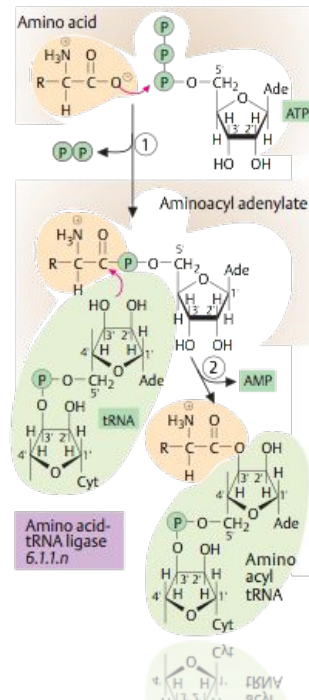


Aminoacylo-tRNA

Poprawne sparowanie tRNA z aminokwasem jest procesem kluczowym:

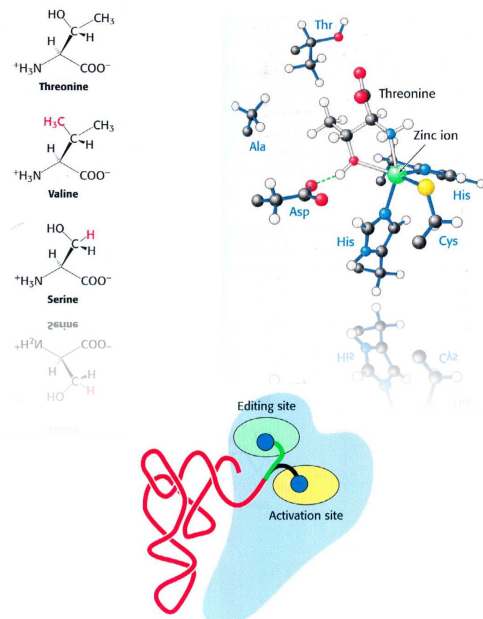
- › decyduje o poprawnym odczytaniu kodu genetycznego;
- › przyłączenie aminokwasu powoduje jego aktywację.

Syntetaza aminoacylo-tRNA jest enzymem aktywującym.

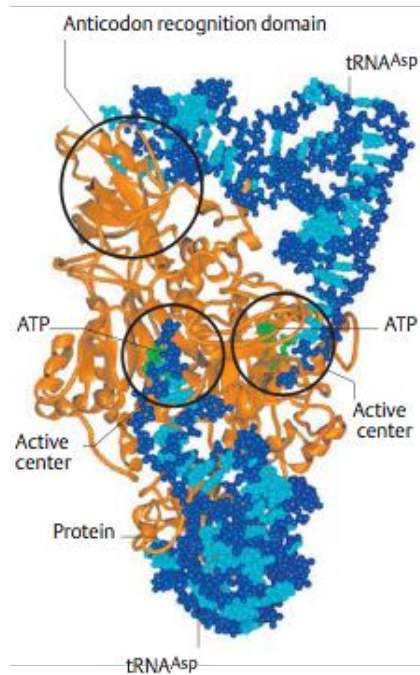


Syntetaza aminoacylo-tRNA

- › Każdy aminokwas posiada własną syntetazę.
- › Każda syntetaza specyficznie rozpoznaje aminokwas, który aktywuje.
- › Syntetazy posiadają aktywność korekcyjną.
 - › W procesie korekcji wykorzystywane są centra *acylujące* i *hydrolityczne*.
 - › Podwójne sito pozwala na odsianie aminokwasów większych (centrum acylujące) i mniejszych (centrum hydrolityczne).
- › Syntetazy rozpoznają tRNA na podstawie różnych cech np. sekwencji antykodonu.



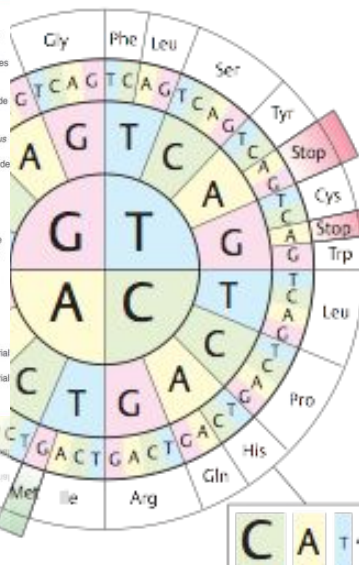
Syntetaza aminoacylo-tRNA



Projekt - DNA

Exceptions to the standard code. The numbers in brackets refer to the translation tables used in GenBank/EMBL databases listed below

- UUA terminator in *Thraustochyrium* mitochondrial code (23); initiation codon in protozoan mitochondrial code and *Mycoplasma/Spiroplasma* code (4).
- UAG initiation codon in standard (1), bacterial (11) and some mitochondrial codes (4,5,13).
- UCA terminator in *Scenedesmus obliquus* mitochondrial code (22).
- UAA Gln in ciliate nuclear code (6); Tyr in alternative flatworm mitochondrial code (14); Pyl (pyrolysine) in Archaea (*Methanosarcinaceae*) decoded by Pyl-tRNA.
- UAG Gln in ciliate nuclear code (6,15); Leu in Chlorophyceae, and *Scenedesmus* mitochondrial codes (16,22).
- UGA Trp in mitochondrial codes (2,3,4,5,9,13,14,21); Cys in euklotid nuclear code (10); Sec (selenocysteine) depends on a presence of SECIS (SelenoCysteine Insertion Sequence) element in mRNA.
- CUU Thr in yeast mitochondrial code (3).
- CUC Thr in yeast mitochondrial code (3).
- CUA Thr in yeast mitochondrial code (3).
- CUG Thr in yeast mitochondrial code (3); in alternative yeast mitochondrial code (12); initiation codon in standard (1) bacterial (11) and some mitochondrial codes (4,12).
- AUU initiation codon in bacterial (11) and some mitochondrial codes (2,4,5,23).
- AUC Met in mitochondrial codes of vertebrates (2), yeast (3) and some invertebrates (5,13,21); initiation codon in bacterial (11) and some mitochondrial codes (2,3,4,5,13).
- AAA Asn in flatworm (9,14,21) and echinoderm (9) mitochondrial codes.
- AGA terminator in vertebrate mitochondrial code (2); Gly in ascidian mitochondrial code (13); Ser in mitochondrial codes (5,9,14,21).
- AGG terminator in vertebrate mitochondrial code (2); Gly in ascidian mitochondrial code (13); Ser in mitochondrial codes (5,9,14,21).
- GUG initiation codon in bacterial (11) and some mitochondrial codes (2,4,5)
- UAG initiation codon in standard (1) bacterial (11) and some mitochondrial codes (4,5,13)
- UAA initiation codon in standard (1) bacterial (11) and some mitochondrial codes (4,5,13)
- UAG initiation codon in standard (1) bacterial (11) and some mitochondrial codes (4,5,13)
- UAA initiation codon in standard (1) bacterial (11) and some mitochondrial codes (4,5,13)
- UAG initiation codon in standard (1) bacterial (11) and some mitochondrial codes (4,5,13)
- UAA initiation codon in standard (1) bacterial (11) and some mitochondrial codes (4,5,13)



2. Normal globin gene (β -chain)

Sickle-cell globin gene (β -chain)

5' CCTGAGGAG
3' GGACTCCTC

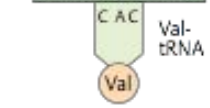
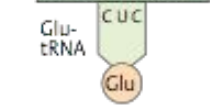
5' CCTGTGGAG
3' GGACA CCTC

Transcription

Transcription

5' CCUGAGGAG

5' CCUGUGGAG



Translation

Translation

Pro - Glu - Glu

Pro - Val - Glu

Mutation

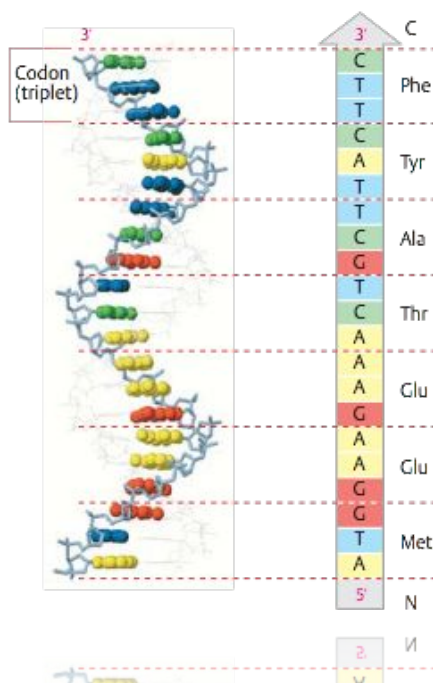
Mutation

Ramki odczytu

mRNA odczytywane jest tripletach od końca 5'.

Triplet AUG jest identyfikowany jak początek sekwencji.

ORF (*ang. Open Reading Frame*) to otwarte ramki odczytu czyli wszystkie możliwe kombinacje w jakie można odczytać mRNA.



Rybosom

To molekularna maszyna koordynująca pracę trzech elementów:

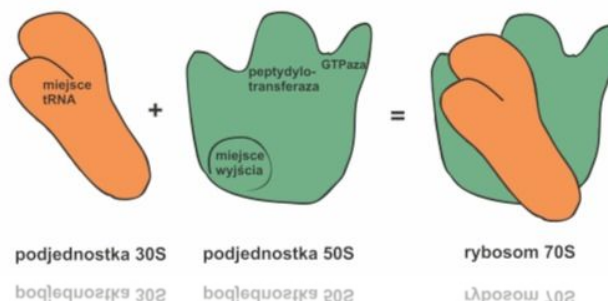
- mRNA;
- tRNA;
- enzymów.

Celem jest produkcja polipeptydów.

Rybosom *E. coli* składa się z:

- kwasów rybonukleinowych;
- białek;
- ma masę około 2600 kDa;
- średnicę 25,0 nm;
- współczynnik sedymentacji 70S.

· Stała sedymentacji Svedberga jest to współczynnik określający szybkość poruszania się cząstek koloidalnych pod wpływem sił odśrodkowych w ultrawirówkach



Rybosom

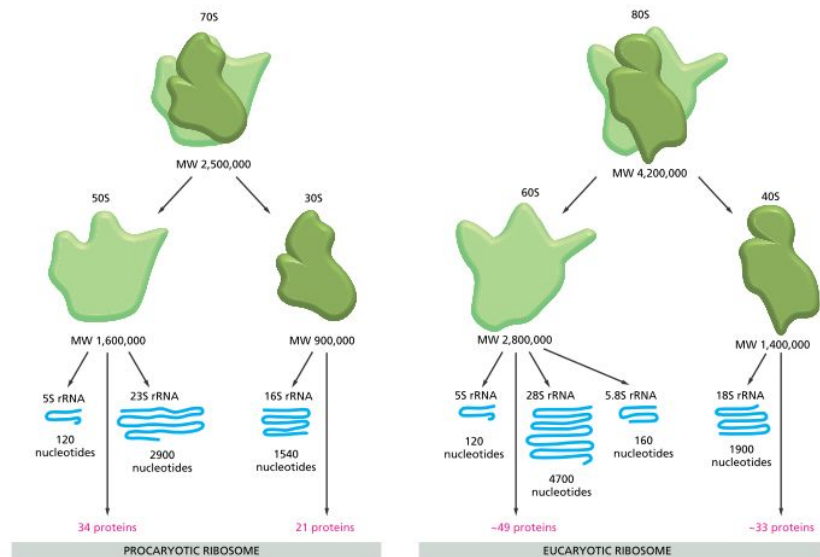
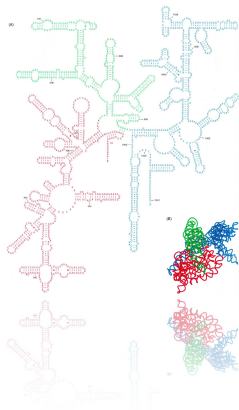


Figure 6-63 A comparison of prokaryotic and eukaryotic ribosomes. Despite differences in the number and size of their rRNA and protein components, both prokaryotic and eukaryotic ribosomes have nearly the same structure and they function similarly. Although the 18S and 28S rRNAs of the eukaryotic ribosome contain many nucleotides not present in their bacterial counterparts, these nucleotides are present as multiple insertions that form extra domains and leave the basic structure of each rRNA largely unchanged.

Elementy funkcjonalne

- › A - miejsce wiązania aminoacylo-tRNA.
- › Miejsce, gdzie w czasie elongacji zostaje związany wprowadzony aminoacylo-tRNA.
- › P - miejsce wiązania peptydylo-tRNA.
 - › rejon, gdzie zostaje związany tRNA wraz z rosnącym łańcuchem polipeptydowym.
- › E - miejsce wyjścia.
 - › rejon, gdzie tRNA, który odegrał już swoją rolę w translacji jest uwalniany z rybosomu.

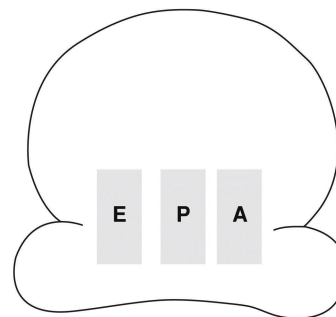
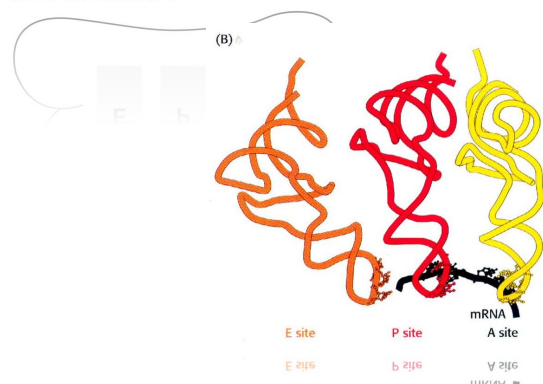
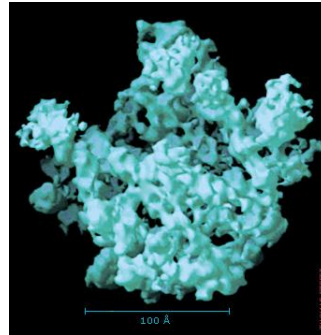
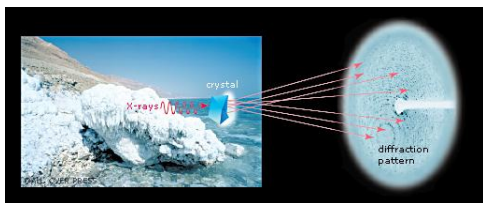


Figure 10-3 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)



The Nobel Prize in Chemistry 2009



Venkatraman
Ramakrishnan



Thomas A.
Steitz



Ada E.
Yonath

Inicjacja translacji

Kodonem inicjującym (kodonem 'start') jest AUG.

W zależności od pozycji w sekwencji Met jest dostarczana przez tRNA:

- › $tRNA_f^{Met}$ czyli inicjatorowe tRNA;
- › $tRNA_m^{Met}$;

U eukariotów sekwencja Shine-Dalgarno dodatkowo 'kieruje' mRNA w kierunku 16S rRNA.

U prokariotów pierwszym aminokwasem białka jest N-formylometionina (fMet).

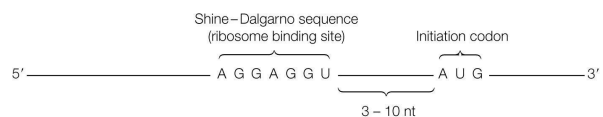


Figure H2.2 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Inicjacja translacji

· Etap 1

- wiązanie czynników inicjujących (IF1, IF3) do mniejszej podjednostki (30S) rybosomowej,
- mRNA wiąże się z rybosomem poprzez sekwencję Shine-Dalgarno,

· Etap 2

- inicjatorowy tRNA, *N-formylometionina*, wiąże się z IF2 i GTP (fMet tRNA^{Met}/IF2/GTP),
- kompleks mRNA z podjednostką 30S łączy się z wcześniej utworzonymi kompleksami,
- czynnik IF3 zostaje uwolniony tworząc *kompleks inicjujący 30S*,

· Etap 3

- jednostka 50S łączy się z kompleksem inicjującym 30S,
- uwolnione zostają czynniki IF1 oraz IF2 i zachodzi hydroliza GTP w efekcie czego powstaje kompleks inicjujący 70S.

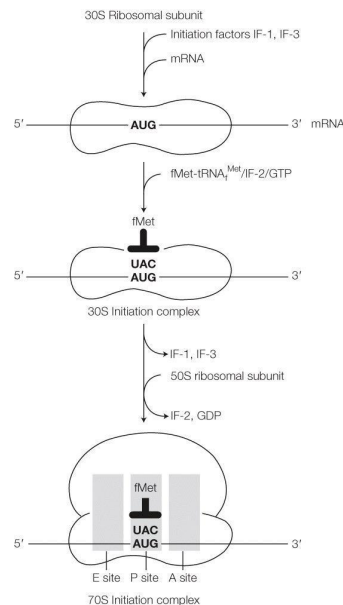


Figure H2.3 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Elongacja

· Wiązanie aminoacylo-tRNA

- przy udziale *czynnika elongacyjnego EF-Tu* oraz GTP odpowiednie aminoacylo-tRNA wiązane jest w miejscu A rybosomu,

· Utworzenie wiązania peptydowego

- w wyniku działania *peptydylotransferazy* powstaje wiązanie peptydowe.

· Translokacja

- *czynnik elongacyjny EF-G* (translokaza) oraz GTP wiążą się z rybosomem.

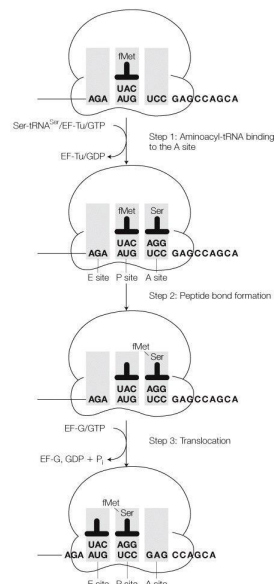
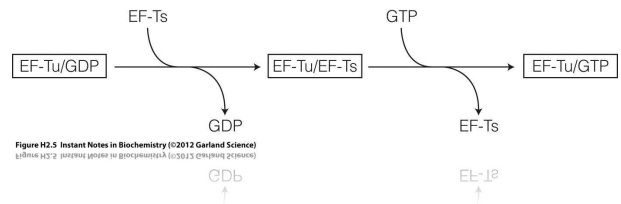


Figure H2.4 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Regeneracja czynnika elongacyjnego



Cykl wymiany EF-TU - EF-Ts

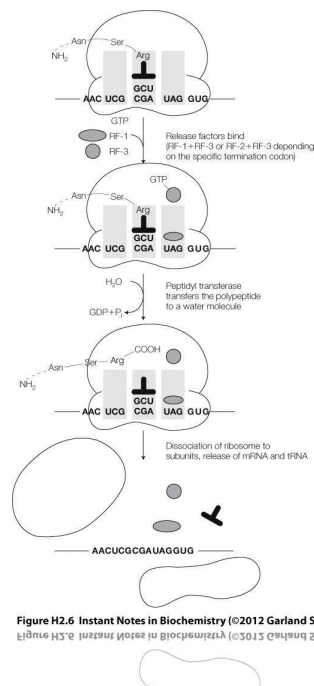
Terminacja

W momencie napotkania kodony 'Stop' w miejscu A do miejsca aktywnego A wiąże się jeden z dwóch czynników uwalniających (*RF1* lub *RF2*).

Po utworzeniu kompleksu z *RF3* i GTP z rybosomem peptydylotransferaza przyłącza cząsteczkę wody do terminalnego aminokwasu.

RF1 rozpoznaje UAA i UAG.

RF2 rozpoznaje UGA.



Synteza białek u eukariotów

- › Rybosom eukariotyczny 80S *vs.* rybosom prokariotyczny 70S
- › mRNA monocistronowy *vs.* policistronowy
- › czynniki inicjacji eIF *vs.* IF
- › metionina (Met-tRNA_i^{Met}) *vs.* N-fomylometionina
- › skanowanie mRNA *vs.* Shine-Dalgarno

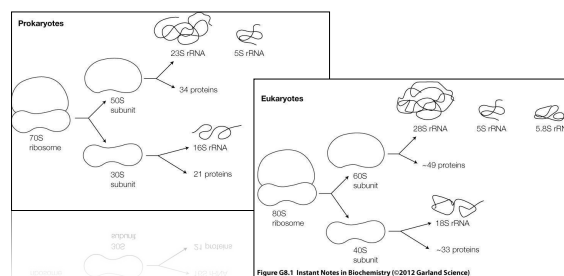


Table 1. Comparison of protein synthesis factors in prokaryotes and eukaryotes

Prokaryotic	Eukaryotic	Function
Initiation factors		
IF-1, IF-2, IF-3	At least 13 initiation factors; so far identified: eIF-1, eIF-1A, eIF-2, eIF-2B, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4E, eIF-4F, eIF-4G, eIF-4H, eIF-5, eIF-6	Individual factors have functions that differ between prokaryotes and eukaryotes (see the text)
Elongation factors		
EF-Tu	eEF-1α	Aminoacyl-tRNA delivery to ribosome
EF-Ts	eEF-1βγ	Recycling of EF-Tu or eEF-1α
EF-G	eEF-2	Translocation
Termination factors		
RF-1, RF-2, RF-3	eRF-1, eRF-3	Polypeptide chain release

Table 13.1 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Table 13.2 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Synteza białek u eukariotów

Inicjacja

› Kompleks preinicjujący

- › 40S/MettRNA_i^{Met}/eIF2/GTP
- › Wiązanie mRNA poprzez czynnik eIF4F (*kompleks wiążący kap*) i eIF3 oraz *białko wiążące się z poli(A)*
- › Skanowanie 5' → 3'
- › Wiązanie jednostki 60S i utworzenie *kompleksu inicjującego* 80S

Elongacja

- › elongacja wymaga czynników elongacyjnych eEF1α, eEF1βγ i eEF2

Terminacja

- › czynnik eRF rozpoznaje wszystkie kodony stop

Translacja

Kierowanie białek

Kierowanie białek to proces w wyniku którego nowo zsyntetyzowane białka kierowane są do odpowiednich miejsc w komórce bądź poza nią.

Białka mogą być kierowane:

- cytozolu,
- mitochondrium,
- lizosomu,
- peroksyzomu,
- chloroplastu,
- jądra,
- wbudowywane w błonę komórkową zewnętrzną bun wewnętrzną,

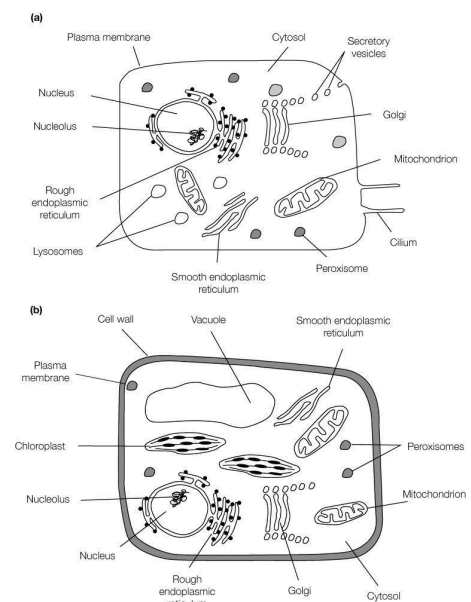
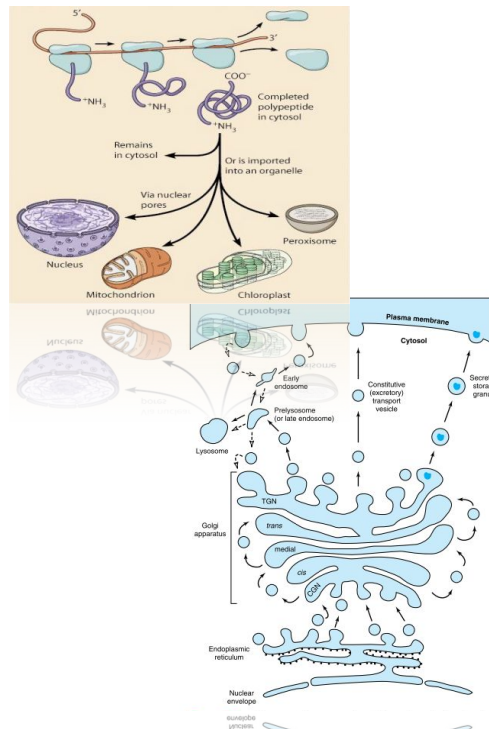


Figure A2.1 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Mechanizm transportu u eukariotów

Nowo zsyntetyzowane białko jest wbudowywane w błonę ER albo wrzucane do światła ER bezpośrednio z rybosomów związanych z błoną ER (szorstkie ER).

- białka, których docelowe miejsce jest poza ER wychodzą w pęcherzykach odrywających się od ER gładkiego i systemem pęcherzykowym przechodzą przez aparat Golgiego (wchodzą od strony *cis* wychodzą *trans*). Po stronie *trans* białka są segregowane i sortowane do odpowiednich kompartmentów.
- białka sekrecyjne akumulowane są w pęcherzykach sekrecyjnych, z których zostaną wyrzucone za błonę.
- białka błony komórkowej wędrują do niej w pęcherzykach transportujących.
- białka lizosomowe dostają się tam poprzez pęcherzyki – późne endosomy.



Hipoteza sygnałowa

Sekwencja sygnałowa lub peptyd sygnałowy to sekwencja aminokwasów o długości 13-35 reszt o charakterze hydrofobowym.

- Peptyd sygnałowy powstaje na końcu N-białka
- Do peptydu wiąże się *cząsteczka rozpoznająca sygnał* (SRP, kompleks 7S RNA i 6 białek)
- Receptor SRP ZWIĄZANY Z translokonem kieruje białko do wnętrza ER.
- Peptyd sygnałowy zostaje obcięty po wewnętrznej stronie ER przez *peptydazę*

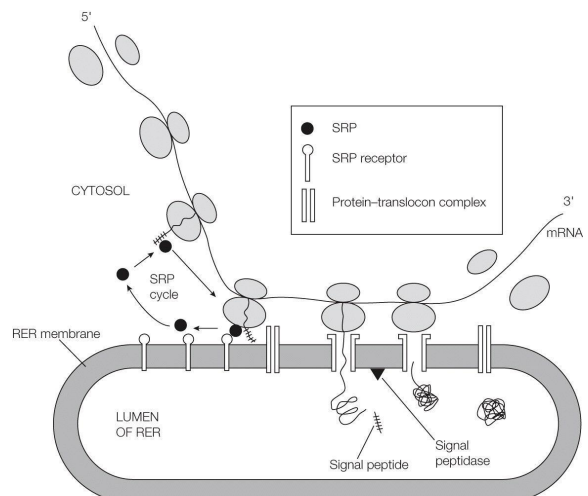


Figure H4.2 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

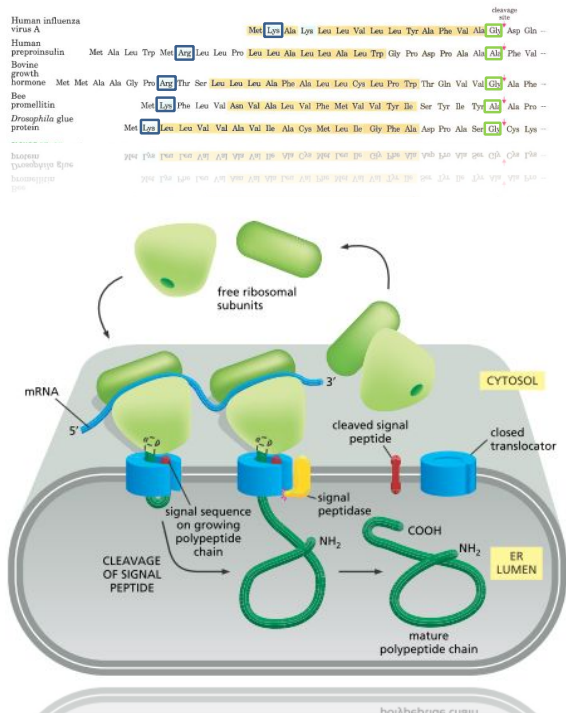
Mechanizm transportu u eukariotów

- Sygnał transportu do ER zawsze składa się z hydrofobowego rdzenia poprzedzanego przez jedną lub więcej reszt zasadowych.
- Miejsce cięcia bezpośrednio poprzedza aminokwas polarny, albo taki z bardzo małym łańcuchem bocznym.

Do rozpoznania sekwencji sygnałowej potrzebne są dwa składniki:

- *SRP* (cząsteczka rozpoznająca sygnał)
- *receptor SRP* (system ten jest obecny we wszystkich komórkach eukariotycznych więc jest bardzo stary ewolucyjnie)

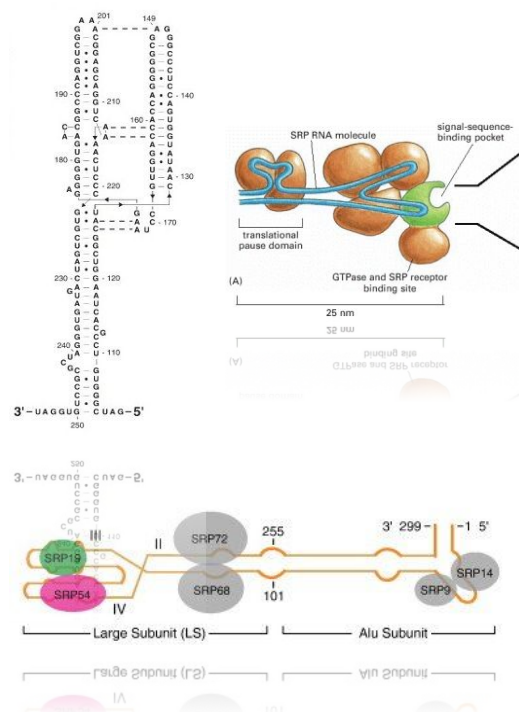
Cząsteczka *SRP* ma dużą hydrofobową kieszeń, która wiąże peptyd sygnałowy. W kieszeni znajdują się metioniny, które mają nierozgałęziony, elastyczny boczny łańcuch – dzięki temu kieszeń jest plastyczna i może związać peptydy sygnałowe różniące się wielkością, sekwencją i kształtem



Cząsteczka rozpoznająca sygnał (SRP)

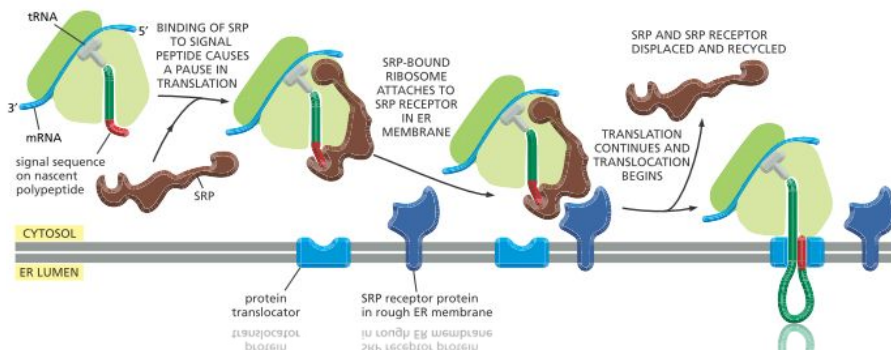
SRP składa się z cząsteczki 7S RNA i sześciu białek.

- 7S RNA składa się z ok. 300 nt i przyjmuje strukturę drugorzędową;
- Podjednostka *Alu* odpowiedzialna jest za zablokowanie translacji;
- Duża podjednostka (LS) odpowiedzialna jest za rozpoznawanie sygnału i wiązanie z receptorem błonowym;



Cząsteczka rozpoznająca sygnał (SRP)

- Cząsteczka SRP wiąże odsłonięty peptyd sygnałowy oraz rybosom, powodując zahamowanie translacji.
- W błonie ER obok translokazy znajduje się receptor SRP, zbudowany z dwóch łańcuchów polipeptydowych, który wiąże kompleks SRP-rybosom i kieruje go na translokazę.
- Następuje rozluźnienie połączenia SRP, jego receptora i rybosomu w wyniku czego pozostaje tylko rybosom związany z translokazą.
- Translokaza wciąga peptyd sygnałowy w por znajdujący się w błonie i przeciska przez dwuwarstwę lipidową.
- Zarówno białko SRP jak i oba łańcuchy receptora mają domeny GTPazowe, więc rozluźnienie całego kompleksu odbywa się na koszt hydrolizy GTP.
- Cząsteczka SRP jest wielokrotnego użytku – po uwolnieniu może związać kolejny rybosom.



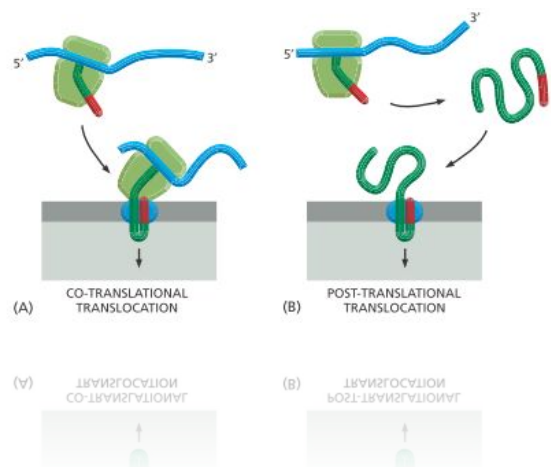
Kierowanie białek

Transport *kotranslacyjny*:

- synteza w szorstkim ER;
- transport równoległe z syntezą białka;

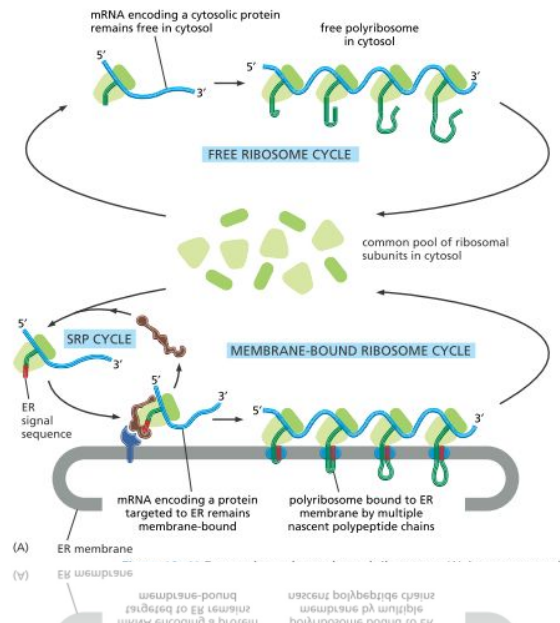
Transport *potranslacyjny*:

- wolne rybosomy w cytoplazmie;
- najpierw synteza potem transport (białko jest kompletne);



Transport ko- vs. po-translacyjny

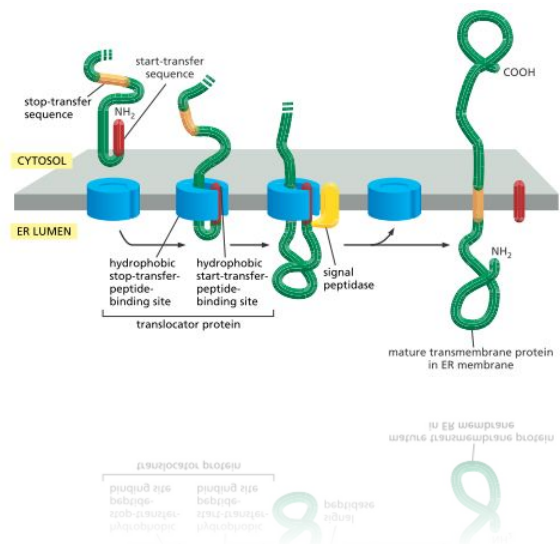
- Wszystkie białka są syntetyzowane na tej samej puli rybosomów – niektóre po prostu zostają w cytoplazmie a niektóre są wiązane z ER.
- Jeżeli z sekwencją sygnałową zwiąże się SRP (*ang. Signal Recognition Peptide*) – rybosom wędruje do błony ER.
- Cząsteczka mRNA jest trwale związana z ER jako, że jest integralną częścią rybosomu (lub polisomu).
- Rybosomy, które kończą syntezę rozdysocjują na podjednostki i wracają do wspólnej puli podjednostek w cytoplazmie.



Transport ko- vs. po-translacyjny

Model wyjaśniający transport białka z jedną helisą transbłonową.

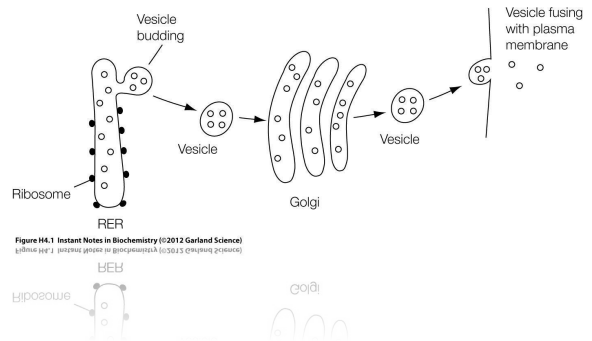
- białko takie zostaje wbudowane w błonę ER (np. białka integralne błony);
- sekwencja sygnałowa -*początek translacji*, na N końcu funkcjonuje jako sygnał startu translacji, białko posiada drugi sygnał wewnątrz sekwencji – *koniec translacji*.
- wszystko przebiega tak jak poprzednio, ale kiedy sekwencja stop wejdzie do *translokazy*, peptydaza sygnałowa odcina sekwencję startu, translokaza zmienia swoją konformację i wypuszcza polipeptyd bezpośrednio do dwuwarstwy lipidowej



Białka sekrecyjne

U eukariotów

- › synteza zachodzi w szorstkim retikulum endoplazmatycznym (RER)
- › fałdowanie zachodzi w świetle RER
- › w aparacie Golgiego (kompleksie Golgiego) białka ulegają dalszej modyfikacji (np. glikozylacja)

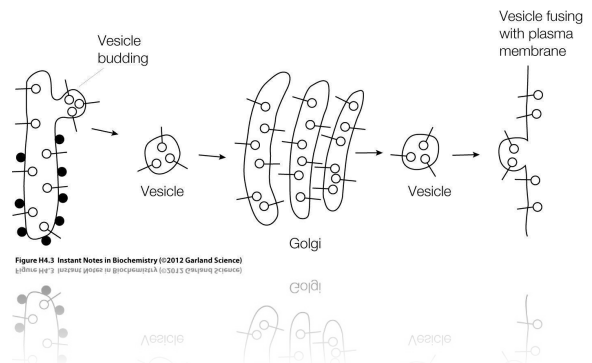


Białka błony komórkowej

Podobnie jak białka sekrecyjne po translacji białka błonowe trafiają do aparatu Golgiego ale w związku ze swoim przeznaczeniem nie opuszczają one błony od momentu syntezy do momentu wbudowania.

Orientacja białka w błonie jest zdeterminowana już w momencie syntezy.

Sekwencje topogenne (sekwencje sygnałowe przy końcu N, wewnętrzne sekwencje sygnałowe i sekwencje kotwiczące) determinują skład jakościowy i ilościowy białek błonowych.



Białka błonowe

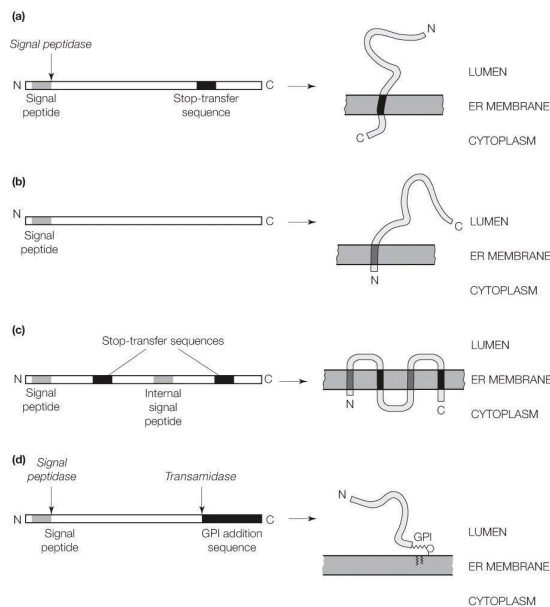


Figure H4.4 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Białka rektikulum endoplazmatycznego

Białka ER odpowiedzialne są między innymi za kontrolę poprawności fałdowania.

Do tych białek należą *chaperony*.

C-terminalny sygnał retencji (KDEL=Lys-Asp-Glu-Leu) pozwala pozostać/powrócić tym białkom do ER.

Białka lizosomowe

Mannoza-6-fosforan przyłączany do białek lizosomowych jest odpowiedzialny wraz z błonowym receptorem mannoso-6-fosforanowym za kierowanie białek do lizosomów.

Inną drogą kierowania białek do lizosomu jest *droga zbierania* (ang. *scavenger pathway*) i proces endocytozy kierowanej receptorami.

Lizosomal Storage Diseases.

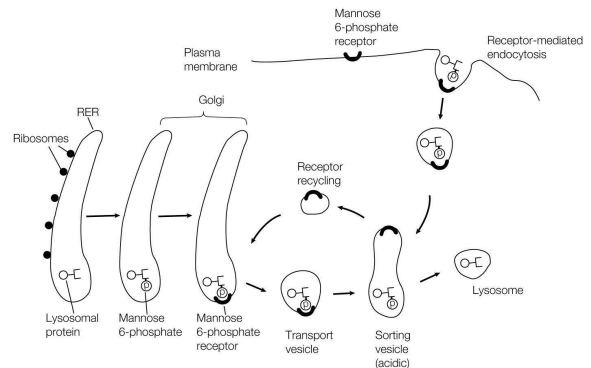


Figure 14.5 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)



Białka mitochondrialne i chloroplastowe

Białka mogą być kierowane do:

- zewnętrznej błony mitochondrialnej,
- wewnętrznej błony mitochondrialnej,
- przestrzeni międzybłonowej,
- matriks,

a w chloroplastach dodatkowo:

- błony tylakoidowej,
- przestrzeni tylakoidowej.

Podobnie jak w przypadku białek sekrecyjnych kierowanie następuje poprzez peptyd - *sekwencję kierującą* polipeptyd bogaty w reszty seryny, treoniny i dodatnio naładowanych aminokwasów.

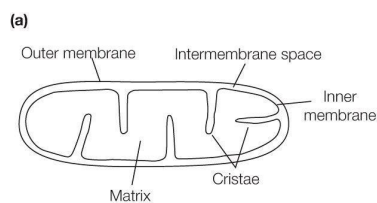


Figure A2.2 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

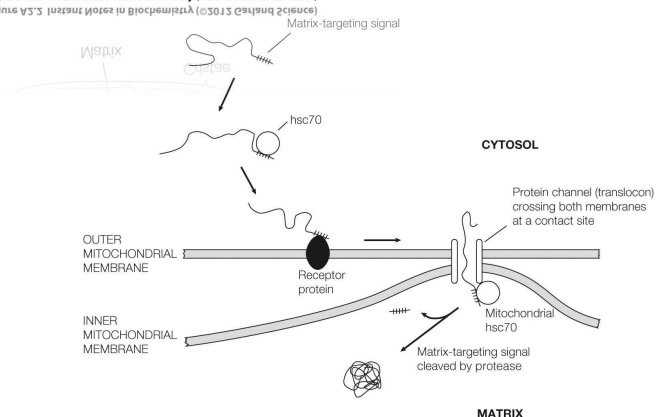


Figure 14.6 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Białka jądrowe

Błona wewnętrzna i zewnętrzna jądra zawiera 3000-4000 porów jądrowych.

Każdy z porów złożony jest z około 100 białek zorganizowanych heksagonalnie.

O ile małe cząsteczki mogą 'swobodnie' przemieszczać się przez pory to białka wymagają sygnału lokalizacji jądrowej bogatej w lizyny i argininy oraz prolinę.

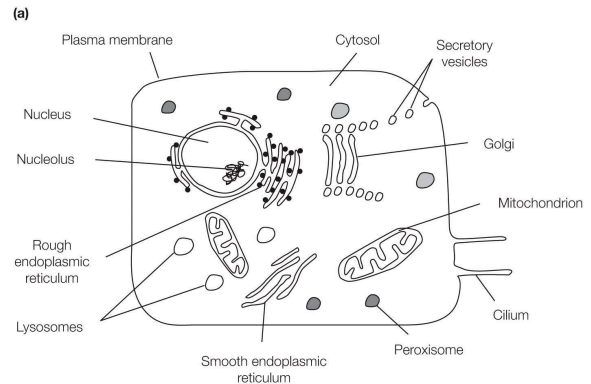


Figure A2.1a Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)



Mechanizm transportu u prokariota

| Sec

Istnieje możliwość transportu w trakcie translacji (kotrancylnie).

- N koniec białka jest rozpoznawany przez maszynę transportującą w poprzek błony.
- Białka eksportowe mają na końcu N sekwencję liderową (składającą się z części hydrofilowej na końcu N i przylegającej do niej części hydrofobowej)
- Białko podlega zmianom konformacyjnym w czasie transportu np. β -laktamaza (enzym rozkładający ampicylinę) w cytoplazmie i w trakcie przechodzenia przez błonę jest wrażliwa na trawienie trypsyną, natomiast w przestrzeni periplazmatycznej już nie (ma schowane miejsce rozpoznawalne przez tę proteazę).
- Białka, które mają być przetransportowane przez błonę są opłaszczane czaperonem (białkiem opiekuńczym) SecA.
- SecA rozpoznaje białko SecB (peryferyjne białko błony o charakterze ATPazy).
- Następuje hydroliza ATP i transportowane białko jest przekazywane SecE i SecY
- Pierwsze 20 aminokwasów transportowanego białka zostaje wpompowane do kanału błonowego a dalszy transport odbywa się na koszt potencjału elektrycznego istniejącego w poprzek błony

Inner membrane proteins

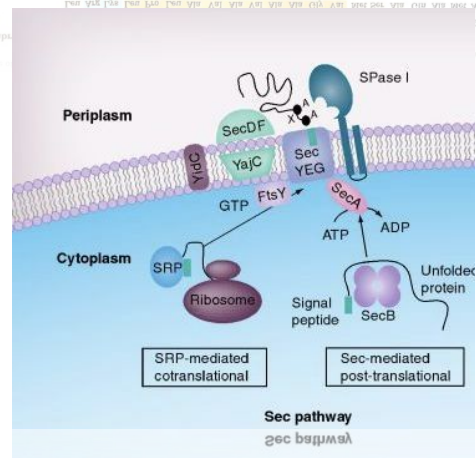
Phage ϕ 1 major coat protein Met Lys Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu Val Pro Met Leu Ser Phe Ala Ala Glu -
 Phage ϕ 1 minor coat protein Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser Ala Glu -

Periplasmic proteins

Alkaline phosphatase Met Lys His 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 β BRE22 Met Ser Ile Gln His Phe Arg Val Ala Leu Ile Pro Phe Phe Ala Phe Cys Leu Pro Val Phe Ala His Pro -

Outer membrane proteins

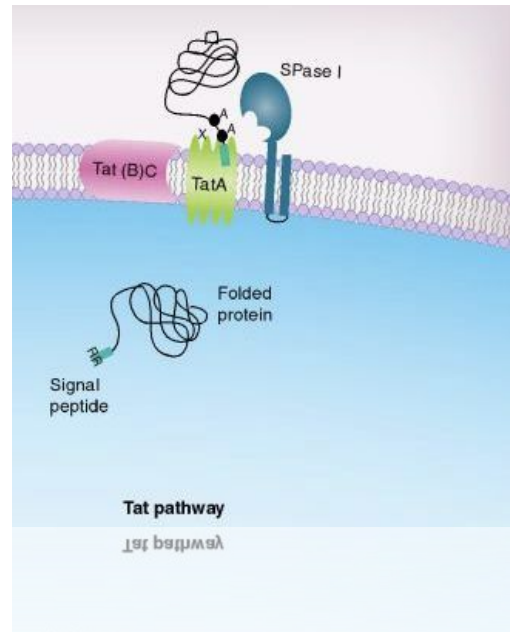
Lipoprotein Met Lys Ala Thr Lys Leu Val Leu Gly Ala Val Ile Leu Gly Ser Thr Leu Leu Ala Gly Cys Ser -
 LamB Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala Gly Val Met Ser Ala Glu Ala Met Ala Val Asp -
 OmpA Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpC Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpF Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpN Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpX Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpY Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpZ Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpA Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpC Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpF Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpN Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpX Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpY Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -
 OmpZ Met Met Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro -



Mechanizm transportu u prokariota | Tat

Tat (ang. *twin-arginine translocation pathway*, *Tat pathway*) jest, podobnie jak ścieżka Sec, metodą transportu i wydzielania białek. Występuje one u roślin, bakterii i archei.

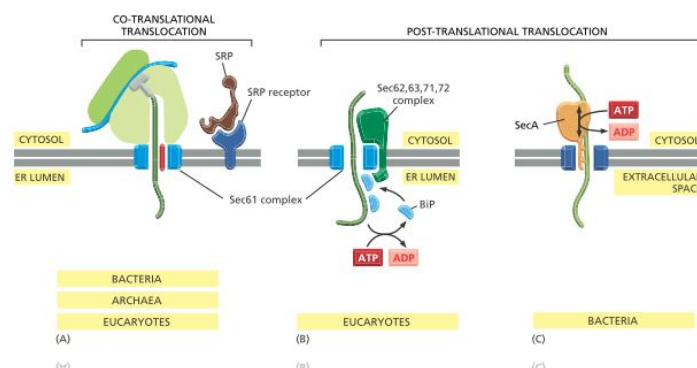
W przeciwieństwie do ścieżki Sec białka transportowane w formie sfałdowanej.



Transport ko- vs. po-translacyjny - Podsumowanie

W transporcie ko- i potranslacyjnym używane są podobnie zbudowane translokazy.

- w kotranslacyjnym rybosom wiąże się z translokazą *Sec61* na błonie ER.
- potranslacyjny transport u eukariontów – z *Sec61* związane są także *Sec62*, *Sec63*, *Sec71* i *Sec72*; do transportu niezbędna jest cząsteczka *BiP* – wiąże się ona z przewlekanym przez błonę polipeptydem i odłącza na koszt ATP (działa trochę jak zębátka).
- potranslacyjny transport u prokariotów – kompletne białko jest wiązane z translokazą przez białko *SecA*, które jest ATPazą; na koszt hydrolizy ATP zmienia się konformacja *SecA* i w każdym cyklu do kanału wpychane j



Modyfikacje potranslacyjne

· Pierwsza modyfikacja – odcięcie

N-formylometioniny z N-końca przez specyficzną peptydazę.

· 50% białek eukariotycznych ma grupę aminową z końca N acetylowaną.

· Usuwanie sekwencji liderowej, sygnałowej.

· Modyfikacje indywidualnych aminokwasów:

· grupy hydroksylowe (Ser, Thr, Tyr) – fosforylacja;

· Glu, Asp – dodatkowe grupy karboksylowe;

· Lys – metylacja;

· fosforylacja;

· glikozylacja;

· metylacja;

· N-acetylacja;

· nitryzylacja;

· lipidyzacja;

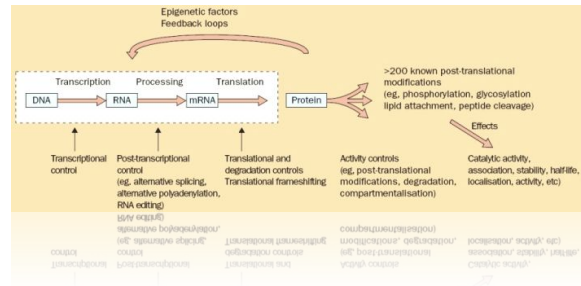
· SUMOilacja;

· Podział w zależności od mechanizmu:

· kowalencyjne przyłączenie grup funkcyjnych;

· proteolityczne cięcie łańcuchów polipeptydowych;

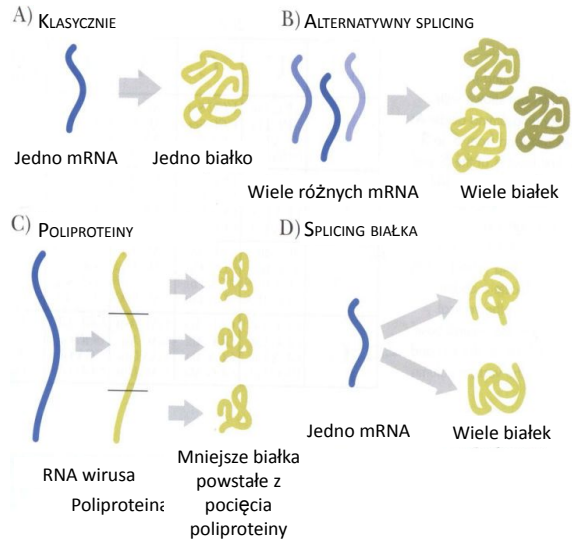
· chemiczne modyfikacje łańcuchów bocznych aminokwasów;



Modyfikacje proteolityczne

Jak wiele białek?

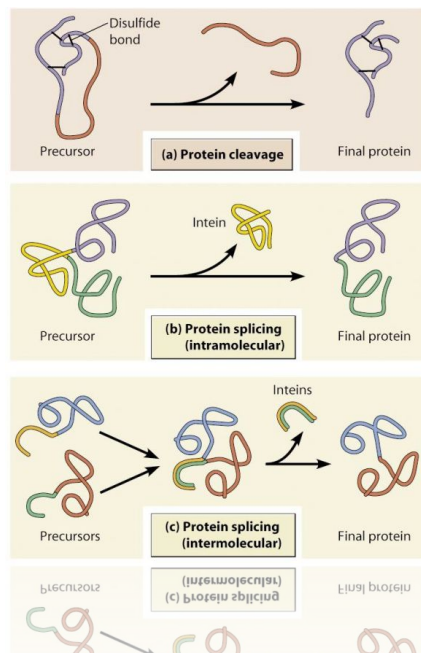
Składanie białek zwane inaczej *splicingiem białek* to modyfikacja potranslacyjna, w której przepływ informacji z genu do jego produktu białkowego jest modulowany w sposób pozwalający na powstanie dwóch funkcjonalnie nie związanych białek.



Składanie białek

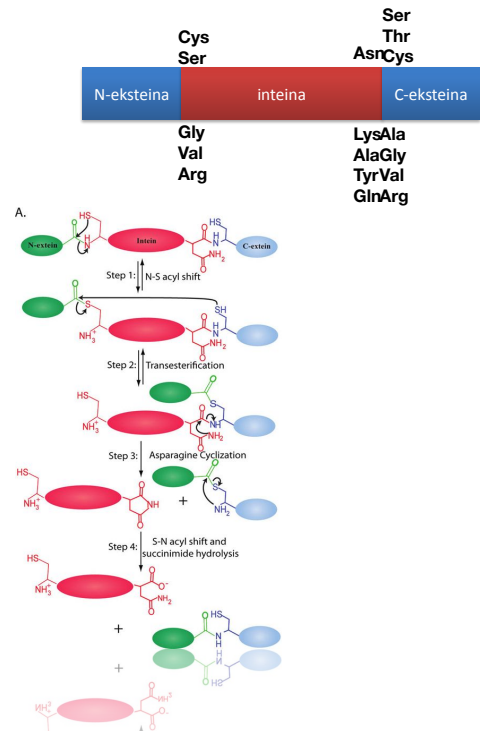
- Z łańcucha polipeptydowego zostaje wycięty wewnętrzny segment (zwykle 40-60kDa) – inteina.
- Dwa segmenty zewnętrzne (eksteiny) zostają połączone za pomocą wiązaniem peptydowym.
- Pierwotny produkt translacji to *białko prekursorowe*.
- Produkt składania to białko dojrzałe lub złożone.
- Reakcja przebiega *autokatalitycznie*, bez udziału innych enzymów.
- Stwarza dodatkowe możliwości powstawania białek o nowej funkcji.
- Znanych jest ponad 350 białek zawierających inteiny (150 u eubakterii, 110 u archebakterii, 70 u eukariontów, a także u wirusów i fagów).

Znajdowane w enzymach metabolicznych, polimerazach DNA i RNA, proteazach, reduktazach rybonukleotydów i ATP-azach.



Mechanizm wycięcia inteiny

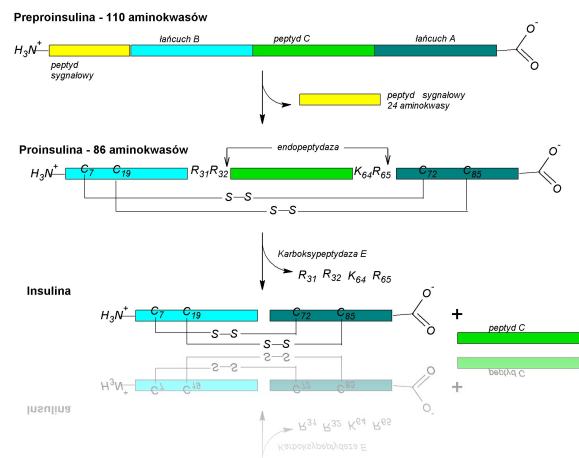
- Wiązanie peptydowe łączące *N-eksteinę* z inteiną zostaje zamienione na wiązanie tioestrowe lub estrowe poprzez nukleofilowy atak końcowych reszt *inteiny* (cysteina lub seryna);
- Pierwsza reszta *C-eksteiny* służy do nukleofilowego ataku na powstały ester w rezultacie czego *N-eksteina* zostaje przeniesiona z pierwszej reszty inteiny na pierwszą resztę *C-eksteiny*.
- Konserwatywna reszta asparaginy leżąca na końcu C inteiny ulega cyklizacji co związane jest z przecięciem wiązania peptydowego łączącego inteinę z *C-eksteiną*.
- Wiązanie estrowe łączące *eksteiny* konwertowane jest do amidowego a imid kwasu aminobursztynowego na końcu C inteiny ulega hydrolizie.



Modyfikacje proteolityczne

Rozpad wiązań peptydowych katalizowanych przez endo- i egzopeptydazy należy do nieodwracalnymi modyfikacjami potranslacyjnymi.

- Odcinanie inicjującej metioniny z tworzonego łańcucha polipeptydowego, sekwencji sygnałowych odpowiadające za skierowanie białka do określonej lokalizacji subkomórkowej (np.: do mitochondriów) lub zewnątrzkomórkowej.
- Przekształcanie nieaktywnych form hormonów (np. proinsuliny) w formę aktywną poprzez wycinanie 24-aminokwasowego fragmentu łańcucha polipeptydowego.



Modyfikacje kowalencyjne

Modyfikacja kowalencyjne - zestawienie

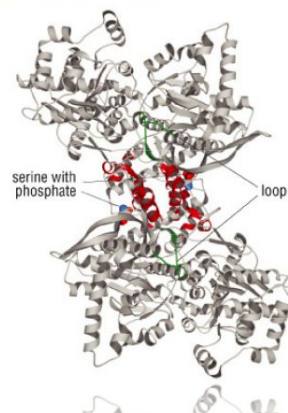
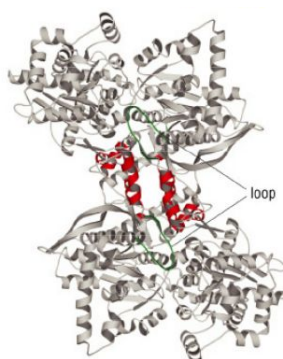
Nazwa modyfikacji	Modyfikowany aminokwas	Opis modyfikacji	Enzym katalizujący reakcję
Fosforylacja /defosforylacja	tyrozyna, treonina, seryna, (histydyna, lizyna, arginina, cysteina)	Przenoszenie grupy γ -fosforanowej z ATP na grupę hydroksylową łańcucha bocznego aminokwasu	Kinazy/fosfatazy
Acetylacja	Lizyna	Przenoszenie grupy acetylowej z acetyloCoA na grupę ϵ -aminową lizyny	Acetylotransferazy
Acylacja: - mirystylacja - palmitylacja	- glicyna na N- końcu polipeptydu - cysteina	- przeniesienie reszty kwasu mirystynowego (C14) na glicynę - przeniesienie reszty kwasu palmitynowego z palmitoilo-CoA na grupę hydrosulfidową reszt cysteiny	NMT (N-mirystyl-transferaza)
Formylacja	metionina	tworzenie N-formylometioniny przez przeniesienie grupy formylowej na N-końcową metioninę	transformylaza
Metylacja	aminokwasy zasadowe, glutamina, asparagina	przeniesienie grupy metylowej z S-adenozylometioniny lub betainy na atom N (lub O dla Asn) łańcucha bocznego aminokwasu	metylotransferazy
Prenylacja:			

Modyfikacja kowalencyjne - zestawienie

Nazwa modyfikacji	Modyfikowany aminokwas	Opis modyfikacji	Enzym katalizujący reakcję
Glikozylacja	asparagina, seryna, treonina	przyłączanie cukrowców do atomów N lub O reszt aminokwasowych	glikozylotransferazy
Sulfonowanie	tyrozyna	przeniesienie grupy sulfonowej z PAPS na resztę tyrozynową	sulfotransferaza
Ubikwitynizacja	Lizyna	połączenie C-końcowej glicyny ubikwityny z grupą ε-aminową lizyny	ligazy E1, E2, E3
Mono-ADP-rybozylacja	arginina	przeniesienie pojedynczej reszty ADP-rybozy z NAD na białko	mono-ADP-rybozylotransferaza
Poli-ADP-rybozylacja	kwas glutaminowy, fosfoseryna	tworzenie łańcucha poli-ADP-rybozy następujące po mono-ADP-rybozylacji	syntaza poli(ADPR)
Adenylicacja	tyrozyna, seryna, treonina	przyłączenie AMP do grupy hydroksylowej łańcucha bocznego aminokwasu	transferaza adenylicowa
Sumoilacja	Lizyna	przyłączenie małej cząsteczki białka SUMO-1 przez wiązanie grupy karboksylowej glicyny z grupą ε-aminową białka	enzym sprzęgający
Powstawanie kotwic GPI	C-końiec białka	przyłączenie jednostki glikozylfosfatydyloinozylowej do C-końca polipeptydu	

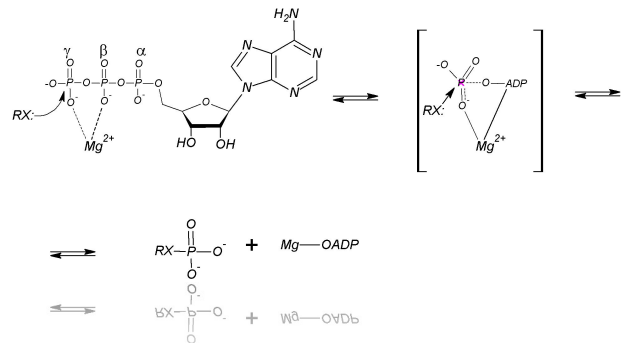
Fosforylacja

- Najbardziej powszechna kowalencyjna, *odwracalna* modyfikacja, szacuje się że ok. 1/3 białek może być fosforylowana.
- U eukariontów Ser, Thr, Tyr, u prokariotów His i Asp.
- Grupy fosforanowe dodawane są przez enzymy – *kinazy*, usuwane przez *fosfatazy*.
- Fosforylacja powoduje przyłączenie naładowanej nowej grupy, która może tworzyć nowe wiązania wodorowe z amidami łańcucha głównego albo mostki solne z arginina.
- Powoduje to bardzo istotne zmiany konformacyjne białek, ich aktywację lub deaktywację:
 - np. fosforylaza glikogenu: ufosforylowanie seryny¹⁴ powoduje całkowitą zmianę konformacji końca N, łańcuch boczny seryny przesuwa się o 50 Å i zmienia powierzchnię kontaktu podjednostek w dimerze – zmiany te powodują aktywację białka



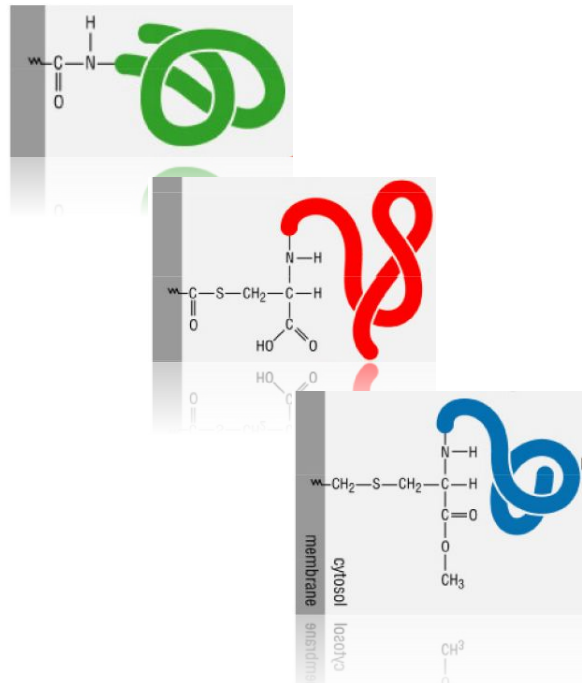
Fosforylacja

- Reakcja katalizowana przez kinazy białkowe.
- Jako kosubstrat występuje ATP dostarczający grupy γ -fosforanowej (γ -PO₄). Kation Mg²⁺ chelatowany przez dwa aniony tlenowe grup fosforanowych cząsteczki ATP ułatwia przeniesienie grupy γ -PO₄ na grupę hydroksylową reszty aminokwasowej
- Reakcję rozpoczyna regioselektywny atak grupy hydroksylowej łańcucha bocznego aminokwasu na elektrofilową grupę γ -fosforanową kompleksu Mg-ATP, zachodzi to przy specyficznym położeniu substratów w centrum aktywnym kinazy. Powstaje stan przejściowy, w którym rozrywane jest wiązanie γ P-O
- W centrum aktywnym kinaz znajduje się miejsce wiążące ATP, które jest konserwatywne i różni się tylko nieznacznie budową łańcuchów bocznych kinazy co wpływa na powinowactwo wiązania. Natomiast miejsca wiążące fosforylowany substrat mają różną budowę zarówno w zależności od aminokwasu podlegającego reakcji (miejsca wiążące tyrozinę tworzą głębszą kieszeń niż miejsca wiążące serynę i treoninę), jak i w zależności od sekwencji otaczającej ten aminokwas.



Lipidacja (acylacja)

- *Myristylacja* – modyfikacja kotranslacyjna, polegająca na przyłączeniu 14C kwasu tłuszczowego do N-końcowej glicyny poprzez stabilny amid
- *Palmitylacja* – odwracalna modyfikacja potranslacyjna – przyłączenie 16C kwasu tłuszczowego do cysteiny wiązaniem tioestrowym
- *Prenylacja* – nieodwracalna modyfikacja potranslacyjna, przyłączenie farnesyly lub geranylogeranyly wiązaniem tioeterowym do łańcucha bocznego czwartej od końca C cysteiny. Proteolityczne przycięcie i metylacja powoduje że staje się ona końcową cysteiną

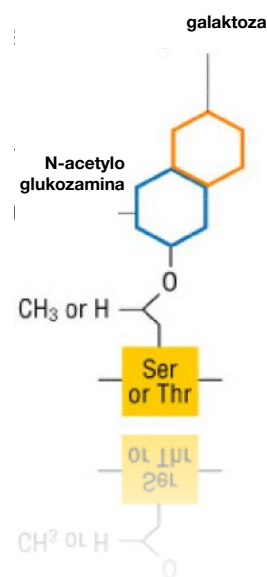


Glikozylacja

- Polega na przyłączeniu reszt cukrowcowych do aminokwasów, szacuje się, że połowa białek w komórkach jest glikozylowana
- Mechanizmy glikozylacji stwierdzono u wszystkich organizmów: eu-, prokariotycznych i Archea
- Glikozylowane są zarówno białka sekrecyjne, jak i ligandy na powierzchni komórki i białka cytoplazmatyczne
- Powoduje ochronę przed proteolizą, wpływa na aktywność enzymatyczną, ułatwia zwijanie białek, zwiększa rozpuszczalność, zapobiega agregacji, wpływa na immunogenność, blokuje fosforylację, wpływa na oddziaływania białko-białko
- W ER jest wykorzystywana do sprawdzania poprawności fałdowania białka
- Powoduje bardzo duże zmiany składu białkowego komórek – proteomu, zmieniając drastycznie masę białka i punkt izoelektryczny
- Mogą powstać tysiące wariantów glikozylowanego białka ze względu na różnice w
 - sposobie przyłączenia reszt cukrowcowych
 - składzie – typie cukrów dołączonych do białka
 - strukturze – łańcuchy rozgałęzione/nierozgałęzione
 - długości i ilości łańcuchów cukrowcowych
- wyróżnia się dwa podstawowe typy glikozylacji: O- i N-glikozylację
- a także: glikozylacje fosfoserynową i C-mannosylację

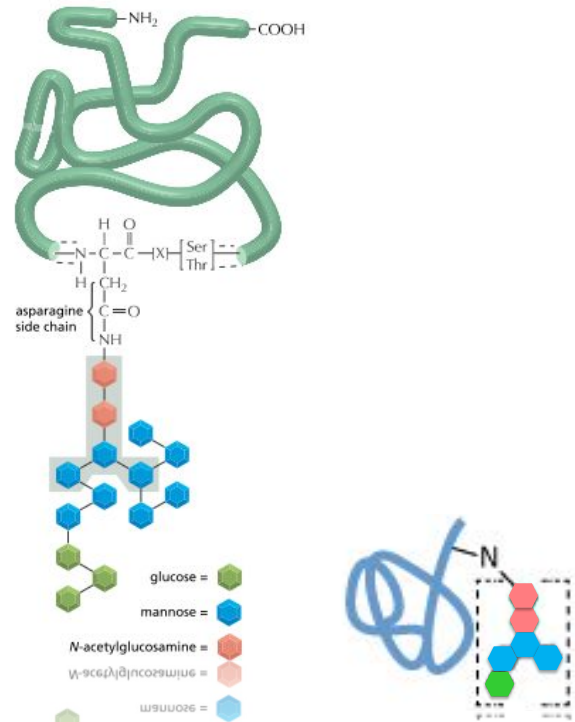
O-glikozylacja

- poddawane są tej modyfikacji głównie białka matrix międzykomórkowej, ale także np. przeciwciała
- O-glikozylacja zachodzi potranslacyjnie poprzez przyłączenie cukrowców do grupy hydroksylowej seryny, treoniny lub hydroksyproliny i hydroksylizyny jak ma to miejsce w przypadku kolagenu
- zachodzi w aparacie Golgiego i powstająca struktura cukrowcowa jest znacznie prostsza niż przy N-glikozylacji
- zachodzi przy pomocy glikozylotransferaz – N-acetyloglukozaminowej lub N-acetylogalaktozaminowej, które dołączają pierwszy segment do aminokwasu - N-acetyloglukozaminę lub N-acetylogalaktozaminę
- następnie może dojść do przyłączania kolejno następujących reszt monocukrowych
- następuje drogą glikozylacji sekwencyjnej, tj. kolejno następującego po sobie przyłączania reszt monocukrowych do białka
- produkt działania jednej glikozylotransferazy staje się akceptorem-substratem dla następnej glikozylotransferazy
- typ i liczba dodanych monosacharydów zależy od substratu białkowego oraz typów glikozylotransferaz



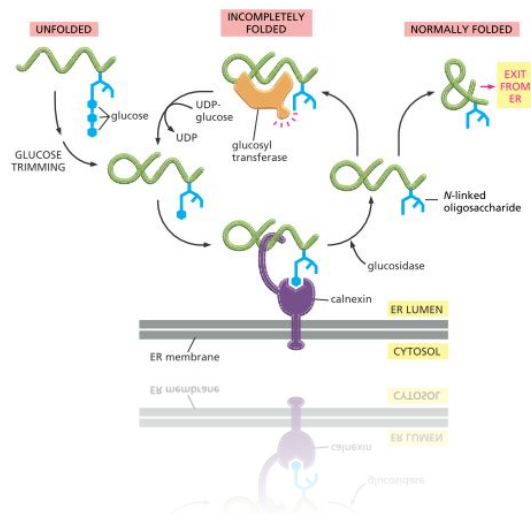
N-glikozylacja

- jest modyfikacją kotranslacyjną – powstaje w trakcie syntezy białka w ER
- około 90% białek glikozylowanych jest modyfikowanych w ten sposób
- polega na przyłączaniu reszt cukrowych do azotu grupy aminowej bocznych łańcuchów asparagin w sekwencji AsnXSer lub AsnXThr
- część cukrowca N-glikoprotein jest większa i bardziej skomplikowana niż O-glikoprotein
- przebiega w kilku etapach:
 - składanie prekursora – pierwszy dołączany jest 14 członowy prekursor zbudowany z N-acetyloglukozaminy, mannozy i glukozy. 7 pierwszych cząsteczek przyłącza się do dolicholu (lipid błony ER) w cytoplazmie poprzez wiązanie pirofosforanowe. Po stworzeniu pierwotnego rdzenia Man5GlcNAc2-PP-dolichol przechodzi do światła ER, tam dodawane jest pozostałe 7 reszt i powstaje kompletny prekursor: Glc3Man9GlcNAc2-PP-dolichol
 - przyłączenie prekursora – czeka na białko przyłączony do dolicholu
 - przycinanie – glikozydazy i glikozylotransferazy odcinają i dokładają glukozy od końca rdzenia aż do momentu kiedy białko jest prawidłowo sfałdowane. Wszystkie prawidłowo sfałdowane glikoproteiny przechodzące do aparatu Golgiego mają sekwencję Man9GlcNAc2
 - dojrzewanie w AG – do tego momentu wszystkie N-glikoproteiny wyglądają tak samo, dopiero teraz dodawany jest charakterystyczny, indywidualny wzór glikozylacji. Mannozydazy I i II oraz transferaza N-acetyloglukozaminy doprowadzają do powstania wspólnego rdzenia a następnie dołączane są reszty glikozyłowe pochodzące z UDP-cukrów



N-glikozylacja

- przyłączenie i odłączenie reszt cukrowych jest sposobem na sprawdzenie czy białko prawidłowo się sfałdowało – kluczową rolę odgrywają dwa czaperony – kalneksyna i kalretikulina, oba wymagające jonów wapnia do prawidłowego działania
- glikozydaza odcina dwie końcowe reszty glukozy a do jednej pozostałej przyłączają się te 2 czaperony, pomagając się białku fałdować
- następnie glikozydaza przecina wiązanie łączące mannozę z glukozą odłączając tym samym czaperony od białka
- jeżeli białko nie jest prawidłowo sfałdowane to zostaje rozpoznane przez glikozylotransferazę UDP-glukozylo-glikoproteinową, która dołącza resztę glukozy, dzięki czemu białko ponownie jest rozpoznawane przez czaperony i cykl fałdowania się powtarza. Cykl może być powtarzany wielokrotnie, w momencie kiedy białko jest prawidłowo sfałdowane, nie ulega już glikozylacji
- białko zakotwiczone w błonie ER i będące w jego świetle za pośrednictwem pęcherzyków transportujących przechodzą do AG gdzie reszty cukrowe podlegają dalszym modyfikacjom



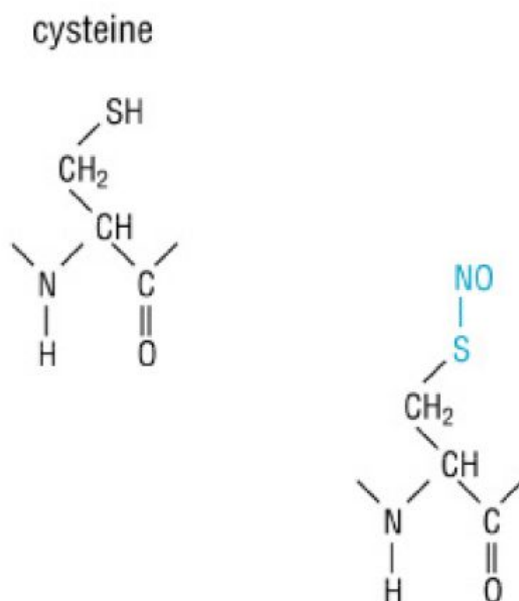
N-acetylacja

- › najczęściej dotyczy końca N białka, ponad 1/3 białek drożdżowych podlega tej modyfikacji
- › donorem jest acetylo-CoA
- › dodanie tej grupy powoduje niedostępność białka dla aminopeptydaz – przedłużenie życia białka
- › ogólna ochrona przed aminopeptydazami
- › zasadniczo jest nieodwracalna – wyjątek w histonach grupa epsilon-aminowa lizyny
- › powoduje zniesienie ładunku lizyny

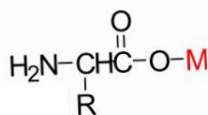


Nitrozylacja (nitrowanie)

- › chemiczna modyfikacja białek w wyniku reakcji z pochodnymi tlenu azotu zachodzi
- › wyróżnia się nitrowanie, czyli przyłączenie grupy nitrowej do pierścienia w łańcuchu bocznym tyrozyny i S-nitrozylację polegającą na reakcji rodnika tiolowego cysteiny z tlenkiem azotu na cysteinie, polega na odwracalnej modyfikacji -SH przez tlenek azotu
- › najczęściej modyfikowane są reszty cysteiny sąsiadujące z resztami kwaśnymi i zasadowymi oraz tych będących w otoczeniu hydrofobowym – ponad 100 znanych białek jest regulowanych w ten sposób
- › chodzi głównie o cysteiny kluczowe dla koordynacji jonów metali, leżące w miejscach katalitycznych i te zaangażowane w tworzenie mostków dwusiarczkowych
- › w związku z tym że NO jest gazem modyfikowane są tylko te grupy -SH, które leżą niedaleko miejsca jego powstawania



Ochrona grup funkcyjnych



Grupa karboksylowa

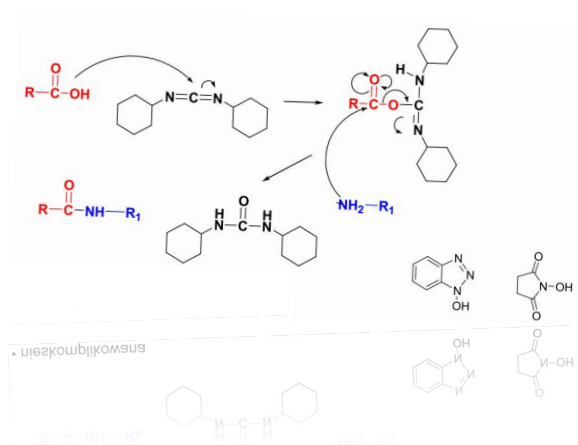
- do ochrony grupy karboksylowej stosuje się reakcję estryfikacji;

Metanol	$-\text{CH}_3$	Me
Etanol	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Et
<i>tert</i> -Butanol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	t-Bu
Fenol	$-\text{C}_6\text{H}_4$	BZI
<i>p</i> -Nitrofenol	$-\text{C}_6\text{H}_4(\text{NO}_2)$	NBZI
	$-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4$	
	$-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{NO}_2)$	

Wiązanie peptydowe

Metoda karbodiimidowa
(dicykloheksylokarbodiimid, DCC)

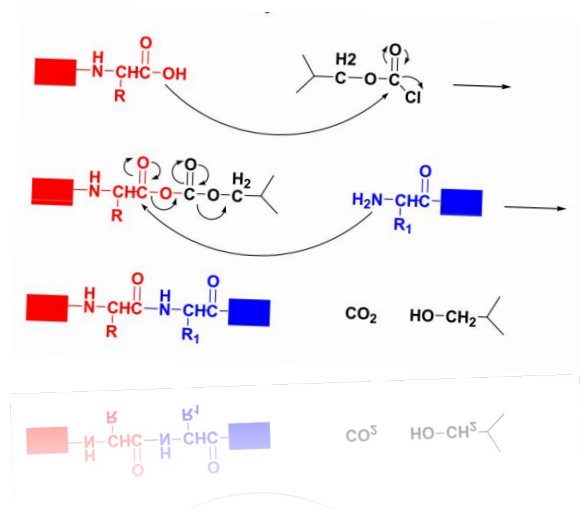
- tania;
- nieskomplikowana;
- produkty uboczne – *N*-acylomocznik, dicykloheksylomocznik;
- racemizacja – aby zapobiec dodatki antyracemizacyjne, odpowiedni rozpuszczalnik;



Wiązanie peptydowe

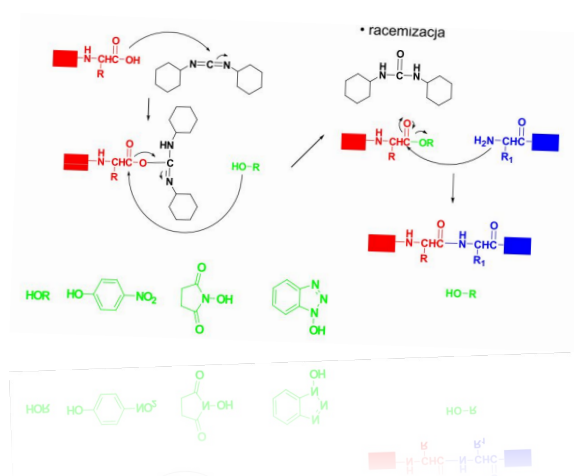
Metoda mieszanych bezwodników

- › wysoka wydajność;
- › łatwo usunąć produkty uboczne;



Wiązanie peptydowe

Metoda aktywnych estrów

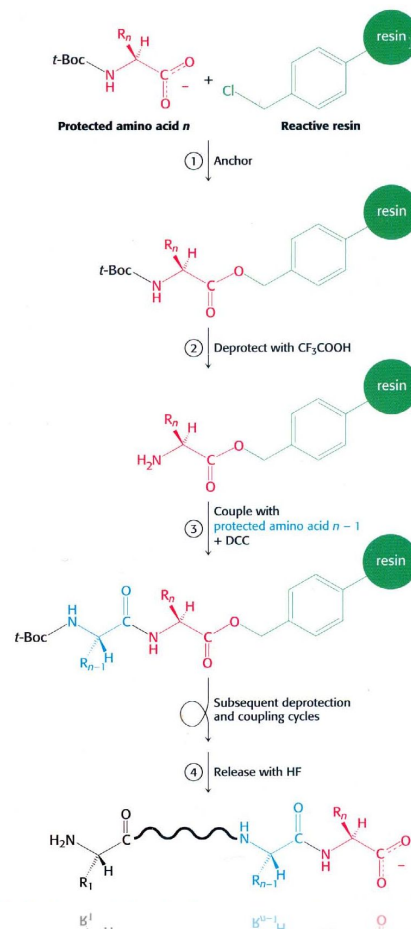
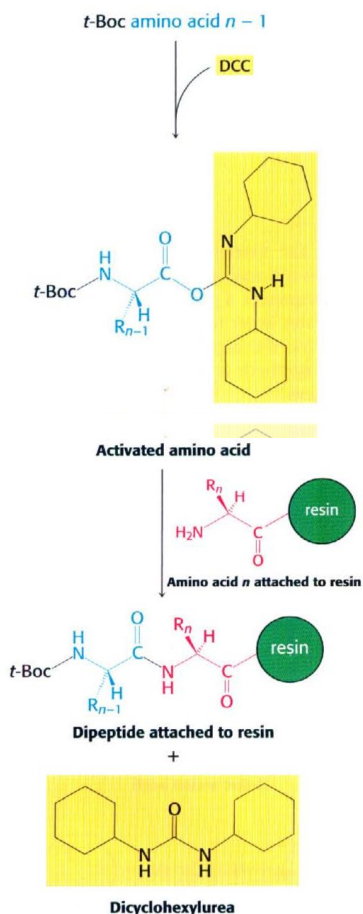


Synteza w fazie ciekłej

- › klasyczne podejście;
- › ma ogromne znaczenie w produkcji peptydów na skalę przemysłową;
- › stosuje się tu dwufazowe roztwory na bazie cykloheksanu;
- › w fazie homogennej zachodzi reakcja, po rozdzieleniu w jednej fazie jest produkt a w drugiej zużyty substrat;
- › główną wada tej metody jest to, że po każdej pojedynczej reakcji trzeba oczyszczać produkt (a więc wcześniej go odseparować) i usuwać zużyty substrat;

Synteza na nośniku stałym

- › stworzona przez Merrifielda (1963);
- › propagacja łańcucha peptydowego na nierozpuszczalnej żywicy polimerowej;
- › dzięki temu przyłączenie kolejnego aminokwasu poprzedzone jest tylko obmyciem z żywicy z peptydem produktów ubocznych i nieprzereagowanych substratów;
- › możliwe jest też stosowanie nadmiaru jednego z reagentów celem zwiększenia wydajności oraz częściowej lub nawet całkowitej automatyzacji procesu ;
- › wybór odpowiedniej żywicy determinuje struktura pożądanego peptydu, np. to, czy ma posiadać wolną grupę karboksylową na C-końcowym aminokwasie, czy też grupę amidową;
- › najczęściej stosowane są żywice polistyrenowe sieciowane diwinylobenzenem z przyłączonym labilnym w środowisku kwaśnym łącznikiem (tzw. „linkerem”);
- › odczepienie zsyntetyzowanego polipeptydu od nośnika następuje poprzez reakcję z kwasem trójchlorooctowym;



Enzymatyczna synteza białek

Najczęściej do syntezy białek stosuje się nadekspresję (mała wydajność) i chemiczną syntezę (niebezpieczeństwo recemizacji).

Alternatywnie można także zaprząć do pracy enzymy proteolityczne.

W warunkach fizjologicznych enzymy proteolityczne katalizują hydrolizę wiązań peptydowego, ale zdolne są również katalizować reakcję odwrotną, to jest reakcję syntezy tego wiązania, synteza zachodzi wówczas stereoselektywnie i nie jest wymagane blokowanie funkcyjnych grup bocznych aminokwasów

Stosowane enzymy :

- chymotrypsyna
- papaina
- alkalaza
- pronaza
- acylaza penicyliny
- lipaza

Synteza...

Synteza chemiczna na nośniku stałym

- › Stosunkowo stara metoda – dobrze opracowane protokoły
- › Droga (kosztowne substraty, z grupami osłonowymi i obniżenie wydajności jeżeli się z nich zrezygnuje)
- › Często bardzo wymagające warunki i szkodliwe substraty
- › Niebezpieczeństwo recemizacji
- › Bardzo łatwe odzyskanie produktu

Synteza enzymatyczna

- Metoda nowa, nie ma opracowanych protokołów
- Tanie (mniej sprzętu, odczynników, ludzi, energii)
- nieszkodliwe warunki
- Tylko krótkie peptydy (ale głównie dlatego, że nie ma automatyzacji – słabo rozwinięta technologia)

Fałdowanie białek

Białko prawidłowo sfaldowane jest aktywne biologicznie, białko rozfałdowanie/zdenaturowane jest biologicznie nieaktywne.

W po prawym fałdowaniu pomagają:

- › czaperoniny;
- › czaperony;
- › ko-czaperony (białka towarzyszące czaperonom i czaperoninom w fałdowaniu białek i innych funkcjach);

Odpowiadają one także za:

- › oligomeryzację białek, translokację i degradowanie;
- › występują u wszystkich organizmów od bakterii po ludzi;
- › zapobiegają nieprawidłowemu łączeniu się łańcuchów białkowych w niefunkcjonalne struktury;

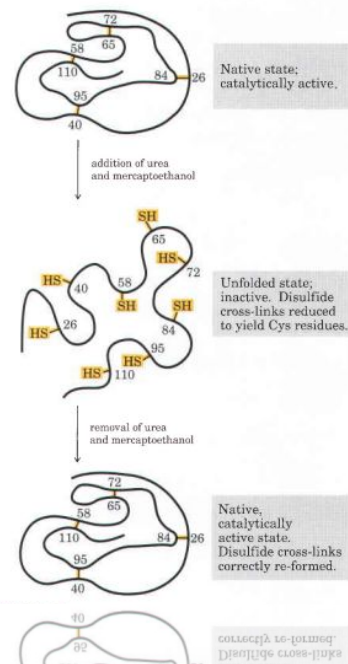
Molekularne czaperony potrzebne są zarówno w trakcie syntezy białka, ale także np. w warunkach stresowych kiedy dochodzi do uszkodzeń. Należą do białek szoku cieplnego (HSP) – odkryto je u bakterii poddanych działaniu wysokiej temperatury.

Fałdowanie białek

Białka fałdujące się bez pomocy czaperonów po denaturacji są w stanie wrócić do prawidłowej konformacji (oczywiście jeżeli denaturacja nie zniszczyła struktury).

Przykład rybonukleazy – mocznik zniszczył wiązania wodorowe, beta-merkaptetanol mostki dwusiarczkowe.

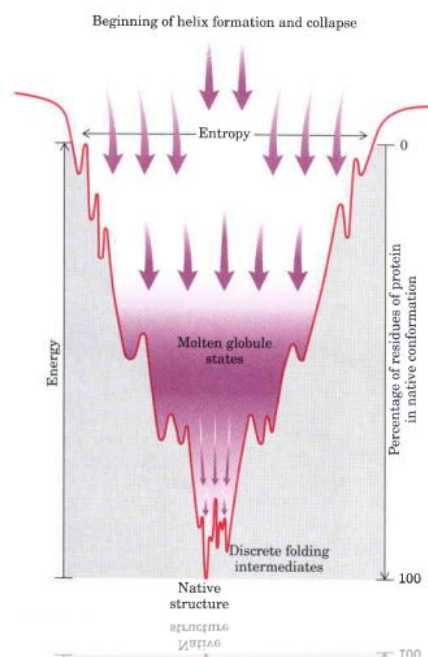
Renaturacja spowodowała odtworzenie mostków dwusiarczkowych w dokładnie tych samych miejscach.



Fałdowanie białek

Termodynamika fałdowania białek

- Na górze wiele różnych konformacji, więc entropia także jest duża;
- W miarę fałdowania, ścieżka termodynamiczna prowadzi w dół lejka;
- Zagłębienia na dnie lejka;

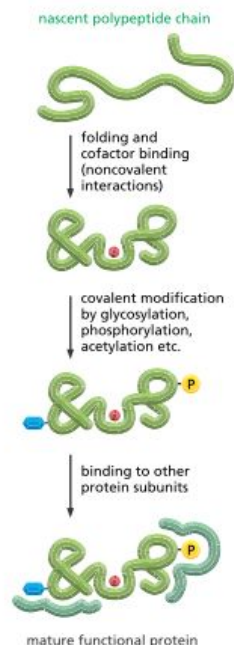


Sekwencja fałdowania

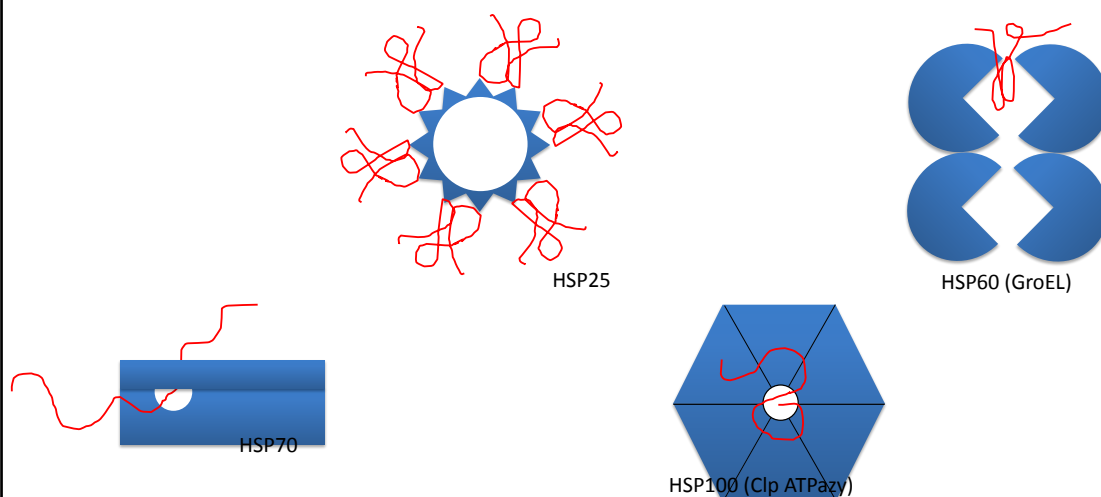
- › wiązanie kofaktora (interakcja niekowalencyjna);
- › modyfikacje kowalencyjne (glikozylacja, fosforylacja);
- › łączenie podjednostek (jeżeli białko jest oligomerym);

Niektóre białka fałdują się kotranslacyjnie – fragment wychodzący z rybosomu od razu zaczyna przybierać konformację;

Najpierw fałduje się koniec *N*, na końcu *C*, białko nie uzyska końcowej konformacji dopóki nie uwolni się z rybosomu;



Odziaływanie białko - czaperon



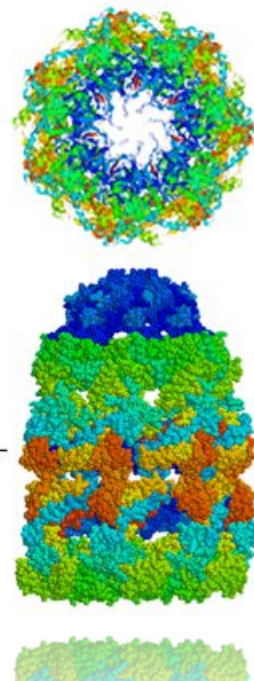
Czaperoniny

Kompleksy białkowe uczestniczące w fałdowaniu nowo powstających białek:

- pracują na koszt hydrolizy ATP
- dzieli się je na dwie grupy: I i II

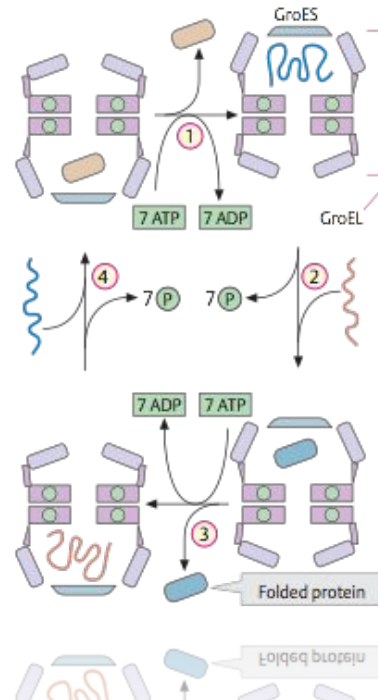
Czaperoniny: Grupa I

- występują u bakterii i w organellach (chloroplastach i mitochondriach);
- najlepiej poznanym kompleksem z tej grupy jest GroEL/GroES (HSP60) z *E. coli*;
- ma masę nieco poniżej 1 MDa;
- GroEL (czaperonina 60) – dwa pierścienie zbudowane z 7 podjednostek każda;
- część apikalna podjednostek jest hydrofobowym miejscem wiązania – co powoduje, że faworyzowane są niesfałdowane białka, część równikowa wiąże ATP ;
- GroES (czaperonina 10) – płaski dysk też z 7 podjednostek;



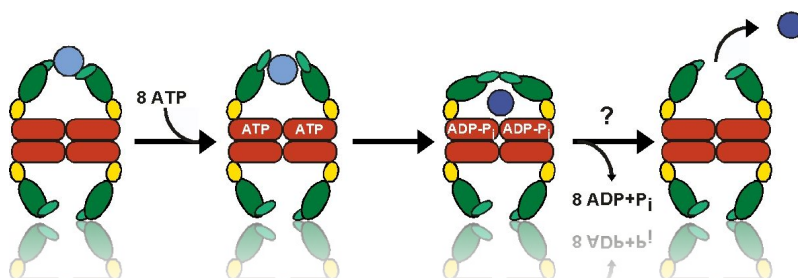
Działanie GroES/GroEL

- › zapewniają zamkniętą przestrzeń, gdzie pojedyncza cząsteczka białka może się sfałdować;
- › u *E. coli* znaleziono 85 białek, które były ściśle zależne od GroEL;
- › związanie niesfałdowanego białka przez region cis GroEL powoduje automatyczne związanie ATP i podjednostki GroES;
- › substrat zostaje zamknięty w komorze gdzie może się swobodnie fałdować;
- › hydroliza ATP i związanie ATP z pierścieniem trans powodują oddysocjowanie GroES i uwolnienie sfałdowanego białka z kompleksu;



Czaperoniny: Grupa II

- › w cytozolu eukariontów i u archea ;
- › nie potrzebują kofaktora w typie GroES do działania;
- › przedstawicielem jest TRiC (TCP-1 Ring Complex = CCT Chaperonic Containing TCP-1);
- › zbudowany jest z dwóch pierścieni po 8 podjednostek każdy posiadają analogiczne do Gro EL regiony;
- › jednak do zamknięcia substratu nie jest wymagany żaden odpowiednik GroES;
- › przedstawiciel u *Archea* – Mm cpn (*Methanococcus maripaludis* chaperonin) – też składa się z 18 podjednostek;
- › nie wiadomo co robi w naturze, ale jest zdolny do prawidłowego fałdowania rodanazy (białko mitochondrialne);



Nieprawidłowo pofałdowane białka

Choroba

Choroba Alzheimera
 Pląsawica Huntingtona
 Amyloidoza lizozymowa
 Choroba Parkinsona
 Zakażne encefalopatie gąbczaste
 Amyloidoza nerek
 Stwardnienie zanikowe boczne

Uszkodzone białko

β amyloid
 Huntingtyna
 Lizozym
 α synukleina
 Białka prionowe
 Fibrynogen
 Dysmutaza ponadtenkowa

Degradacja białek

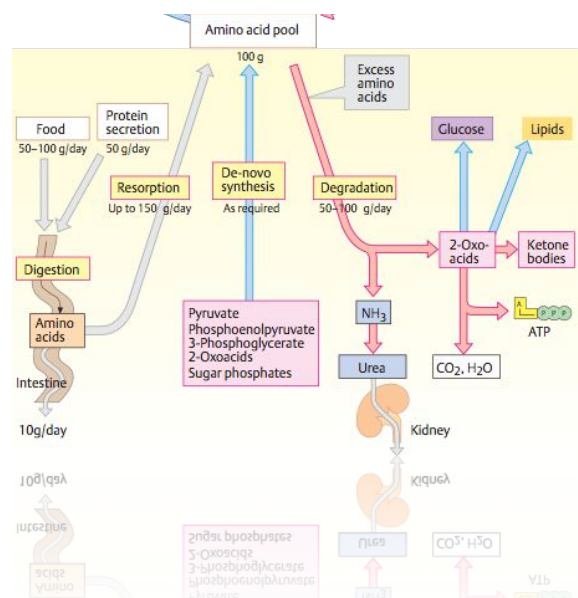
Białka degradowane są do aminokwasów.

Rozkład białek ma dwa aspekty:

- przyswojenie składników pokarmowych;
- recycling składników budulcowych;

Białka komórkowe ulegają degradacji z różną prędkością:

- białka strukturalne są stabilne;
- białka metaboliczne mają krótki okres półtrwania;
- białka sygnalizacyjne są ekspresjonowane tylko w celu przekazania sygnału;
- białka nieprawidłowe muszą być natychmiast dezaktywowane.



Regulacja degradacji białek

Degradacja białek wymaga działania kilku enzymów w celu całkowitej degradacji białek do ich składowych amino kwasów.

Należą do nich (zlokalizowane nie tylko w układzie pokarmowym ale także w komórkach):

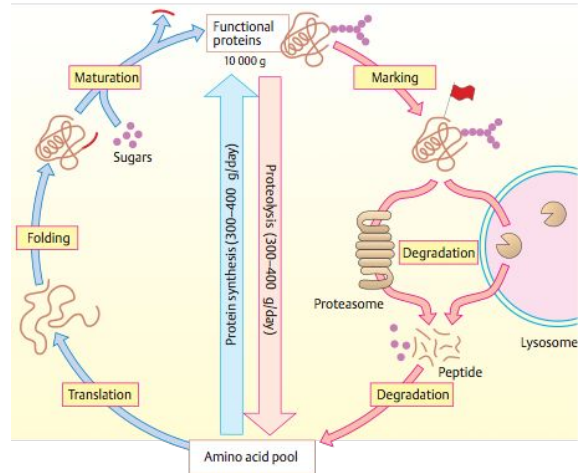
- proteinyazy;
- peptydazy.

Endopeptydazy to enzymy atakujące wiązania peptydowe wewnątrz łańcucha.

Exzopeptydazy atakują wiązania peptydowe na końcu łańcucha.

W zależności od mechanizmu działania wyróżnia się peptydazy:

- serynowe;
- cysteinowe;

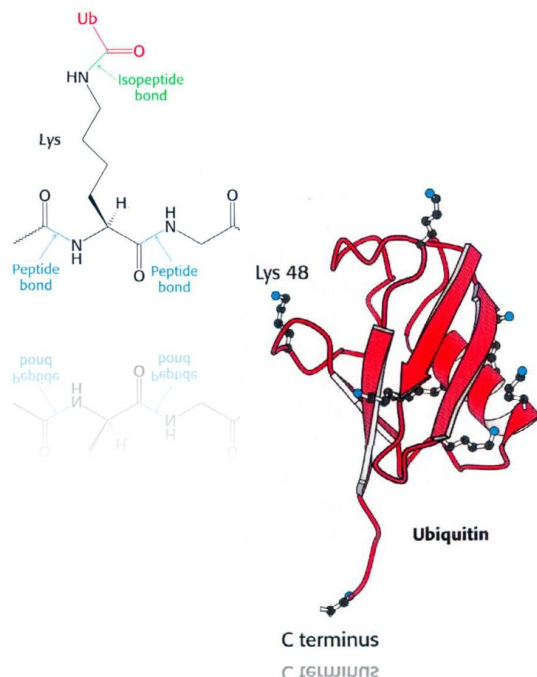


Znakowanie białek do degradacji

Ubikwitynacja:

- to sygnał do degradacji;
- jednocześnie... w zależności od tego w jaki sposób i ile ubikwityn zostanie przyłączonych znaczenie sygnału jest inne;

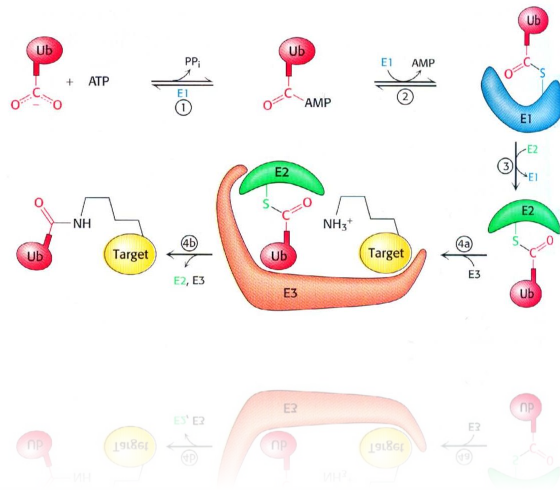
- *Lys48 degradacja*
- *Lys63 naprawa*



Przyłączenie ubikwityny

Ubikwityna to małe białko zawierające 76 aminokwasów;

- › koniec C ubikwityny jest aktywowany przez stworzenie wysokoenergetycznego wiązania tioestrowego z bocznym łańcuchem cysteiny z białka E1;
- › kompleks ten jest przenoszony na cysteinę enzymów E2;
- › E2 występują w wielocząsteczkowych kompleksach z jeszcze większą liczbą enzymów E3;
- › kompleksy E2-E3 rozpoznają sygnał degradacji na białku docelowym a reszta ubikwityny zostaje przeniesiona na białko;
- › przyłączenie do kompleksu kolejnych E1 niosących ubikwitynę powoduje poliubikwitynację;



Okres półtrwania

O okresie półtrwania białek decyduje wiele czynników:

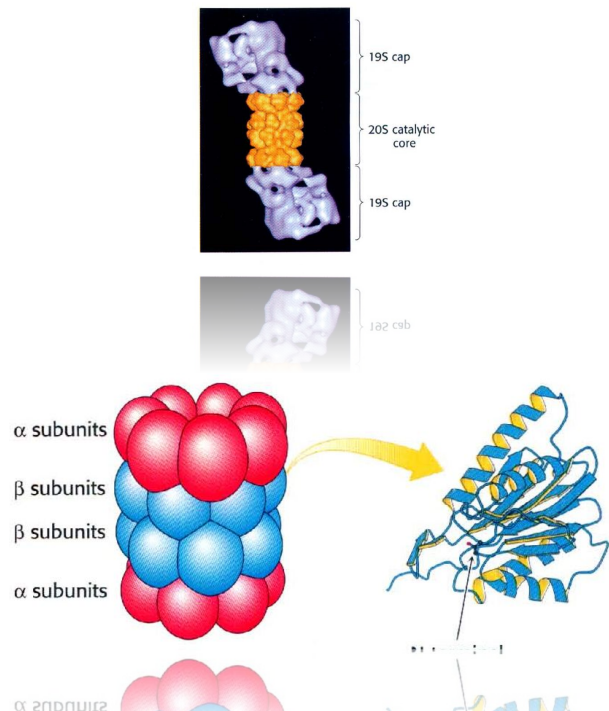
- › funkcja;
- › lokalizacja;
- › sekwencja *N-terminalna*:
 - › reszty destabilizujące to argininy, leucyna (stymulują ubikwitynację);
 - › reszty stabilizujące to metionina, prolina;

Kaseta destrukcyjna PEST (prolina, kw. glutaminowy, seryna, treonina).

Proteasom

Proteasom (Proteasom 26S) to wielopodjednostkowy kompleks o aktywności proteazowej.

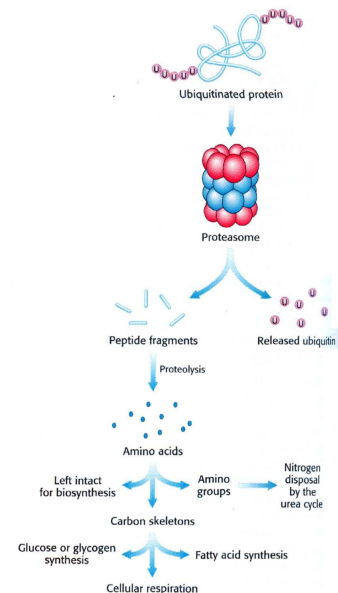
- › Kompleks 20S (700 kDa) składa się z 14 podjednostek ułożonych w pierścieniu.
- › Kompleks 19S (*kompleks regulatorowy*) zbudowany jest z 20 podjednostek zawierających liczne ATPasy należące do klasy AAA (*ang. ATPase associated with various cellular activities*).



Proces degradacji

Ubikwitynowane białka przekształcane są do peptydów.

Znacznik degradacji = ubikwityna, jest w tym procesie usuwany i ponownie wykorzystywany.



Szlak ubikwitynacji

- Występuje u wszystkich organizmów eukariotycznych.
- Organizmy prokariotyczne dysponują homologami proteosomu, jednak ich funkcja nie jest w pełni rozumiana.
- U *Archei* proteasomy zbudowane są identycznych podjednostek.
- Funkcją analogów ubikwityny u prokariotów jest udział w biosyntezie *tiaminy*.
- ThiF jest homologiem E1;
- ThiS aktywowane przez ThiF jest przyłączane do cysteiny.

