

Molekulární mechanismy řídicí expresi proteinů

Aleš Hampl

Proteiny
„Proteios“ - první místo (řecky) = Bílkoviny



- u většiny buněčných typů tvoří nejméně 50% jejich suché hmoty
- hrají klíčovou úlohu ve většině biologických procesů

Klíčová úloha proteinů je dána mnohočetností jejich funkcí

Enzymatická

Proteiny - enzymy, které selektivně moduluji chemické reakce

Strukturální

Strukturální (stavební, podpůrné) proteiny - kolagen, elastin, keratin ...

Signální

Proteiny zprostředkující přenos informací - hormony, cytokiny, receptory...

Motorická

Proteiny zajišťující pohyb - myosin, aktin ...

Transportní

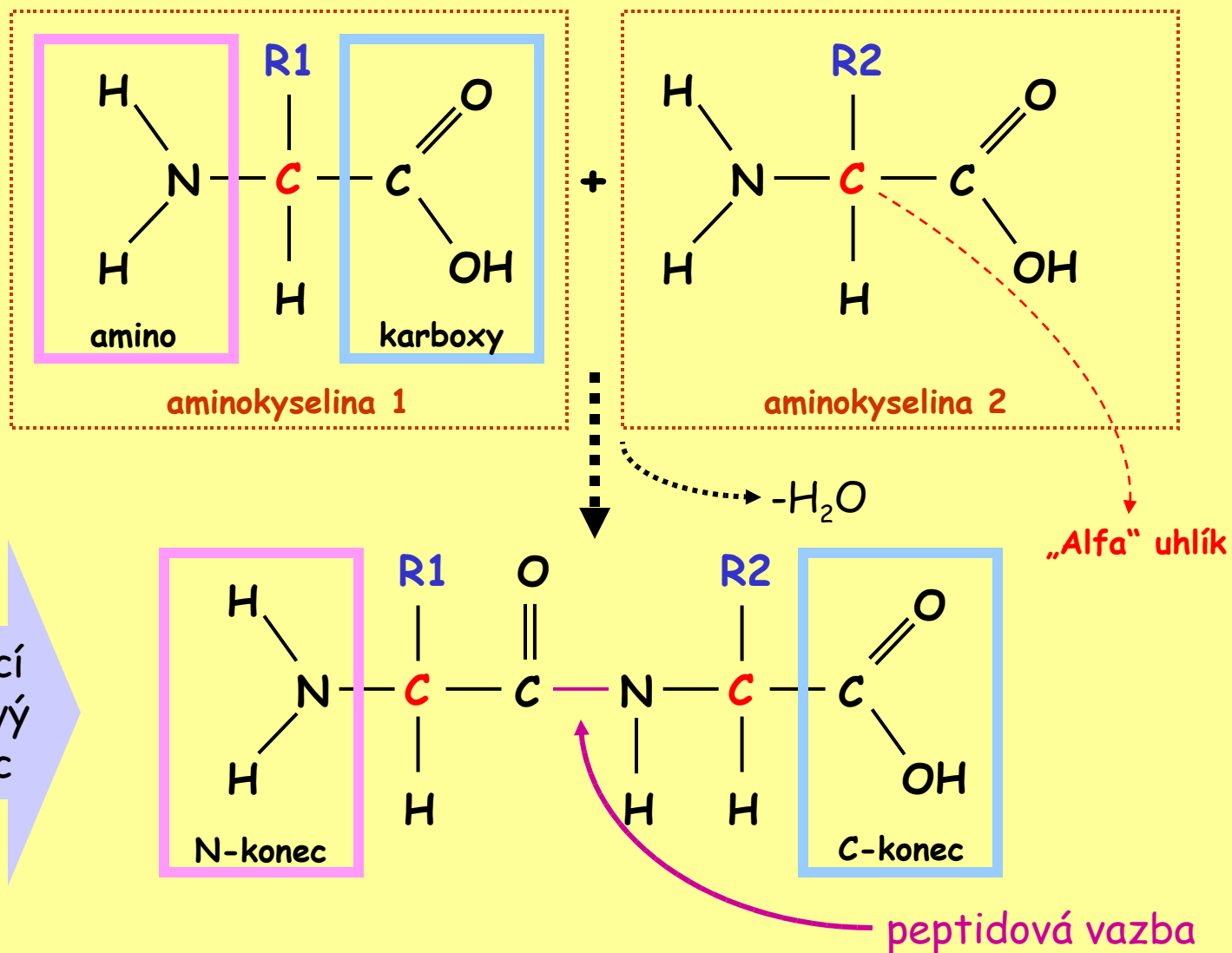
Proteiny přenášející substance - hemoglobin, transferin, ...

Ochranná

Proteiny chránící před nežádoucími substancemi - imunoglobuliny ...



Molekuly proteinů jsou syntetizovány z jednotlivých aminokyselin spojením jejich amino- a karboxy-skupin za vzniku kovalentní peptidové vazby



Mnohočetnost funkcí proteinů stojí na unikátních vlastnostech jednotlivých proteinů

DNA

Sekvence nukleotidů
(4 různé nukleotidy)

PROTEINY

Sekvence aminokyselin
(20 různých aminokyselin)

← **Stejný princip**

Stejně vlastnosti

+

Jediná funkce

Uložení a přenos informace

X

Různé vlastnosti

+

Různé funkce

?

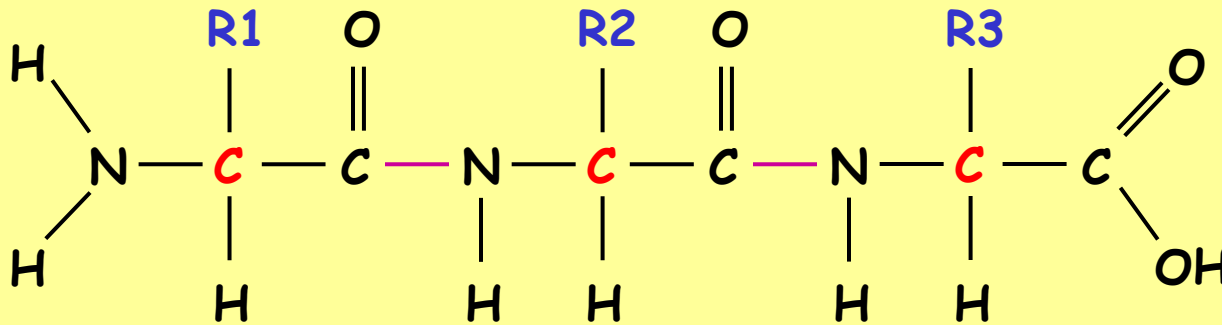
Sekvence nukleotidů
neovlivňuje zásadně
vyšší uspořádání
řetězce DNA

X

Sekvence aminokyselin
má zásadní vliv na
vyšší uspořádání
molekuly proteinu

!

Vyšší uspořádání molekuly proteinu je určeno sekvencí aminokyselin a jejich postranními řetězci (R)



Primární struktura

Představuje lineární sekvenci aminokyselin v polypeptidovém řetězci.

Sekundární struktura

Je podmíněna interakcemi mezi komponentami páteřního řetězce polypeptidu (alfa helix, beta skládaný list).

Terciární struktura

Je podmíněna interakcemi mezi postranními řetězci (vodíkové vazby, disulfidické můstky, iontové vazby, hydrofobní interakce).

Kvarterní struktura

Je podmíněna spojením více polypeptidových podjednotek.

Vyšší uspořádání molekuly proteinu

Denaturace

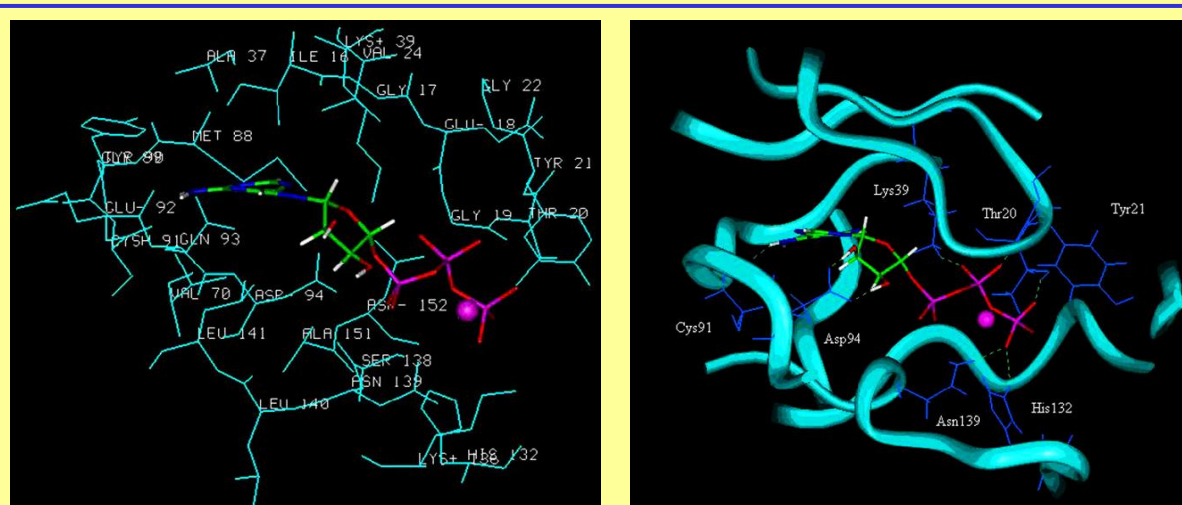
• ztráta vyššího uspořádání molekuly proteinu daná změnou fyzikálních či chemických podmínek prostředí, obvykle doprovázena ztrátou funkce proteinu, může být reverzibilní (např. poškození proteinů při horečce)

K čemu je dobré vyšší uspořádání molekuly proteinu ?

Vyšší uspořádání proteinu spolurozhoduje o jeho funkci.

&

Funkce proteinu je téměř vždy závislá na jeho schopnosti rozeznávat či vázat jiné molekuly.



Molekula CDK10 s vazebným místem pro ATP

DNA určuje expresi/metabolismus proteinů v zásadě dvojím způsobem

Na úrovni transkriptů

Na úrovni proteinů

Translace ANO/NE

Syntéza mRNA daného proteinu

+

Stabilita mRNA daného proteinu

Primární sekvence aminokyselin daného proteinu
(určuje vlastnosti - stabilitu daného proteinu)

Syntéza polypeptidů podle sekvence mRNA se odehrává procesem zvaným „translace“

**Messenger RNA
(mRNA)**

Ribosomy

**Transferová RNA
(tRNA)**

**Molekulární komponenty
klíčové pro translaci**

Ribosomy - obecně

Vytváří prostředí pro rozeznání kodónů mRNA a následnou syntézu polypeptidového řetězce

Obecné složení ribosomů

Proteiny - 1/3

Ribosomální RNA
rRNA - 2/3



Díky obrovskému počtu ribosomů v buňce je rRNA nejhojnějším typem RNA (syntetizována v jadéřících RNA PolI)

Rozdíly mezi ribosomy eukaryot a prokaryot mají medicínský význam

Eukaryota

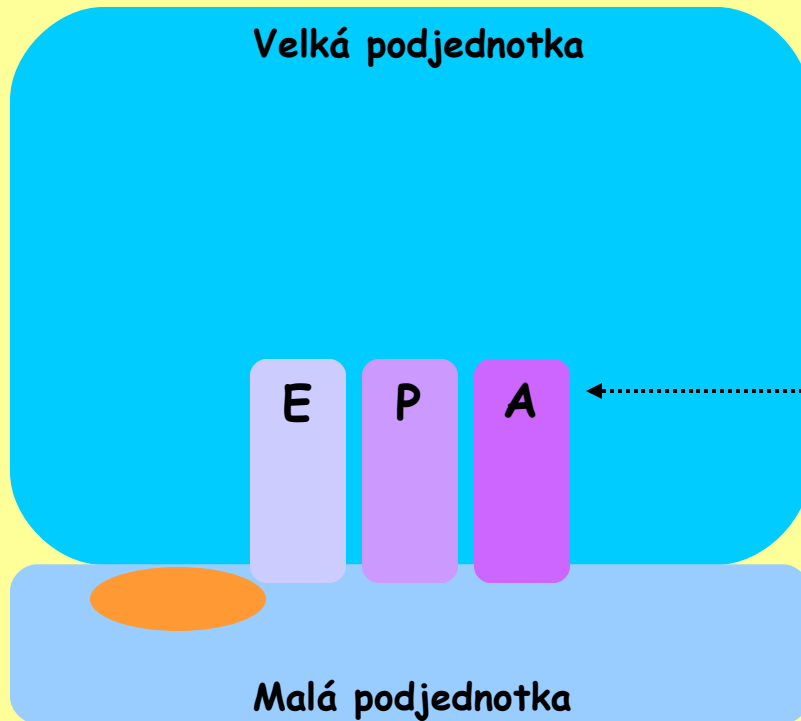
Ribosomy **necitlivé**
k některým
antibiotikům



Prokaryota

Ribosomy **citlivé** k
některým
antibiotikům

Ribosomy - struktura



- A** - vazebné místo pro **A**minoacyl-tRNA
- P** - vazebné místo pro **P**eptidyl-tRNA
- E** - místo výstupu tRNA (**E**xit)

Transferová RNA - tRNA

Zajišťuje:

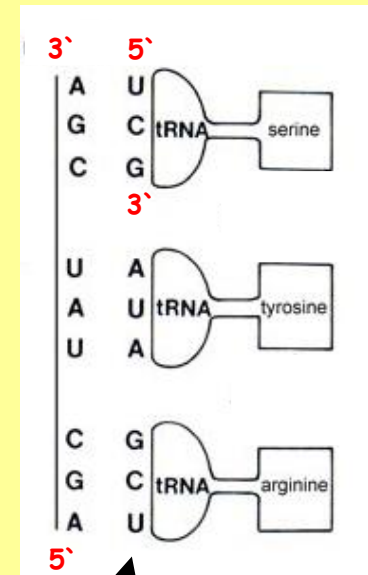
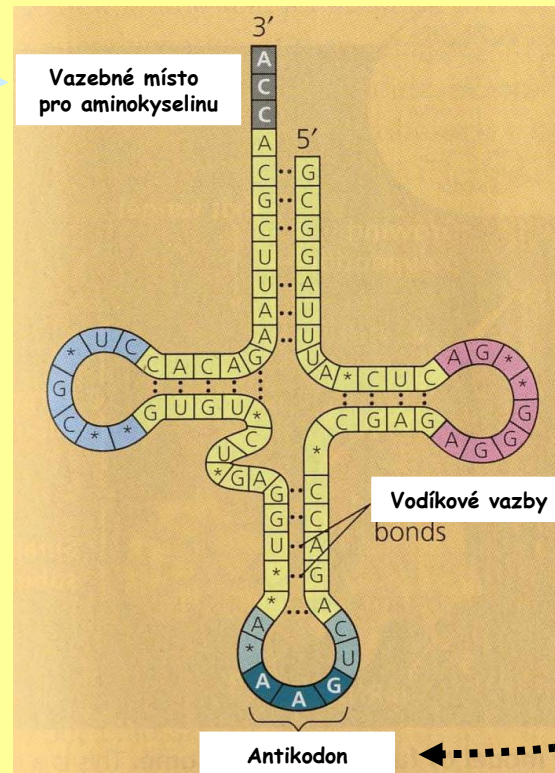
- transport aminokyselin do místa syntézy polypeptidového řetězce
- interpretaci kodónů mRNA

Délka tRNA - jen asi 80 nukleotidů

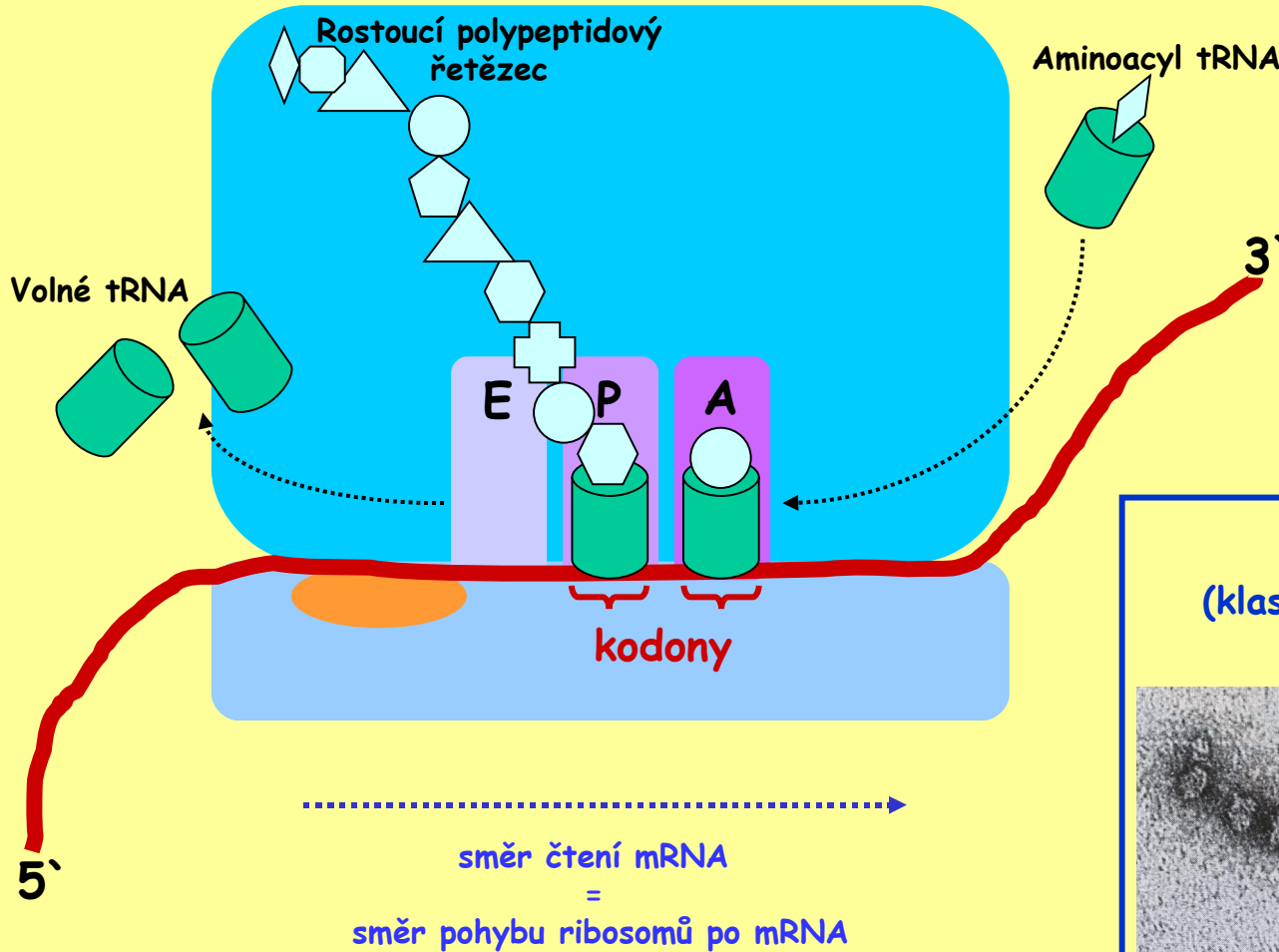
Aminoacyl-tRNA syntetáza

- katalyzuje vznik kovalentní vazby mezi aminokyselinou a jí odpovídající tRNA
- požaduje ATP
- výsledným produktem je **aminoacyl tRNA** (= „aktivovaná aminokyselina“)

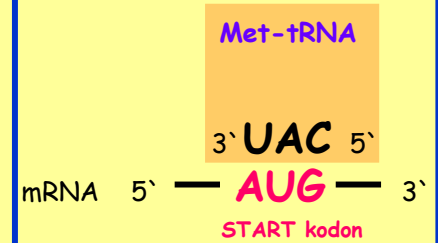
UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys
UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys
UUA } Leu	UCA } Ser	UAA Stop	UGA Stop
UUG } Leu	UCG } Ser	UAG Stop	UGG } Trp
CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg
CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg
CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg
CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg
AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser
AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser
AUA } Ile	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg
AUG } Met or start	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg
GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly
GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly
GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Asp	GGA } Gly
GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Asp	GGG } Gly



Translace



Začátek translace

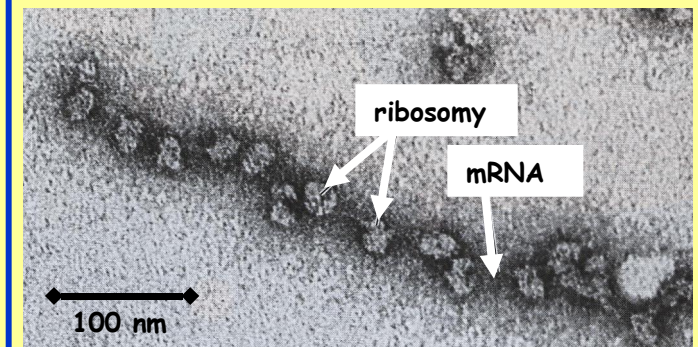


Konec translace



POLYRIBOSOM

(klastř ribosomů překládající určitý úsek mRNA)



Regulace translace

Obvykle se odehrává na úrovni iniciace translace

Blokování mRNA regulačními proteiny

- vazbou na specifické struktury/sekvence v nepřekládané 5' oblasti mRNA, obvykle brání vazbě ribosomů

Nedostatečně dlouhý poly-A konec mRNA

- na 3' nepřekládaném konci mRNA
- mechanismus typický pro dormantní mRNA akumulovanou ve vajíčku

Inaktivace faktorů/ů nutných pro iniciaci translace

- globální inhibice translace
- mechanismus také typický pro vajíčko

Regulace funkce proteinů se odehrává také po jejich syntéze

Posttranslační modifikace proteinu

- proteolytické štěpení pro-proteinu (inaktivní forma) za vzniku aktivního proteinu (např. pro-insulin na insulin)
- přidání modifikujících chemických skupin (fosforylace, glykosylace, acetylace, metylace - a reverze těchto změn)

Transport proteinu do místa jeho funkce

- transport z cytoplasmy do jádra (např. transkripční faktory)
- transport z cytoplasmy na membránu (např. receptory)

Regulace doby života proteinu

- doba života proteinů se pohybuje v širokém rozmezí (minuty až dny)

Regulace doby života proteinů

Délka života proteinů spolurozhoduje o jejich účinkování v buňce

Degradace proteinů musí být proto realizována mechanismem umožňujícím precizní řízení

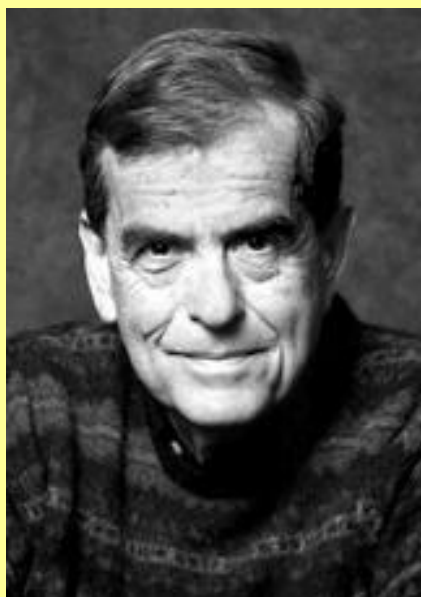
Který to je
?

~~Hydrolytické štěpení
proteinů v lysosomech~~

Degradace proteinů
„ubiquitin-proteasomovou“
cestou

Nobelova cena za chemii 2004

„za objev degradace proteinů mechanismem využívajícím ubiquitin“



Aaron Ciechanover
*1947

Israel

Technion - Israel Institute
of Technology, Haifa



Avram Hershko
*1937

Israel

Technion - Israel Institute
of Technology, Haifa



Irwin Rose
*1926

USA

University of California
Irvine, CA, USA

Degradační cesta „ubiquitin-proteasom“

KLÍČOVÁ FAKTA

Je zodpovědná za degradaci většiny (minimálně 80%) všech druhů proteinů přítomných v buňce

Realizuje se v cytoplasmě i v jádře

Je zodpovědná za:

- regulaci hladiny/funkce mnoha proteinů

(cykliny, transkripční faktory, signální proteiny,...)

- eliminaci denaturovaných, nesprávně syntetizovaných, nesprávně posttranslačně upravených, či jinak poškozených proteinů

(až 30% nově syntetizovaných proteinů je u eukaryot degradováno během několika minut po jejich syntéze)

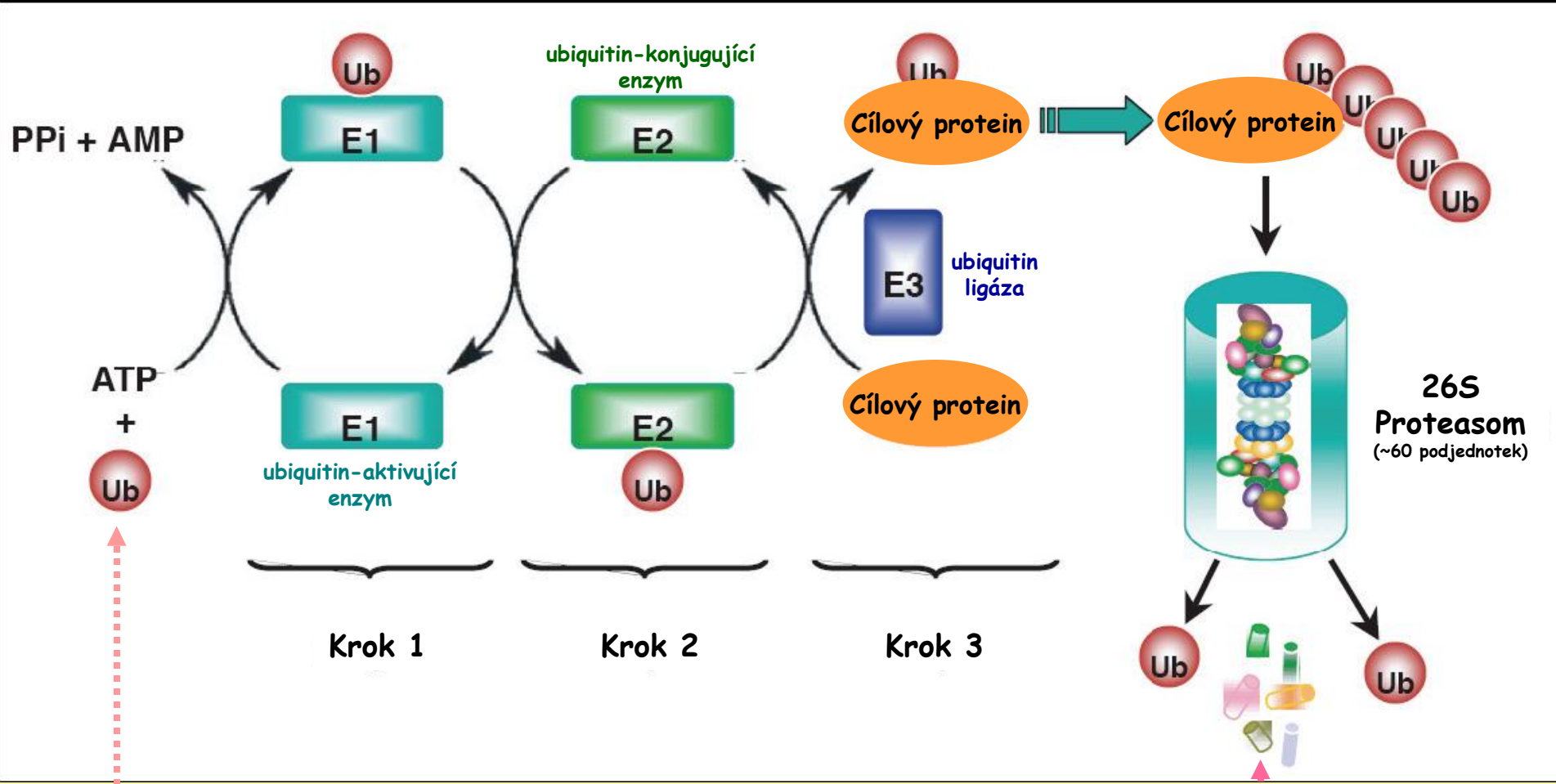
Její klíčoví „hráči“ jsou:

Ubiquitin - evolučně konzervovaný protein, 76 aminokyselin

Proteasom - proteolytický komplex, jehož funkce je závislá na ATP, a který sestává ze tří jednotek:

- jeden centrální 20S proteasom (štěpí proteiny)
- dva 19S komplexy (řídí substrátovou specifitu a hrají regulační úlohu)

Degradace proteinů cestou „ubiquitin-proteasom“



Ubiquitin
(8,5 kDa)

Ubiquitin
k recyklaci

Peptidy

Molekulární aparáty pro translaci a degradaci
proteinů jako zdroje či účastníci abnormalit
člověka

ANO či NE ???



Abnormální funkce ribosomů?

Diamond Blackfan anemie

- vážná hypoplastická anemie
- obvykle se projevuje již v prvním roce života
- doprovázena závažnými vývojovými abnormalitami
- $\frac{1}{4}$ pacientů má mutaci v genu pro protein Rsp19 (komponenta 40S podjednotky ribosomu)
- **Dosud jediné onemocnění, u kterého byla nalezena vazba na mutaci v genu pro nějaký ribosomální protein**

Další onemocnění, která jsou vázaná na faktory zahrnuté v syntéze ribosomů:

- Vrozená dyskeratóza vázaná na X chromozom
- Treacher Collins syndrom
- Shwachman Diamond syndrom

Společným znakem je klinická heterogenita a jakoby tkáňově náhodné efekty.

Je to typický znak onemocnění daných chybnou funkcí ribosomů?

Tato a mnohé další otázky zůstávají k zodpovězení

Abnormální translace jako důvod rakoviny?

Podpůrné nálezy:

Vnímavost k nádorům má vazbu na geny, které kontrolují proteosyntézu (např. TCS1/2, PTEN) a biogenezu ribosomů (např. DKC1, S19)

Experimenty na zvířatech ukázaly, že deregulovaná exprese regulátorů translace má onkogenní efekty (například myši s mutovaným genem Dkc-1 mají tendenci ke vzniku nádorů)

Některá efektivní protinádorová léčiva jsou cílena na klíčové regulátory proteosyntézy (například Rapamycin ovlivňuje mTOR kinázu)

Možné mechanismy:



Abnormality v intracelulární degradaci proteinů jako důvod neurodegenerativních onemocnění?

Proteinopatie



Neurodegenerativní onemocnění s pozdním nástupem, která jsou typická akumulací agregátů toxických proteinů

Příklady onemocnění:

Cytosolická akumulace

- Parkinsonova choroba
- Huntingtonova choroba s nástupem v dospělosti

Nukleární akumulace

- Spinocerebelární ataxie typu 1

Extracelulární akumulace

- Alzheimerova choroba (beta amyloid)

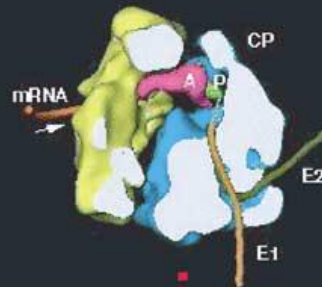
Příklady dysfunkcí:

Hladiny a aktivity 20/26S proteasomů jsou sníženy v citlivých oblastech u pacientů se sporadickou Parkinsonovou chorobou

Autosomálně recesivní mutace genu E3 ligázy (parkin), způsobující ztrátu funkce, vyvolává Parkinsonovu chorobu.

Děkuji za pozornost

**Otázky a komentáře na:
ahampl@med.muni.cz**



-Global Impairment in mRNA Translation (cell size deregulation)

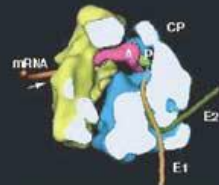
-Impairment in Translation of Selected "Oncogenic" Target mRNA

-Mistranslation

Tumorigenesis

a

Aberrant Signaling
(e.g. mTOR)

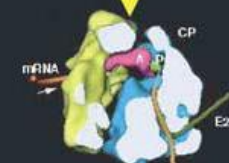
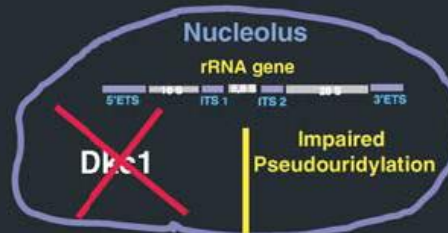


Normal Ribosome



Tumorigenesis

b



Altered Ribosome
Biogenesis/Function



Tumorigenesis