

PROTEIN PROCESSING (1)

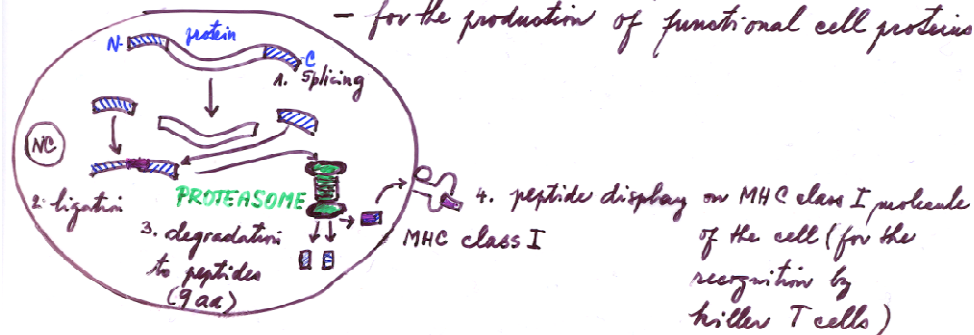
CO- and POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF PROTEINS

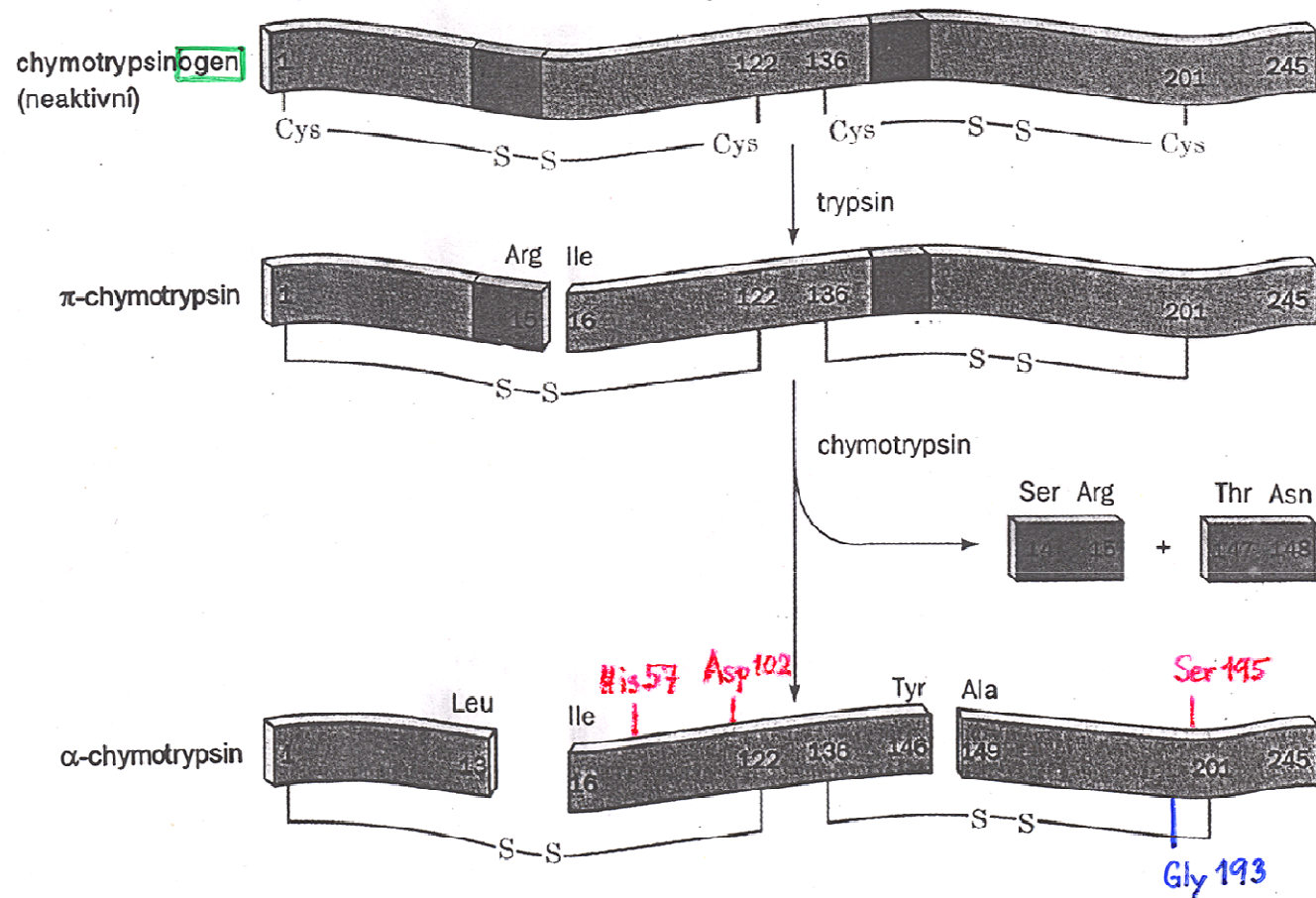
I. CHANGE IN THE AMINO ACID SEQUENCE

II. NO CHANGE IN THE AMINO ACID SEQUENCE

Ad I.

- i) Removal of N-terminal amino acid (fMet, Met)
- ii) Removal of signal peptide (the "pre"-sequence)
- iii) "Protein surgery"
 - a) limited proteolysis by endopeptidases
 - conversion of proenzymes (zymogens) to enzymes
 - conversion of prohormones to hormones (thyroxine)
 - b) protein self splicing via intrinsins (catalytic domains with ≥ 134 aa) + ligation of extrins:
 - in single-celled organisms
 - protein splicing-ligation mediated by enzymes:
 - in humans - for immunity control: (detection of foreign proteins)
against tumor proteins
viral proteins
 - for the production of functional cell proteins ??

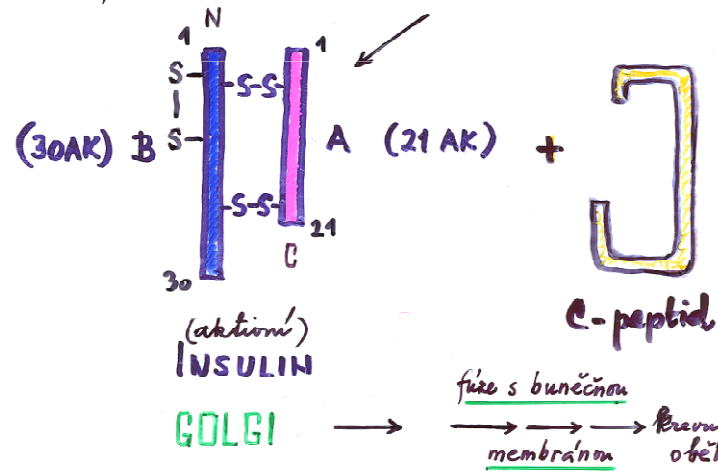
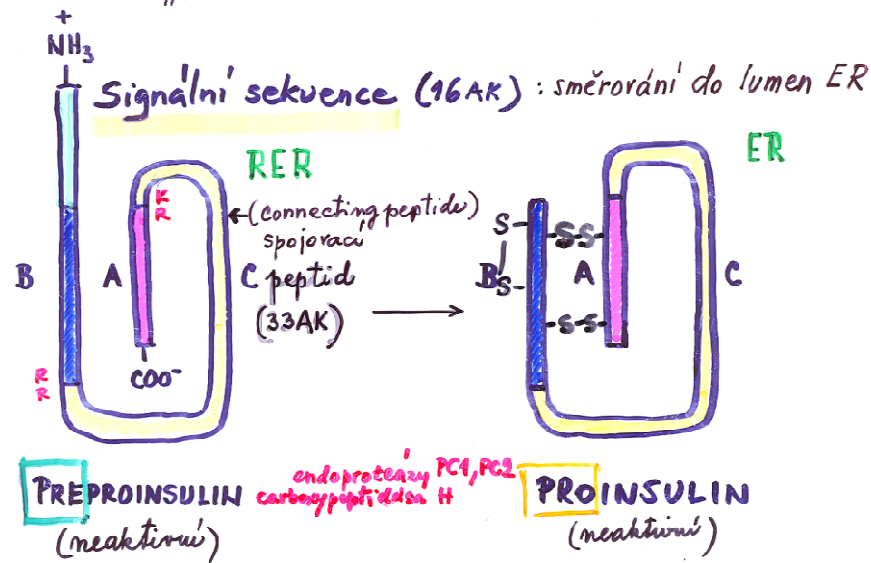




Obr. 14-26

Aktivace chymotrypsinogenu proteolytickým štěpením. Jak π -, tak α -chymotrypsin jsou enzymově aktivní.

"ŽRÁNÍ" INSULINU - INSULIN "MATURATION"



INSULIN :

- 1) Syntéza "dvořetězcové" molekuly prekursoru
- 2) Směrování
- 3) Žrání

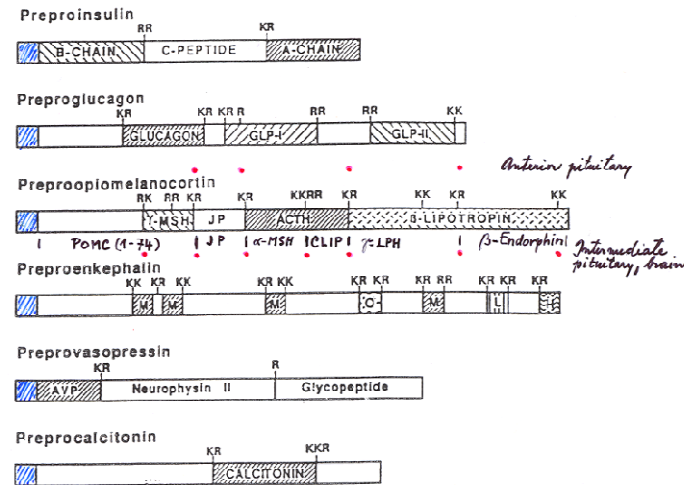
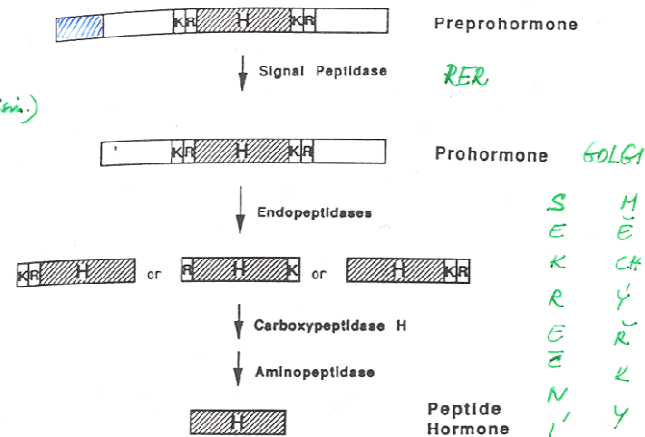


Figure 1. Prehormone structures. The precursor structures for several peptide hormones are schematically illustrated. All prehormones contain a NH₂-terminal signal sequence. Peptide hormone domains within the precursors are indicated as shaded areas. Abbreviations are: GLP, glucagon-like peptide; MSH, melanocyte-stimulating hormone; JP, joining peptide; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; M, (Met)-enkephalin; O, (Met)-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸; L, (Leu)-enkephalin; H, (Met)-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷; AVP, arginine-vasopressin. K and R represent single letter codes for Lys, Arg.

KONVERTAZY:

- 1) PC1/3, PC2 (subtilisin)
- 2) aspartylprotease
- 3) cysteine
- 4) metalloprotease
- 5) serine



PROTEIN PROCESSING (2)

CO- and POST-TRANSLATIONAL

Ad II NO CHANGE in the amino acid sequence:

- i) Formation of S-S bridges
 - Thioredoxins
 - Glutaredoxins
 - PDI (protein-disulfide isomerases)
- ii) Cis/Trans isomerization of proline residues
 - Cyclophilins, Trigger f.
 - FK506, Cyclosporins

iii) FOLDING OF PROTEINS INTO STABLE
THREE-DIMENSIONAL STRUCTURES

+

POSTTRANSLATIONAL QUALITY CONTROL

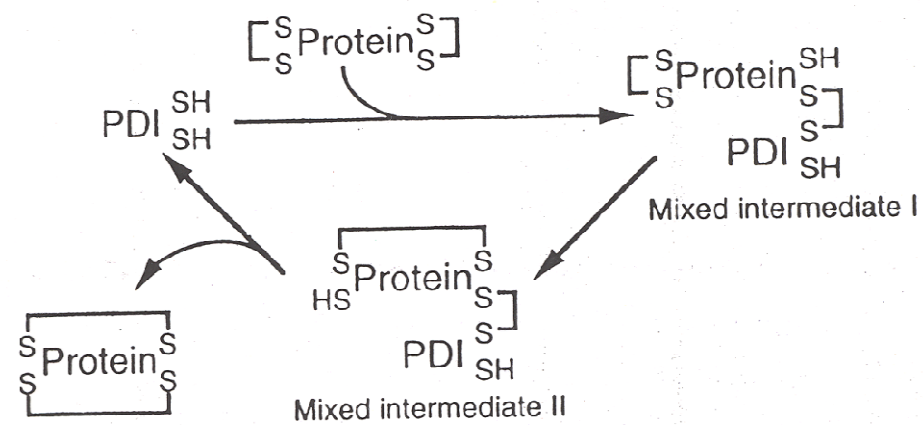
CHAPERONES

PROTEASES

iv) Assembly of protein complexes from subunits

CHEMICAL

v) MODIFICATION OF AMINO ACID RESIDUES

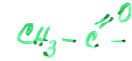


SCHEME 1. **PDI-catalyzed disulfide isomerization.**

POTRANSLAČNÍ MODIFIKACE AMINOKYSELIN

(1)

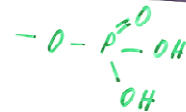
ACETYLACE



a) N-koncová : 80% bílk. - irreversibilní

b) uvnitř řetězce : ^{H2A, H2B, H3, H4} histony, ε-NH₂-Lys - N-konec
= **ŘÍZENÍ TRANSKRIPČNÍ AKTIVITY CHROMATINU (↑)**
reversibilní

FOSFORYLACE



1. Ser, Thr, Tyr

protein-kinázy

3. His, Arg, Lys

= **JEDEN Z NEJČASTĚJŠÍCH ŽPŮSOBŮ ŘÍZENÍ AKTIVITY BÍLKOVIN (↑ & ↓)**

Asp, Glu

Řízení buněčných pochodů :

→ buněčný cyklus (p34^{cdc2} = MPF)

→ proteosyntéza (eIF2, EF-2, S6)
inhibitory → PK (RAM) dle učebnice

→ oprava DNA po ion. záření, UV záření :

(p53: ↑ hladina, fosforylace

na několika místech, několik protein-kináz ;

→ aktivuje expresi genů pro opravu DNA, zastavu v přechodu G1-S ; spouští apoptózu atd

EF-2 : Thr na N-konci →

→ Thr-P : zastava proteosyntézy

FOSFORYLACE EF-2 :

nejvíce a nejrychleji fosforyl.

složka v buněč. exaktní sávi

↑ fosforylace EF-2 spolu se cytopl. Ca²⁺

⇒ mitogeny

⇒ mitosa

→ růst, diferenciace

→ kaskády

MODIFIKACE ZBYTKY KYSELINY SÍROVÉ



HO-Tyr

: fibrinogen (náboj udržuje v roztoku)
↓
trombin

fibrin + fibrinopeptidy - O-SO₃⁻

ACETYLACE HISTONŮ

HISTONY H2A
H2B
H3
H4

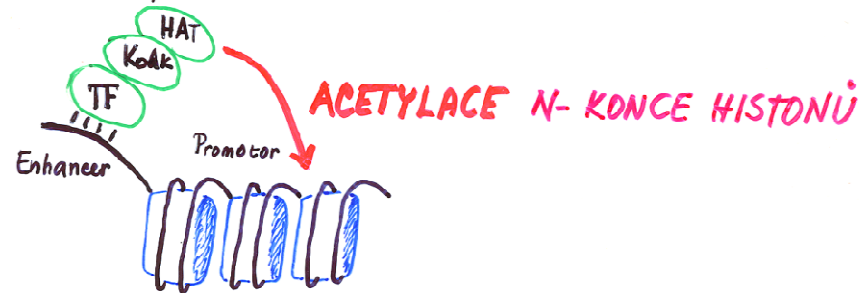
$\epsilon\text{-NH}_2$ kosoř. lysinu na N-konci
(např. H4 : Lys 5, 8, 12, 16 ; jen
některé mohou být acetylovány)

ACETYLACE JE REVERSIBILNÍ :

- 1) HISTON ACETYLTRANSFERÁZY (HAT)
- 2) DEACETYLÁZY (RPD3)

- VÝZNAM : 1) ZVÝŠUJE SE TRANSKRIPČNÍ AKTIVITA
CHROMATINU = DEKONDENSACE CHR.
+ zlepši se přístup složek transkripčního
systému (např. TF IID)
- 2) ZABEZPEČUJE ULOŽENÍ HISTONŮ BĚHEM
REPLIKACE DNA (spec. HAT)

JAK NAJÍT MÍSTO ACETYLACE NA DNA ?



TF : Jun, Fos, CREB, E1A, NF- κ B etc.
Koaktivátor : CBP/p300 ; GCN5 =
HAT : HAT A, P/CAP } = kvasinový

MUTACE GCN5 : porucha v genové expresi mnoha genů

RPD3 : porucha represe transkripce

VĚTŠINA PROTIZÁNĚTLIVÝCH ÚČINKŮ **STEROIDŮ**
SE VYSVĚTLUJE INHIBICÍ TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ
(AP-1.... activator protein; NF- κ B.... nuclear factor κ B;
NF-AT.... nuclear factor of activated T cells), KTERÉ
ŘÍDÍ EXPRESI „ZÁNĚTLIVÝCH“ GENŮ (tj. pro zánětlivé
cytokiny, receptory, enzymy, adhezní molekuly atd.)
TENTO EFEKT JE ALESPŇ ZČÁSTI ZPROSTŘEDKO-
VÁN **INHIBICÍ ACETYLACE HISTONŮ.**

METYLACE BÍLKOVIN XX

METYLACE DNA:



umlcování genové exprese

imprinting

ochrana před endonukle-
-ázami

- CH₃ skupina je-li na cytosinu vyúsťvá do velkého
zářezu dvoušroubovice DNA a tím stericky vadí ostatě
bílkovin, které aktivují, stimulují transkripci (např. TF)
= POTLAČENÍ TRANSKRIPCE
- asi 70% schvenců -CpG- v savčím genomu je takto metylováno
(u Drosophily metylace nevstává vůbec!)
- většina genů se nachází v tzv. CpG ostrovech (bez metylace)
aby mohly být (tj. geny) regulovány
- deaminace 5-CH₃C vede k T: CpG $\rightarrow$ TpG (mutace!)

METYLACE-CH₃-CH₃-CH₃-CH₃-CH₃-CH₃

a) N-koncoví : Met, Ala, Phe

b) uvnitř řetězce : Arg, Glu, Asp, Lys

c) C-koncoví : Cys (Rau)

(E) u 6-N-trimethyl-Lys se vytváří KARNITIN (β -hydroxy- γ -trimethylamonium butyrát: $(CH_3)_3N^+-CH_2-CH(OH)-CH_2-COO^-$)
 = slouží pro přenos dlouhých mastných kyselin (LFA) do mt
 biosyntéza

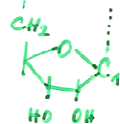
(nedostatek;
rizik. faktor AUTISM)HYDROXYLACE

-OH

Pro (kolagen), Lys; prolylhydroxylasy
 (Asp, Asn) (vitamin C)

ADP-RIBOSYLACE

ribose - (P-O-P-O)
 A



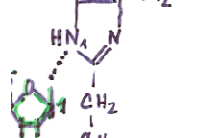
Glu (p-COOH)

Lys (COOH na C-konci)

poly ADP-ribosylace : reversibilní

(změna struktury chromatinu)
 ADP-ribosylace jaderných bílkovin při
 diferenciaci, proliferaci, transformaci

difamid



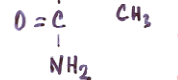
Difterický toxin (fragment A)

Exotoxin A (P. aer.)

(jádrový extrakt)

EF-2
difamid-715 :

(His-715 - aktivita EF-2 !)



Cholery toxin :

Enterotoxin E. coli

↓
 G proteiny

1. G_{sα} : Arg 201 $GTP \xrightarrow{\text{trán. přeměna}} GDP$
2. G_{tα} : GTP Arg 174 $\downarrow$ GTPázové aktivity

Ad 1. aktivace cyklázy, $\uparrow$ cAMP

Ad 2. aktivace fosfodiesterázy
 $\downarrow$ cGMP $\uparrow$ cAMP (zavírání Na⁺ kanálů)

ADP-ribosylace (pokrač.)

(3)

Toxin *bacilu pertussis*

G proteiny

zrušení afinity
α-βγ

Gαi
Gαo
Gαt

Gαi : Cys na 4. pozici od
G-konce

zabránějí Gαi-GTP
interakce s receptorem

(vyřazení tlumivých signálů
působících na efektor
např. adenylat cykláza ⇒
⇒ nadprodukce cAMP)

Botulinový toxin C3

C2

Rho(Asn41) aktinová mikrofilamenta
- poruchy cytoskeletu
aktin nestaví - zabrání polymerace

poly(ADP-ribosyl)ace : poly[ADP-ribose] polymerase (PARP):
→ 200 jednotek
- v jádře

signálizace poškození (zlomu) v DNA
řezání nepříčiny
- k hromadění

AMIDACE

- NH₂

C- koncová aminokyselina : Gly, Pro, Leu

TRANSAMIDACE : (příčné uhlíkové) (neurohormony : vasopresin, oxytocin)
Fibrin - Gln - C(=O)-NH₂ + H₂N-CH₂-Lys - Fibrin "mřížka"
Fibrin - C(=O)-NH-CH₂-Fibrin "mřížka"

KARBOXYLACE

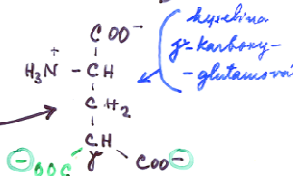
- COOH

System s

Vit. K

Glu → Gla

γ-karboxylace



prothrombin $\xrightarrow{\text{Ca}^{++}}$ thrombin
(N-konec : 10 Glu → 10 Gla) = chelatace Ca⁺⁺ → zátvření
(na fosfolipidové membráně) Krevních destiček → aktivace

GLYKOSYLACE

(Man, GlcNAc, GalNAc, Fuc, K. sialoná, Gal, Glc)

N-glykosylace : Asn (bloková 2 dolichol
molekuly)
O-glykosylace : Thr, Ser (postupně)

GLYKOSYLACE: směrovací signál



Polypeptidy → glykoproteiny
sekreční bílkoviny (Ig)
membrán. receptory
mimo buněčné prostory
MENÍ SE : Rozpuštěnost, orientovanost v
→ antigenitě, membráně, průchod, Kinetika odbourávání

PROTEIN GLYCOSYLATION

ER, GOLGI

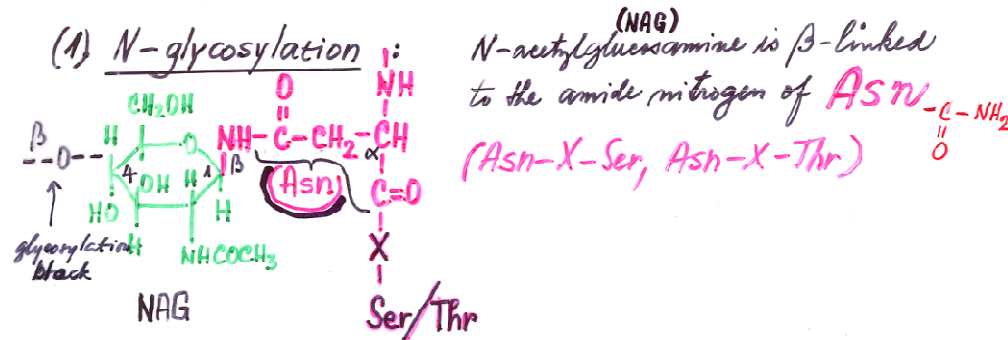
GlcNAc, Man, Gal, GalNAc, Sialic ac., Glu, Fucose

→ Sorting and distribution of proteins to their proper cellular destination.
Almost all the secreted and membrane-associated proteins of eukaryotic cells are glycosylated

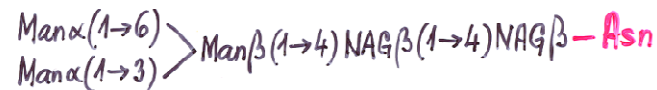
The most abundant protein modification - enormously diverse!

Oligosaccharides tend to extend from the surfaces of proteins rather than participate in their internal surfaces

However, no generalization about the effects of glycosylation on protein properties can be done



Glycosylation core



MOST EUKARYOTIC PROTEINS ARE GLYKOPROTEINS

Carbohydrate content 1-90% (by weight) in different glykoprot.

Glykoproteins have variable carbohydrate composition →

→ microheterogeneity of glykoproteins

↑
(applies for the same protein molec.)
Processing enzymes are usually not available in sufficient amounts to ensure production of uniform products.

N-glycosylation occurs co-translationally with
a block of 14 monosaccharide units and at one step.

In the lumen of ER. From a lipid-linked precursors.

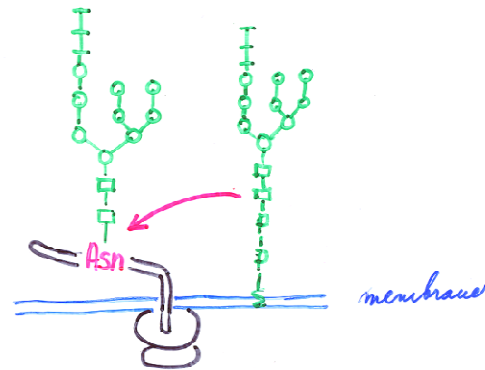
The block of 14 monosaccharide units is constructed on

DOLICHOL - PYROPHOSPHATE CARRIERS

(polymer of 14-24 isoprene units : $\text{CH}_2 - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} = \text{CH} - \text{CH}_2 \bigg|_n \text{P-P}$

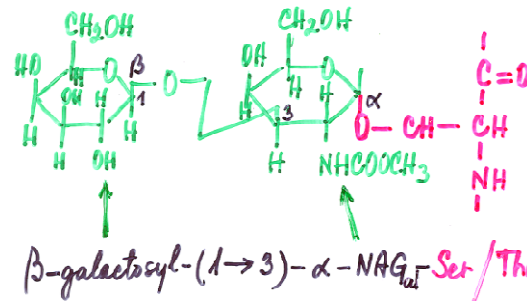
- CARBOHYDRATE
BLOCK

- 14 units -



The processing is completed in the trans-Golgi apparatus

- (2) O-glycosylation : • disaccharide core β -galactosyl-(1-3)-
 - α -N-acetylgalactosamine α -linked
 to the OH group of **Ser or Thr**
- α -mannosyl - **Ser / Thr**
 - galactosyl - **5OH Lys** (collagen)



collagen :
 (1 galactose)

1-1000 disaccharide units
 proteoglycans (1000 disacch units)

O-linked glycosylation takes place posttranslationally
 in the Golgi: by serial addition of monosaccharide units
 to a completed polypeptide chain

One protein can be both N- and O-glycosylated
on several sites

Oligosaccharides on glycoproteins serve as:

A) recognition markers for sorting glycoproteins synthesized in ER and processed in Golgi apparatus for

(1) secretion

(2) insertion into cell membranes

(3) incorporation into lysosomes (Man-6P)

B) antigenic determinants

Erythrocyte surface:

→ Sphingoglycolipids → body fluids:

ABO blood groups: O-linked glycoproteins

A: GalNAc; B: Gal; O (H antigen): H - at their nonreducing ends

C) mediators of cell-cell recognition = intercell. interaction

O-linked oligosaccharide on a glycoprotein of zona pellucida of mouse ovum acts as the sperm acceptor

Gal-Gal groups on the surfaces of urinary tract epithelial cells bind E. coli (via adhesins)

D) anchors of proteins to bind them (via their C-end) to the external surface of plasma membrane + proteoreceptors

GPI-linked proteins

(Glycosylphosphatidylinositol)

E) protective cover of cells (eukaryotic):

mucins: O-linked glycoproteins ($\approx 10^7$ D)

glyco calyx: glycoproteins + glycolipids

F) components of plasma membranes - mostly external surface

G) modifiers of protein properties (yes or no)

stability, folding, life-time

oligomerization

protease resistance

Noncancerous and cancerous cells differ in cell-surface carbohydrate distribution (contact inhibition)

Potranslační modifikace (pokrač.)

(4)

UBIQUITINYLACE (Ub)

Ubiquitin - Gly₄₆-C(=O)-OH
(bílkovina M_r ~ 8500)
(1975)

PHYLOGENETICKY NEJVIČE
KONZERVOVANÁ BÍLKOVINA:

za 1.1 miliarda let jen
1 mutace v Ub
má kvasinok a člověka

isopeptidická vazba
vnitřní
Lys (E-NH₂), jiné AK?; N-tero. AK
(M₂₀D)

Ubiquitin-protein ligázy (E3) vyžadují
soli a jiné bílkoviny

vyžaduje ATP !!
(thermodynamický paradox)

degradace poly Ub - bílkoviny

v 26S **PROTEASOME** →

→ na peptidy (proteinů vyžadují
ATP !!)

a) DENATUROVANÉ
BÍLKOVINY (exponováno →
hydrofobní řetězy)

b) BÍLKOVINY S KRATKÝM
POLOČASEM:

(Phe, Ileu)
mají velké hydrofobní nebo basicí AK (Lys, Arg)
na N-teru = N-koncové pravidlo; sekven. PEST
ale také Asp!

PROBÍHÁ V CYTOSOLU
I V JÁDRĚ

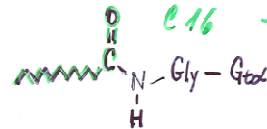
MODIFIKACE LIPIDICKÝMI ZBYTKY - uchycení do membrán

a) Zbytky nasycených mastných kyselin (acylace)

C12 - laurylylace : N-kono. Gly2 Gtd

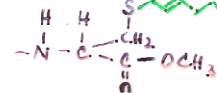
C14 - myristylace : N-kono. Gly2 (Src, Gax, Gid, Gtd)

C16 - palmitylace : Cys-3 (Src, Go, i, 2, 2)
(reversibilní) : Cys na C-konci nejbližší K-CAAX
(ras)



b) Zbytky polyisoprenového charakteru (iso-prenylace)

C15 - farnesylace : C-kono. cystein v -CAAX (=Ser, Ala
Met)

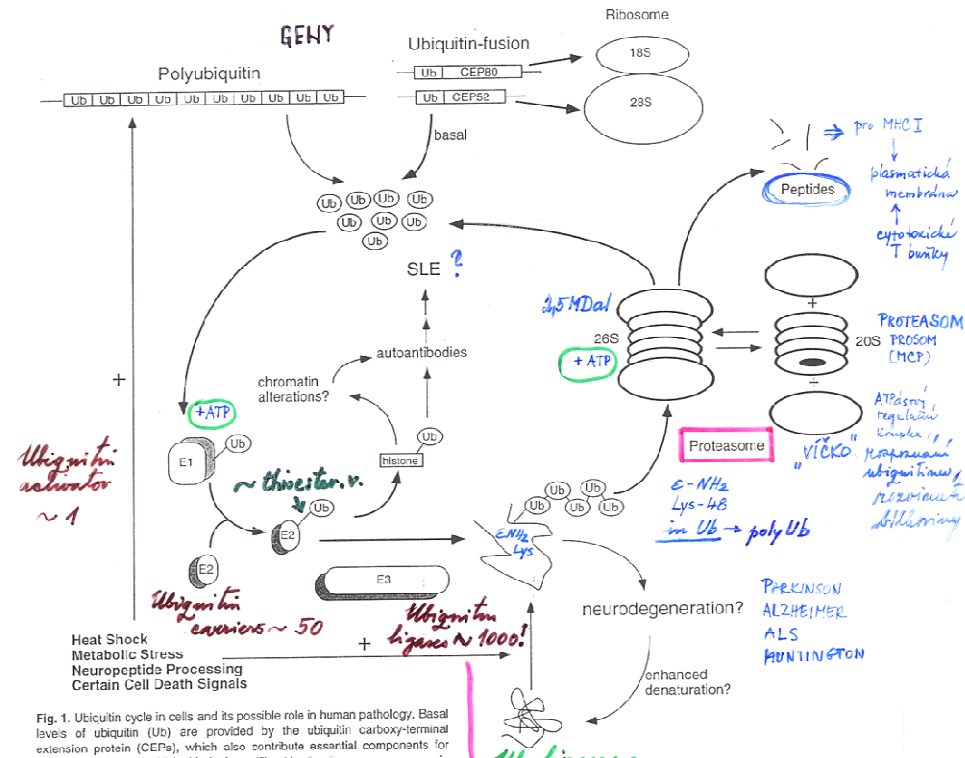


FARNESYL-PROTEIN
TRANSFERÁZY
(F.P.T.)

p21ras → transformační akt.
Gx

DEGRADACE BÍLKOVIN V PROTEASOMECH

Review articles



Ub ligases: major drug platform
 Genes coding for proteins participating in Ub-mediated machinery occupy 4% of the human genome!

Nobel Prize for Chemistry 2004:

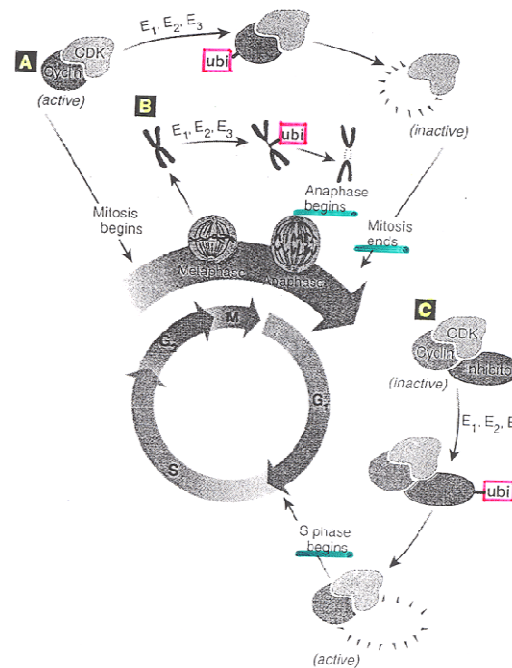
for **ROSE CIECHANOVER** (Israel)
AVRAM HERSHKO

.....for research in the early 1980s that discovered "the Kiss of death."

How the cell controls:

- cell cycle
- DNA repair
- gene transcription
- quality of newly-produced proteins

PROTEIN DEGRADATION INDUCED BY UBIQUITINATION
IS REQUIRED FOR CELL-CYCLE PROGRESSION



Ubiquitin^(ubi) orders the destruction of proteins ranging from CYCLIN (A), to a putative CHROMOSOME TETHER PROTEIN (B), to a KINASE INHIBITOR (C),

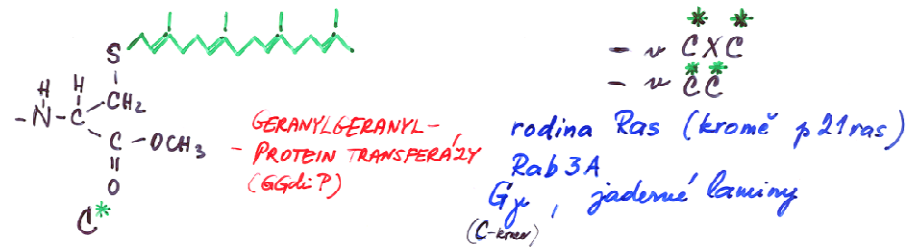
all in the interest of moving the cell cycle forward.

"Cell cycle control revolves around changes in proteolysis"

Positive control in biology frequently represented by INACTIVATION OF NEGATIVE REGULATORS

(5)

a dafin)



Gtd

: N-term. Gly

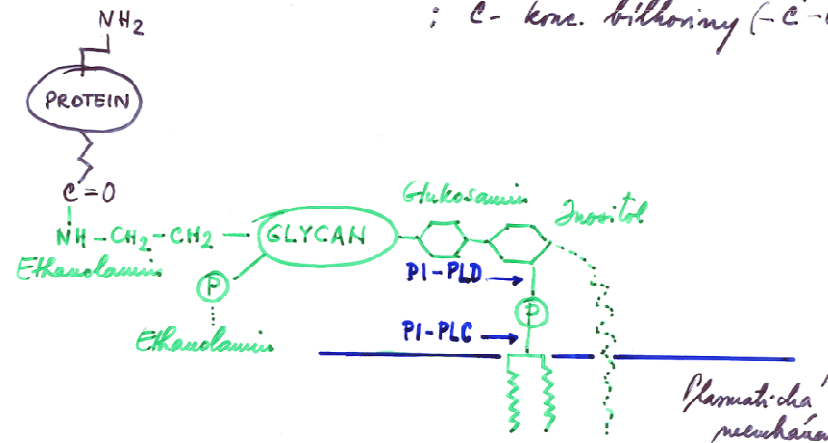
Sociace G_t

realizace

- rain

(GPI)

0



20

h.

