

**ТОПОГЕНЕЗ БЕЛКОВ
СЕКРЕЦИЯ БЕЛКОВ**

СПЕЦГЛАВЫ БИОХИМИИ. Лекция 7

План

- 1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР**
- 2. Везикулярный транспорт**

Проблема сортировки и транспорта белков

Основными посредниками клетки во взаимодействии с окружающей средой являются секреторные и трансмембранные белки.

Секреторные белки выходят в окружающую среду.

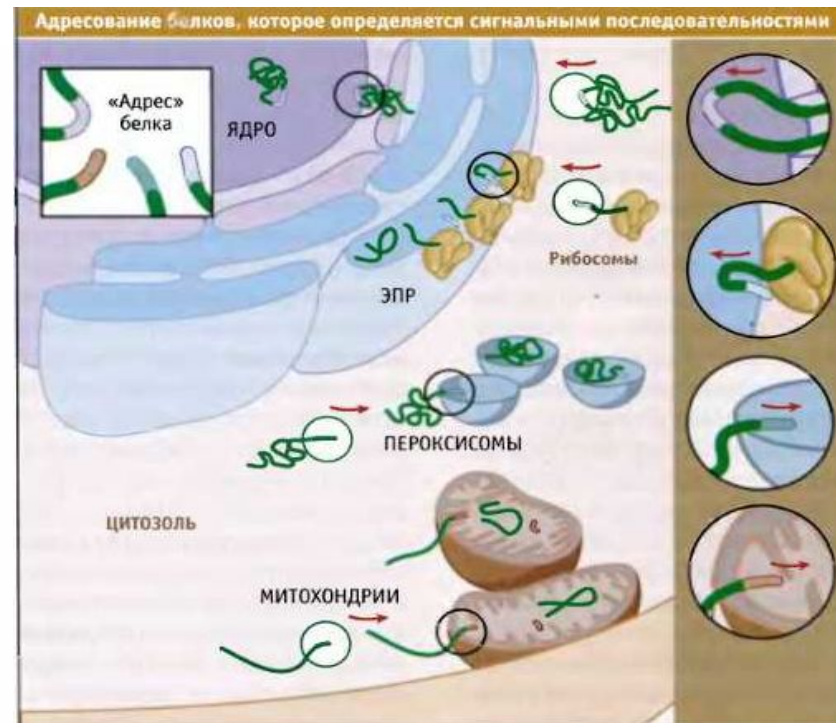
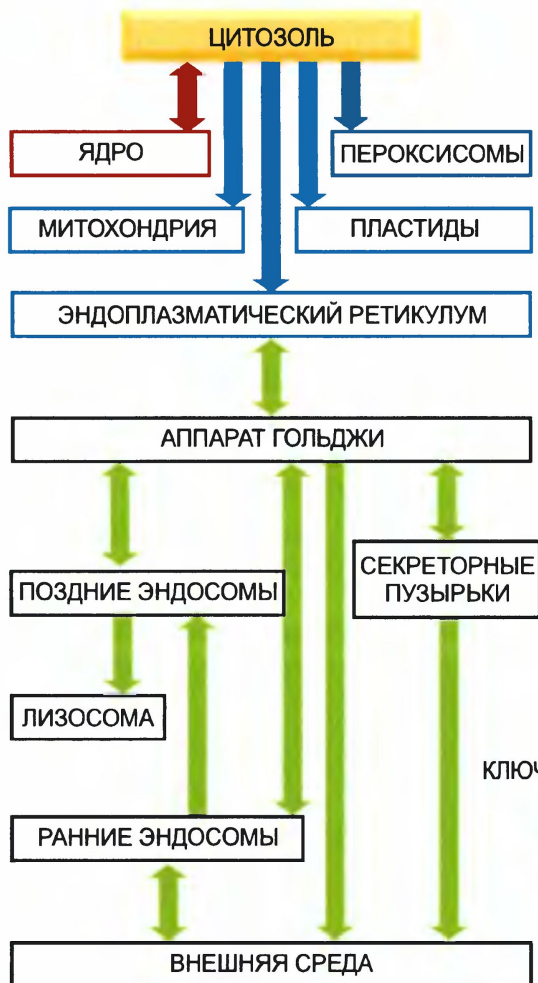
Трансмембранные белки остаются в плазматической мембране. Одна их часть контактирует с внешней средой, другая – с содержимым цитоплазмы.

Клетки эукариот содержат органеллы, окруженные мембранами: ядро, митохондрии, хлоропласты (у растений, пероксисомы, ЭПР, аппарат Гольджи, лизосомы).

Должен существовать **механизм селективного отбора и транспорта белков** к месту их локализации в клетке.



3 механизма транспорта белков

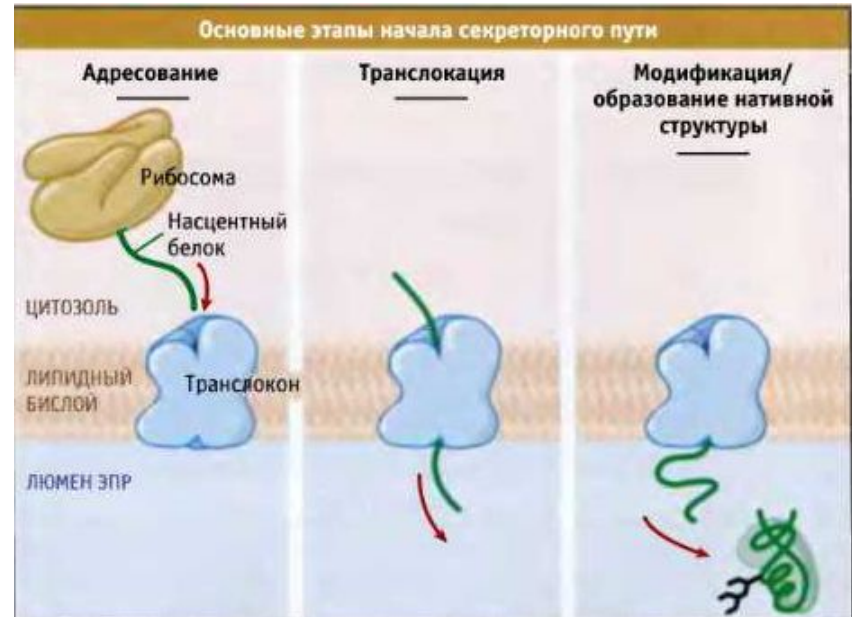


Сигналы таргетинга в различные органеллы

Сигналы таргетинга, соответствующие различным органеллам		
ОРГАНЕЛЛА	СИГНАЛ	СИГНАЛ
ЭПР	MDPPRPALLALPALLLLLLLAGARA...	N-терминальный участок
Ядро	...LAEADRKRRGEFRKE...	Внутри молекулы
Митохондрия	MLSNLRILLNKAALRKAHTSMVRNFRYGKPVQ...	N-терминальный участок
Хлоропласт	MRTRAGAFFGKQRSTSPSGSSTSASRQWLRSSPGRTQRPAAHVLA...	N-терминальный участок
Пероксисома PTS1	...VVVGGGTPSRL	C-терминальный участок
Пероксисома PTS2	MNLTRAGARLQVLLGHLGRP...	N-терминальный участок
<p>Гидрофобные Кислые Основные</p>		

1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Механизм, позволяющий идентифицировать сигнальную последовательность для ЭПР, определяет способ переноса белка. Наиболее распространенной формой переноса белка в ЭПР является котрансляционный перенос. Эта транслокация происходит во время синтеза белка на рибосомах, связанных с мембраной ЭПР. Она начинается после того, как сигнальная последовательность узнается в цитозоле особым комплексом, известным под названием **сигнал-распознающая частица**, или **SRP**. SRP соединяется с сигнальной последовательностью и позиционирует белок и синтезирующую его рибосому на ЭПР. Это осуществляется за счет взаимодействия с рецептором (белком, который специфически связывается с SRP), расположенным на мембране ЭПР. Однако некоторые сигнальные последовательности ЭПР не взаимодействуют с SRP. Поэтому такие белки транслоцируются **посттрансляционно**, после завершения своего синтеза в цитозоле. Различные клетки в разной степени используют эти две формы транслокации белков. В клетках млекопитающих, в большинстве случаев происходит котрансляционный перенос, а у более простых эукариот, например у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, используются обе формы.



Три основных процесса, затрагивающих новообразующиеся секреторные и мембранные белки в ЭПР: 1) адресование, 2) транслокация и 3) образование нативной структуры и модификация

1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

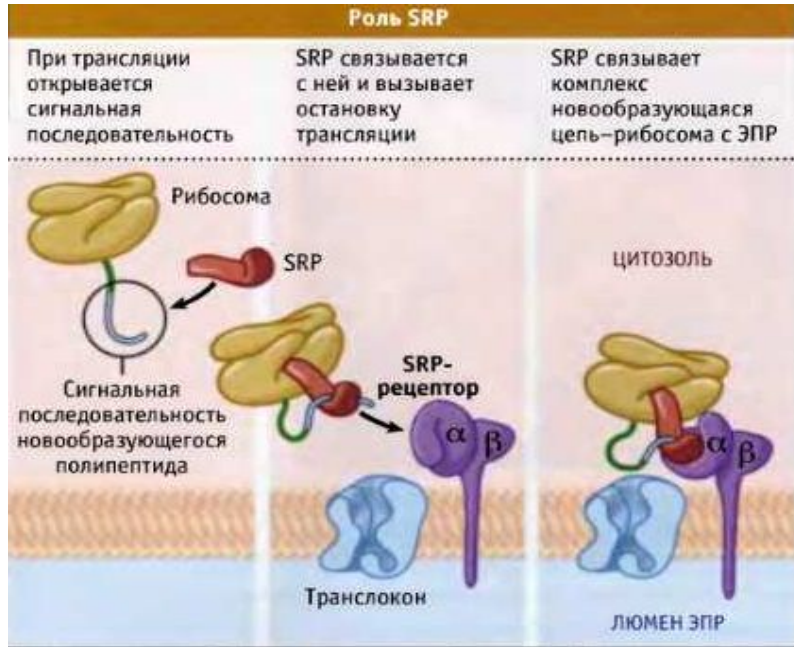
Адресование

Сигнальные последовательности некоторых белков ЭПР		
СИГНАЛ	Сайт расщепления	БЕЛОК
	M̄DIWIFLFILSGT AG	тяжелая цепь пре-IgG мыши
Гидрофобные	M̄KCLLYLAFLFIGVNC	пре-G-белок вируса везикулярного стоматита
Кислые	M̄LPGLALLLLAAWTARA	белок-предшественник амилоида человека
Основные	M̄KAFTSLLCGLGLSTTLAKA	дрожжевая прекарбоксипептидаза Y
	M̄DPPRPALLALPALLLLLAGARA	аполипопротеин В человека
	M̄AAI-SQTFWLLTFSLLCLLWQEA GA	предшественник гормона роста крысы
	M̄DSKGSSQKGSRLLLLLLVSNLLLCQGVVS	предшественник бычьего пролактина
	M̄FFNRLSAGKLLVPLSVVLYALFVVILPLQNSFHSSNVLVRG	дрожжевой пре-Kar2p

К числу наиболее удивительных особенностей сигнальных последовательностей относится их разнообразие. Единственный для них общий элемент представляет собой центральный участок, состоящий из 6–20 гидрофобных аминокислот, состав которого для разных белков различен. Большинство сигнальных последовательностей на N-конце также содержат несколько полярных аминокислот. Обычно за гидрофобным доменом расположена C-терминальная область полярных аминокислот, где отщепляется сигнальная последовательность. Однако, строго говоря, ни один из этих полярных доменов не является абсолютно необходимым в адресовании.

1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

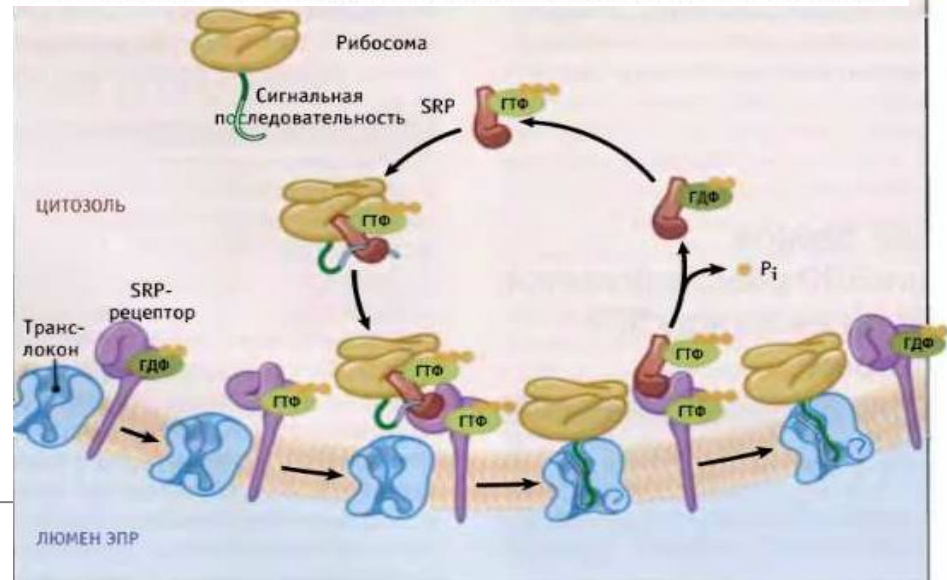
Адресование



Для узнавания сигнальной последовательности требуется только одна субъединица SRP. В соответствии со своей молекулярной массой она называется SRP54, и у многих видов ее структура консервативна, что подчеркивает важность механизма узнавания сигнальных последовательностей.

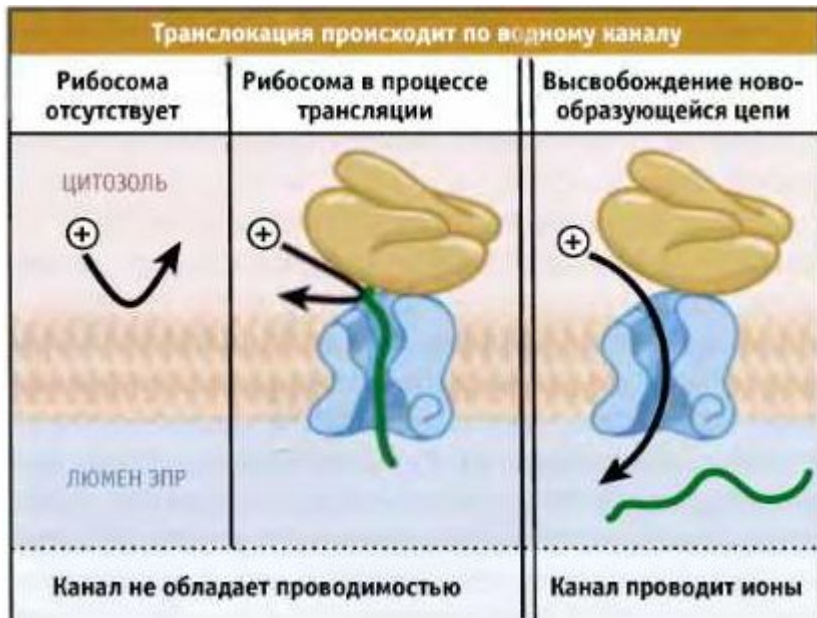
Две другие субъединицы SRP, SRP9 и SRP14, а также 7SPHK присоединяются к рибосоме, снижая скорость элонгации белковой цепи, вероятно, за счет непосредственного вмешательства в процесс связывания трансляционного фактора элонгации. Степень подавления элонгации варьирует от субстрата к субстрату, но во всех случаях подавление снимается только тогда, когда рибосома связывается с ЭПР, и происходит высвобождение SRP.

Открытие SRP показало, что сигнальные последовательности узнаются при специфическом белок-белковом взаимодействии. SRP представляет собой маленькую рибонуклеопротеидную частицу, локализованную в цитозоле, которая содержит шесть полипептидов и небольшую молекулу РНК. Она связывается с сигнальной последовательностью новообразующегося белка, высвобождающегося из рибосомы, и тем самым дает возможность комплексу полипептид-рибосома осуществить взаимодействие с мембраной ЭПР.



1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Транслокация



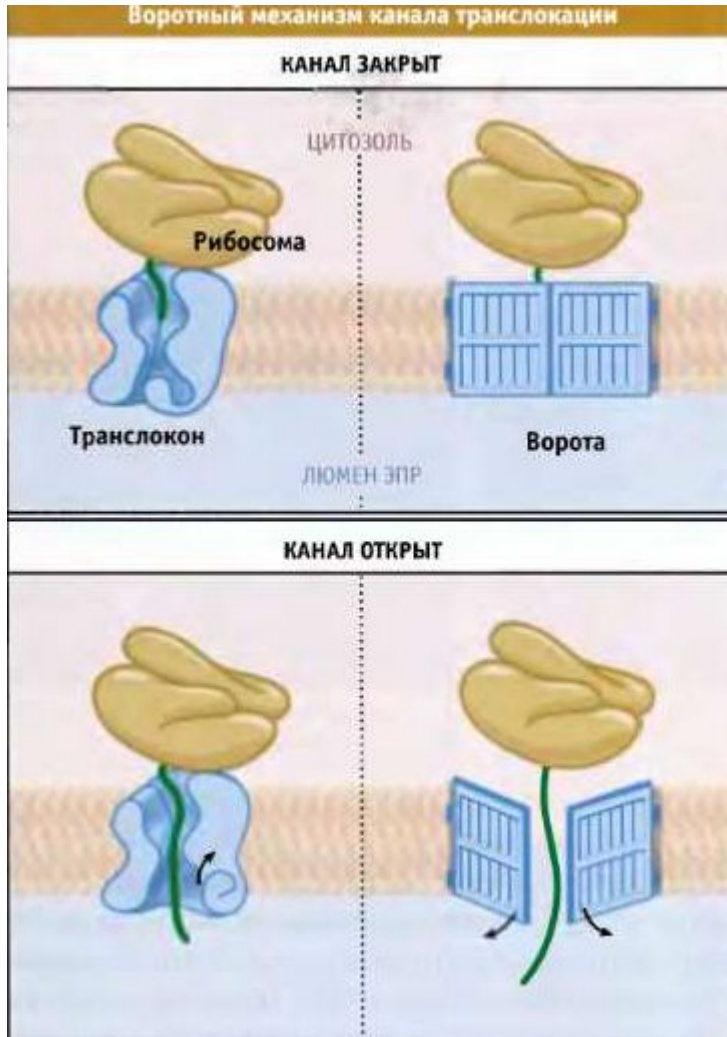
Белки преодолевают мембрану ЭПР по заполненному водой каналу, который проходит через мембрану и специально предназначен для транслокации. Этот канал, вместе со связанными с ним другими белками, называется транслоконом. Транслоконовый комплекс обладает динамичной структурой, и прежде чем рассмотреть транслокацию, целесообразно подробнее ознакомиться с его строением.

Sec61 обладает консервативной структурой, что свидетельствует о его критической роли в процессе транслокации. Впервые, белки, соответствующие этому комплексу, были обнаружены в дрожжах, при генетическом скрининге, специально предпринятом для поиска генов, кодирующих компоненты, необходимые для входа секреторных белков в ЭПР. Было обнаружено несколько таких генов, включая SEC61. Этот ген кодирует белок Sec61p, представляющий собой интегральный белок мембраны, который десять раз пронизывает мембрану ЭПР. В клетках млекопитающих присутствует гомолог этого белка, Sec61 α . На основании биохимических экспериментов *in vitro* предположили, что Sec61p окружает транслоцируемый белок и очень вероятно, что он образует стенку канала. Генетические и биохимические исследования показали, что Sec61p прочно связывается с двумя другими, более мелкими белками, точные функции которых неизвестны:

- Sss1p (Sec61 γ у млекопитающих) и
- Sbh1p (Sec61 β у млекопитающих)

Вместе три этих компонента образуют гетеротримерный комплекс Sec61.

1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР. Транслокация

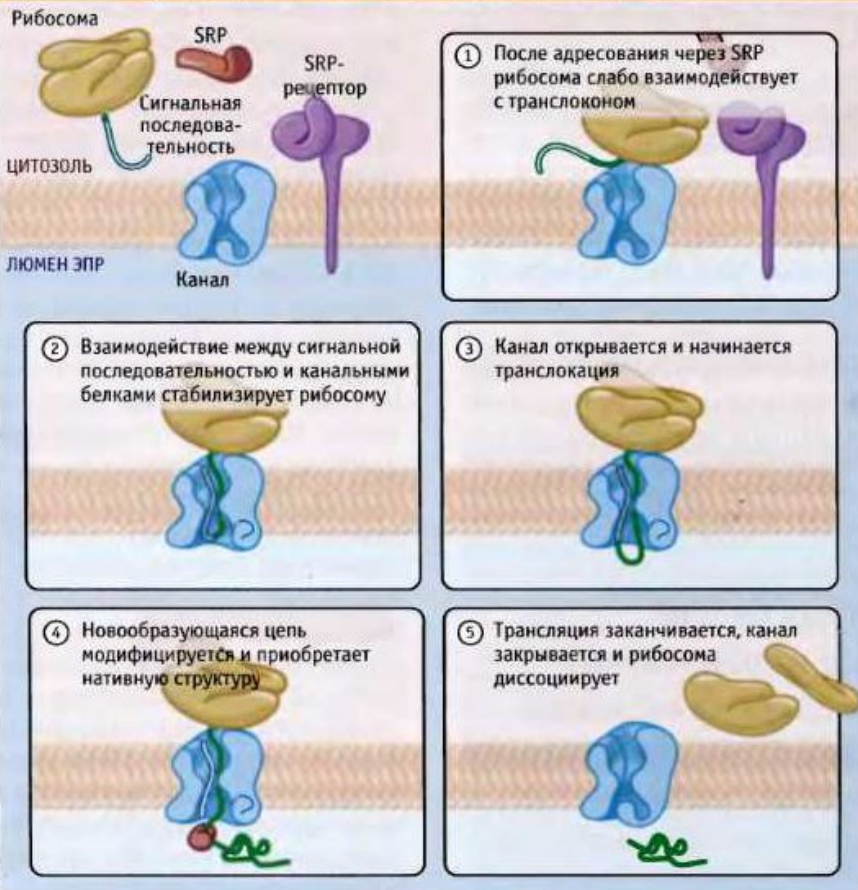


Хотя SecY1 непосредственно образует канал, рядом находятся другие белки, и комплекс SecY1 может рассматриваться как некий каркас, на котором собираются белки ЭПР, принимающие участие в переносе, а также в модификации и формировании нативной структуры белка. Например, в каждом активном транслоконе, наряду с рибосомой и описанным выше SR комплексом, присутствует сигнальная пептидаза, которая отщипывает сигнальную последовательность от переносимого белка. Также в транслоконе находится олигосахарид — трансфераза (ОСТ), представляющая собой комплекс ферментов, которые ковалентной связью присоединяют сахарные остатки к белковым цепям. С растущей цепью взаимодействуют и другие белки, функции которых остаются невыясненными. С сигнальной последовательностью и трансмембранными доменами часто связан т. н. «мембранный белок, ассоциированный с переносимым белком (TRAM)». В отличие от ферментов, деградирующих или модифицирующих участки образующейся цепи, белок TRAM необходим для переноса некоторых белков на нескольких этапах этого процесса. Еще один белковый комплекс, принимающий участие в переносе, называется **белок, ассоциированный с транслоконом (TRAP)**. Он также распространен, как SecY1 α , и облегчает узнавание сигнальной последовательности каналными белками, хотя механизм его действия остается неизвестным. Очевидно, что транспортный канал не функционирует изолированно, а, по-видимому, является частью большого белкового комплекса, который регулирует процесс транслокации. Таким образом, при необходимости, клетка в любой момент времени может изменить процесс транслокации индивидуальных белков.

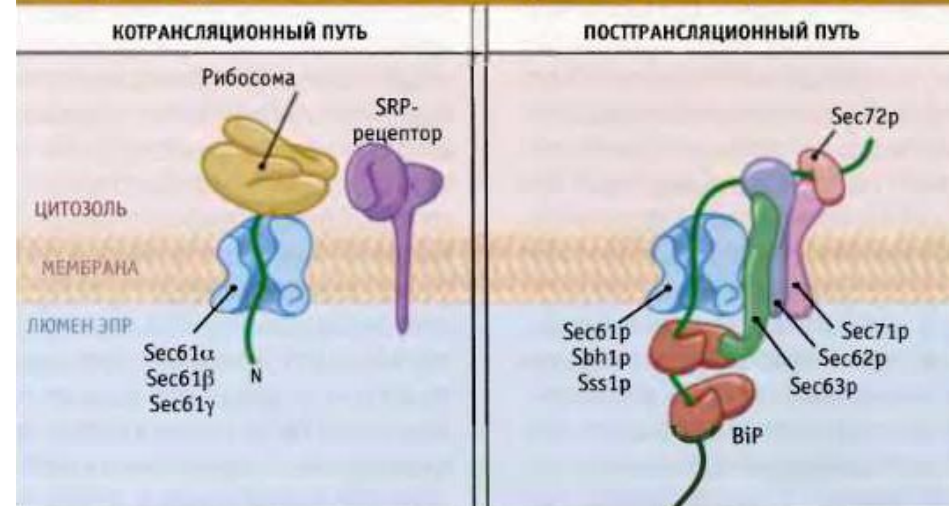
1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Транслокация

Транслокация белка является многоступенчатым процессом



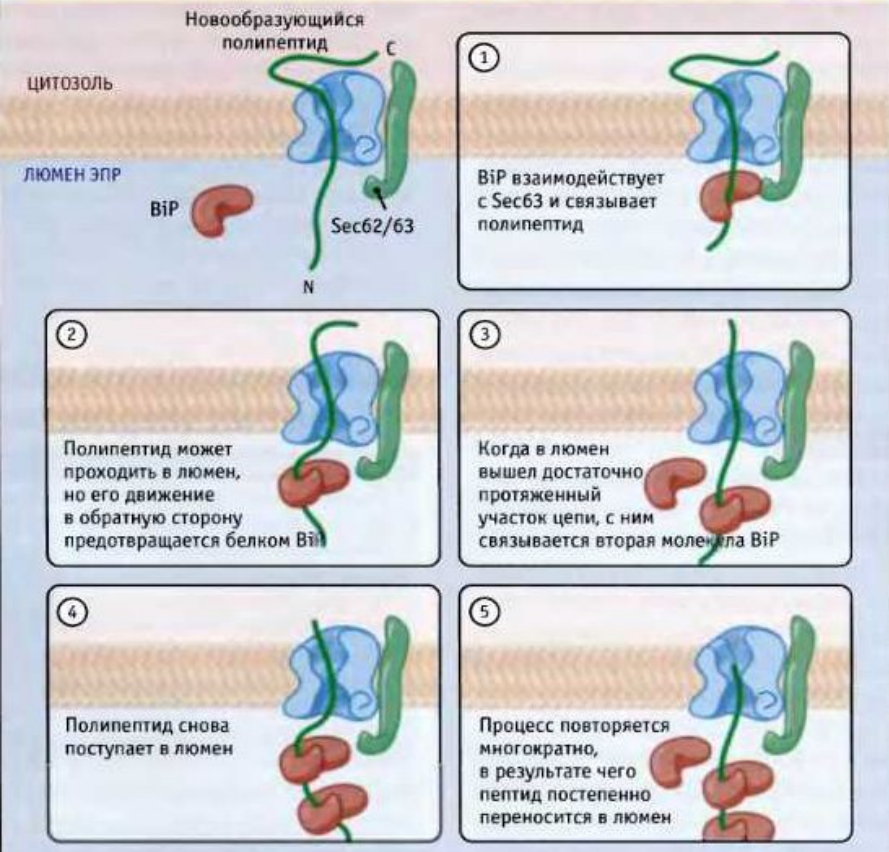
Строение транслоконов, обеспечивающих различные способы транслокации



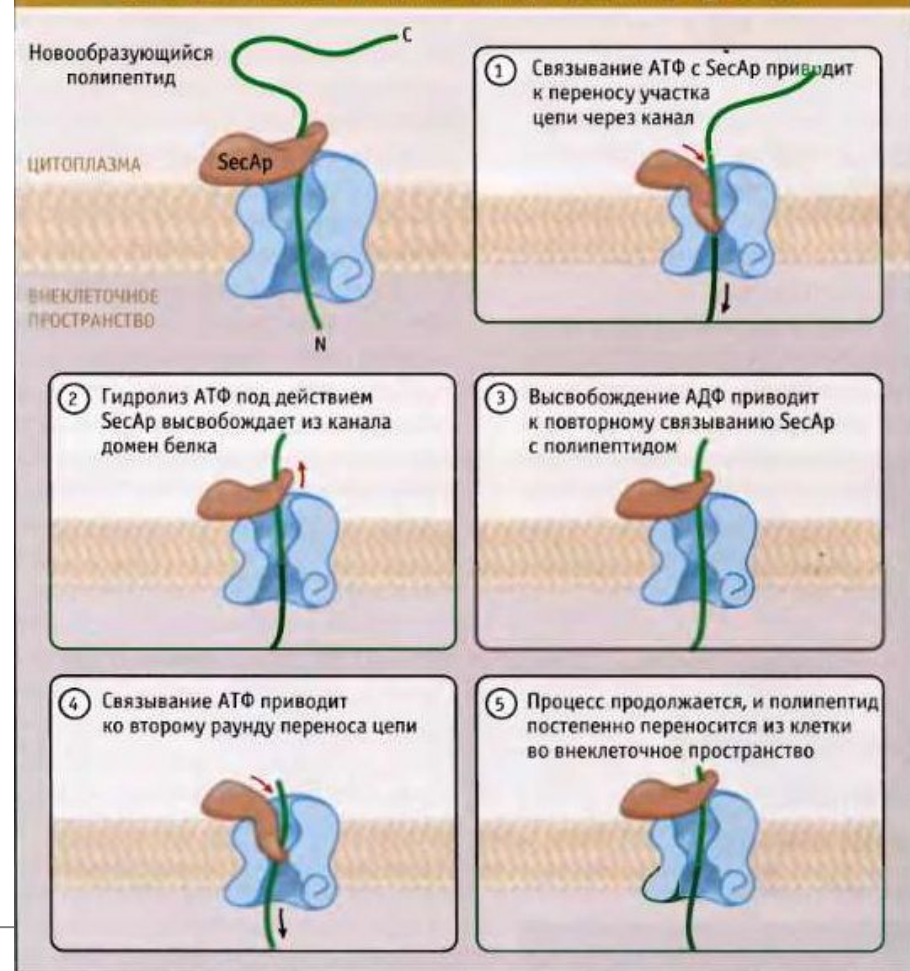
1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Транслокация

Модель, описывающая броуновский храповый механизм посттрансляционной транслокации

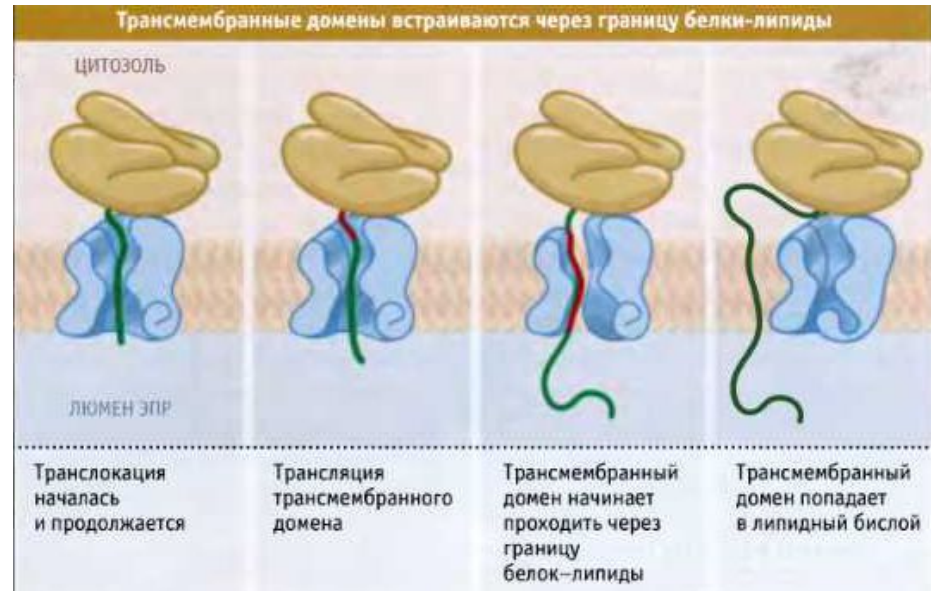
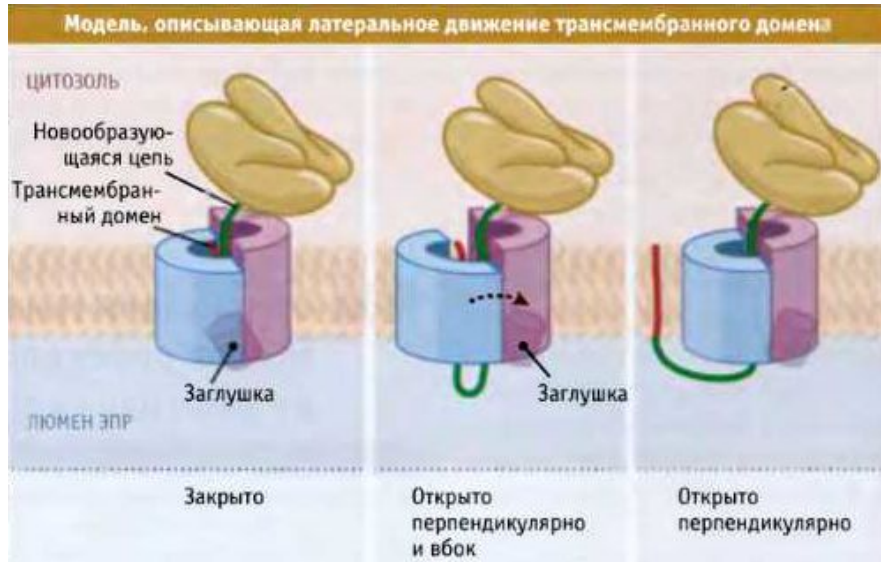


Модель, описывающая посттрансляционную транслокацию у бактерий



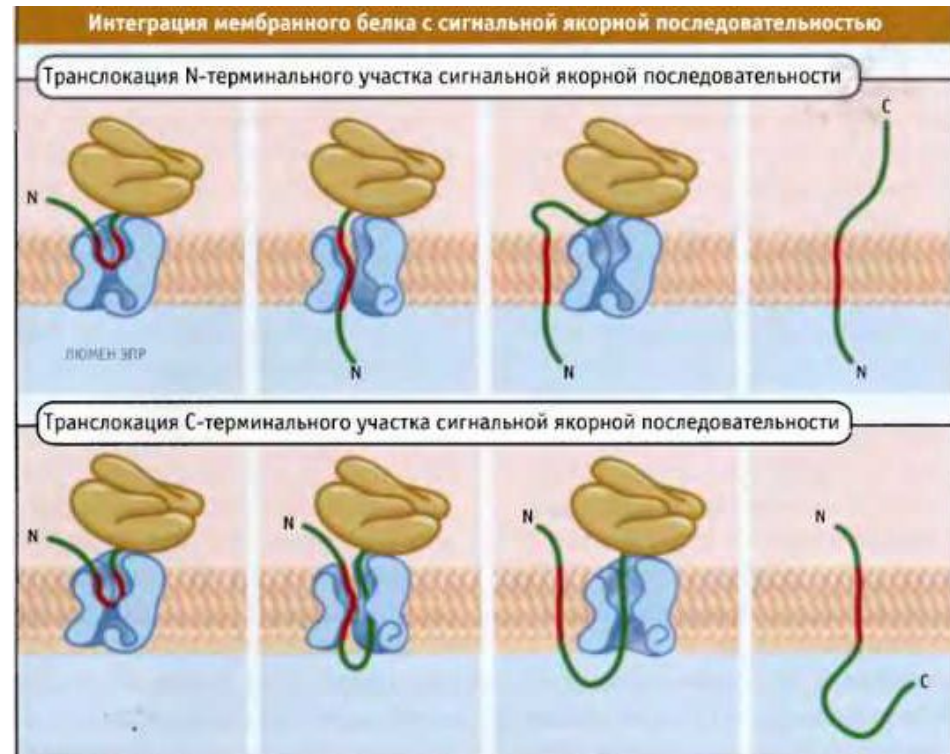
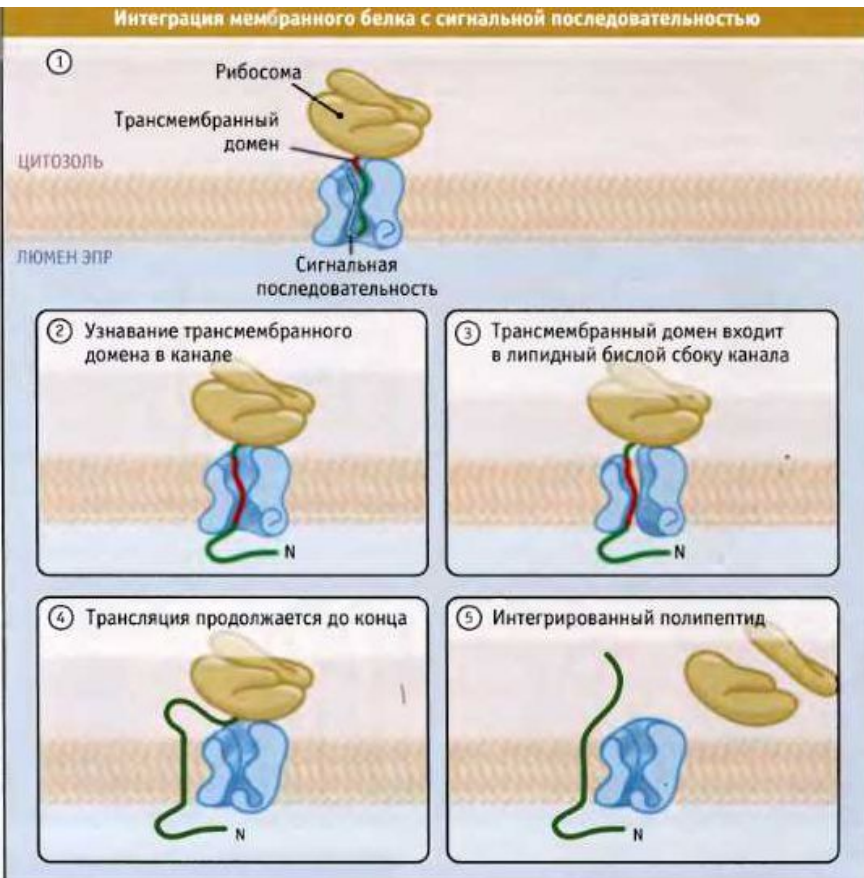
1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Транслокация



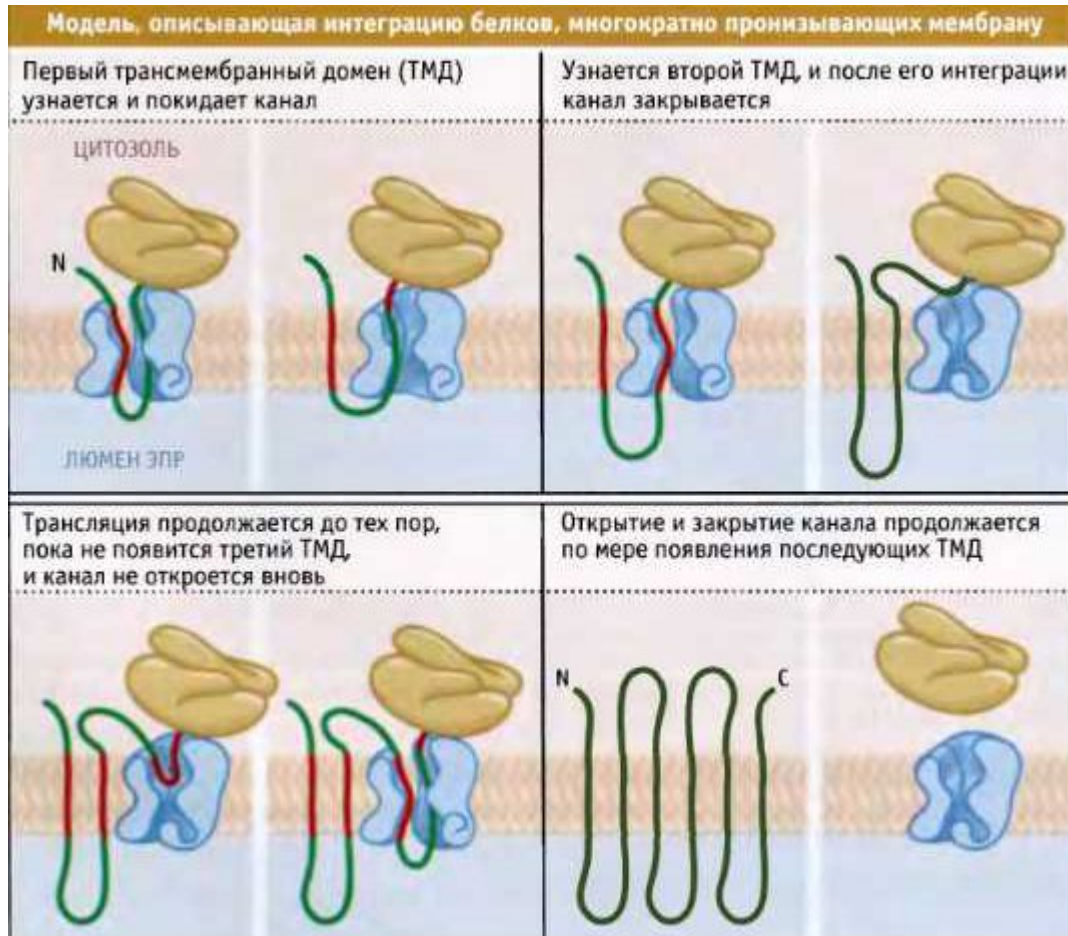
1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Транслокация



1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Транслокация



1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Модификация

Часто по мере транслокации в ЭПР белки ковалентно модифицируются. Наиболее часто происходят следующие три типа модификаций:

- удаление сигнальной последовательности;
- присоединение сложного углеводного остатка (**N-гликозилирование**); и
- присоединение фосфолипида **гликозилфосфатидилинозитола (ГФИ)**.

Почти каждый белок, поступающий в ЭПР или интегрирующийся в мембрану, подвергается, по крайней мере, одной из этих модификаций.

Наиболее очевидна необходимость отщепления сигнальной последовательности. Если эти последовательности сохраняются, то могут препятствовать образованию нативной структуры белков после транслокации. Также они могут быть ошибочно приняты за сигнальный якорь и вызвать интеграцию секреторных белков в мембрану ЭПР. Поэтому сигнальные последовательности относятся к «одноразовым» структурам. После выполнения своих функций по адресованию новообразующихся полипептидов в ЭПР и участия в начальных этапах транслокации, они удаляются и отбрасываются. Отщепление сигнальной последовательности представляет собой универсальное событие транслокации секреторных и таких трансмембранных белков, в которых эта последовательность не является трансмембранным доменом.

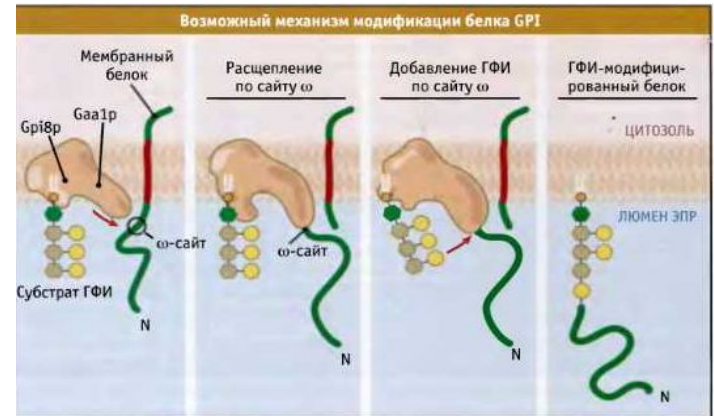
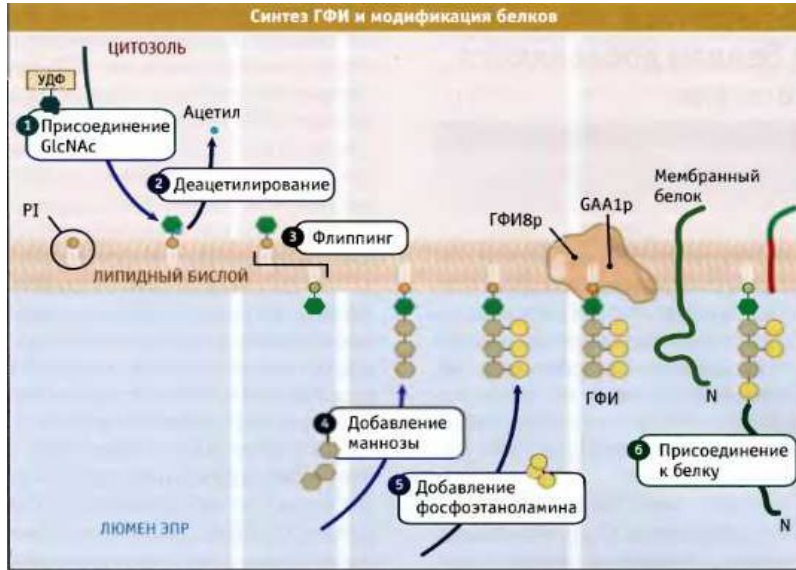
Отщепление сигнальной последовательности происходит под действием комплекса мембранных белков, состоящего из пяти субъединиц, который называется комплексом **сигнальной пептидазы (SPC)**. Только две субъединицы комплекса обладают протеолитической активностью, три других, вероятно, играют регуляторную роль. Поскольку новообразующаяся цепь входит в канал транслокации в виде петли, сайт деградации, по-видимому, должен располагаться внутри мембраны ЭПР, обращенной в сторону люмена, при его разрезании SPC.

Местоположение сайта отщепления сигнальной последовательности зависит от белка и в значительной степени определяется аминокислотным окружением. Остаток, расположенный с N-терминальной стороны от места расщепления, должен быть представлен аминокислотой с короткой боковой цепью, а остаток, расположенный от него через три аминокислоты, должен принадлежать незаряженной аминокислоте. Для некоторых белков, поблизости от истинного сайта деградации существует несколько подобных сайтов, и неизвестно, каким образом выбирается нужный. На положение сайта расщепления могут также влиять некоторые неизвестные свойства сигнальной последовательности.

1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Модификация

Присоединение фосфолипида гликозилфосфатидинозитола (ГФИ)



ГФИ синтезируется при протекании нескольких последовательных реакций. Вначале реакции проходят на мембране ЭПР со стороны цитоплазмы, а затем со стороны люмена. По окончании синтеза ГФИ ковалентно присоединяется к белку, который при этом расщепляется вблизи от С-терминального конца. В результате модификации белка ГФИ он присоединяется к мембране. GlcNAc – N-ацетилглюкозамин

Добавление остатка ГФИ к белку происходит в два этапа. Вначале один из белков ферментативного комплекса расщепляет субстратный белок по специфическому сайту, ковалентно связываясь с ним в процессе расщепления. Затем эта связь замещается одной из фосфоэтаноламинных групп ГФИ с образованием ГФИ модифицированного белка

Добавление ГФИ требует узнавания новообразованной цепи, которая является субстратом, и переноса остатка ГФИ на соответствующий акцепторный сайт. Сигналом добавления ГФИ служит небольшой гидрофобный домен, расположенный с С-терминальной стороны. Длина его обычно составляет от десяти до тридцати аминокислотных остатков. Подобно N-терминальным сигнальным последовательностям, сигнал ГФИ меняется от белка к белку, такие сигналы разных белков взаимозаменяемы. Когда присоединяется ГФИ, его сигнальная последовательность удаляется, и остаток ГФИ добавляется к новому остатку с С-терминальной стороны, который называется сайт омега (ω). Таким образом, так же как и сигнальная последовательность, ГФИ сигналы имеют одноразовую природу – они используются и затем отбрасываются.

1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Модификация

Гликозилирование белков в ЭПР

В просвете ЭПР вновь синтезированные белки модифицируются различным образом. После удаления сигнальных последовательностей происходит укладка полипептидных цепей с возможным образованием дисульфидных связей. Многие белки гликозилируются с образованием гликопротеинов.

Во многих гликопротеинах связь с олигосахаридами осуществляется через остатки **аспарагина**. Такие **N-связанные олигосахариды** разнообразны.

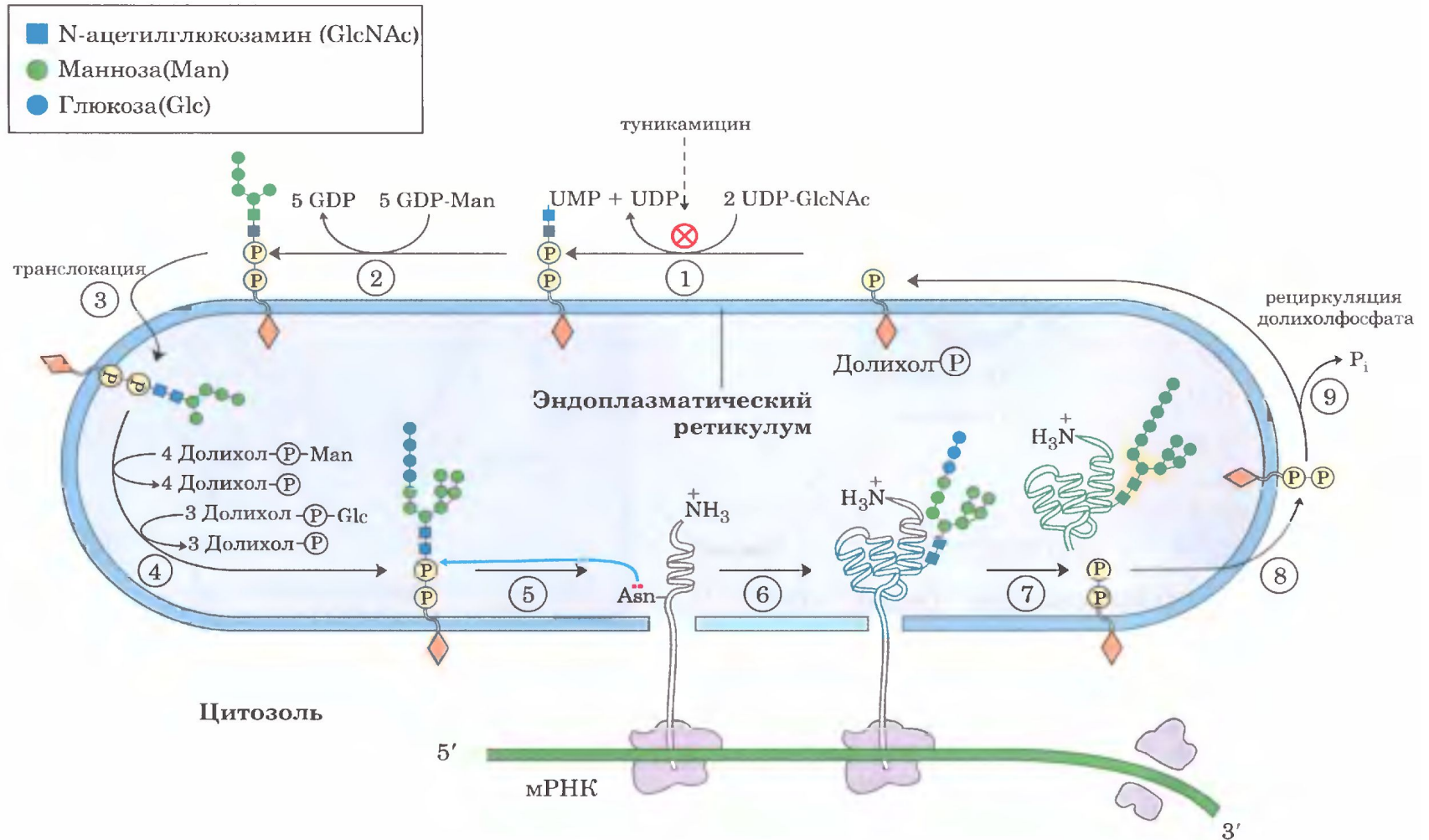
Сначала синтезируется олигосахаридное ядро из 14 остатков, которое затем переносится от донорной молекулы **долихолфосфата** на остатки аспарагина в белке. **Трансфераза** находится на поверхности ЭПР, обращенной внутрь, поэтому не может катализировать гликозилирование белков в цитоплазме.

После переноса через мембрану олигосахариды в разных белках **укорачиваются** и модифицируются по-разному, но пентасахаридное ядро сохраняется во всех N-олигосахаридах.

Некоторые белки в ЭПР подвергаются **O-гликозилированию**, однако чаще O-гликозилирование осуществляется в комплексе Гольджи или в цитоплазме (для белков, не попадающих в ЭПР).

1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Модификация



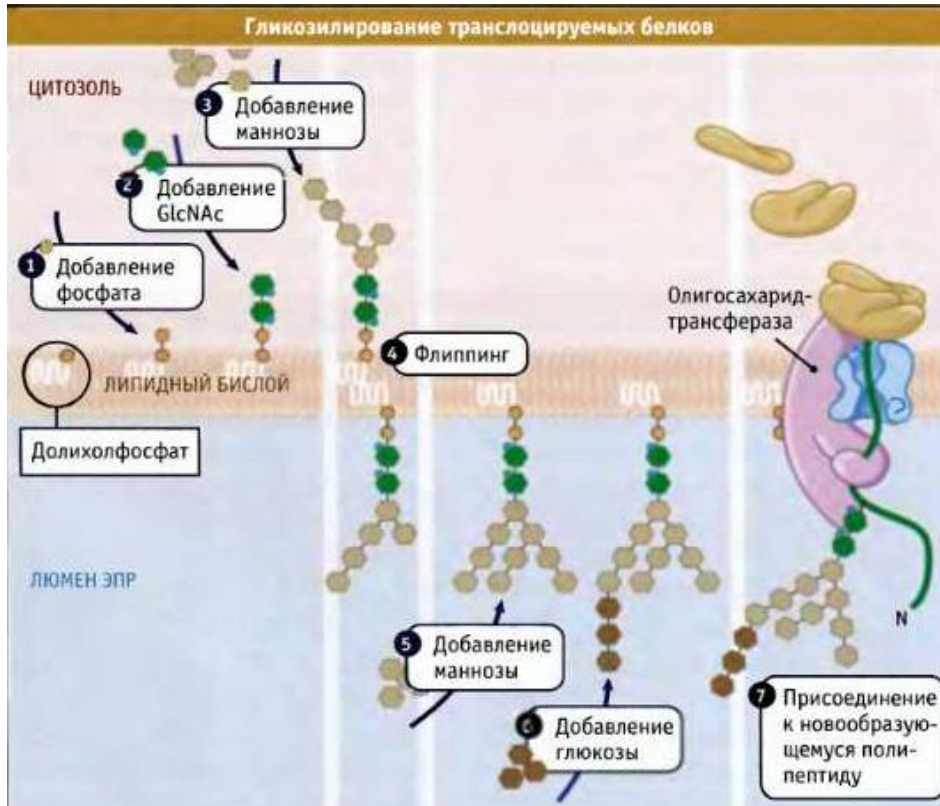
1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Модификация

Синтез олигосахаридного фрагмента гликопротеинов. Олигосахарид синтезируется путем последовательного присоединения моносахаридных единиц. ①, ② Первые стадии происходят на цитоплазматической поверхности ЭР. ③ В результате транслокации незавершенный олигосахарид переносится через мембрану (механизм не показан), и ④ окончание синтеза происходит в просвете ЭР. Дополнительные остатки маннозы и глюкозы для растущего олигосахаридов поставляют производные долихолфосфата. На первой стадии образования N-гликопротеина ⑤, ⑥ олигосахарид переносится с долихолфосфата на остаток Asn белка в просвете ЭР. В дальнейшем олигосахаридная часть в зависимости от конкретного белка по-разному модифицируется в ЭР или в комплексе Гольджи. Однако пять сахарных остатков, изображенные на бежевом фоне (после стадии ⑦), сохраняются в структуре всех N-связанных олигосахаридов. ⑧ Высвободившийся долихолпирофосфат вновь переносится через мембрану, так что пирофосфат оказывается на цитоплазматической поверхности ЭР, где ⑨ гидролизуется с регенерацией долихолфосфата.

1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Модификация



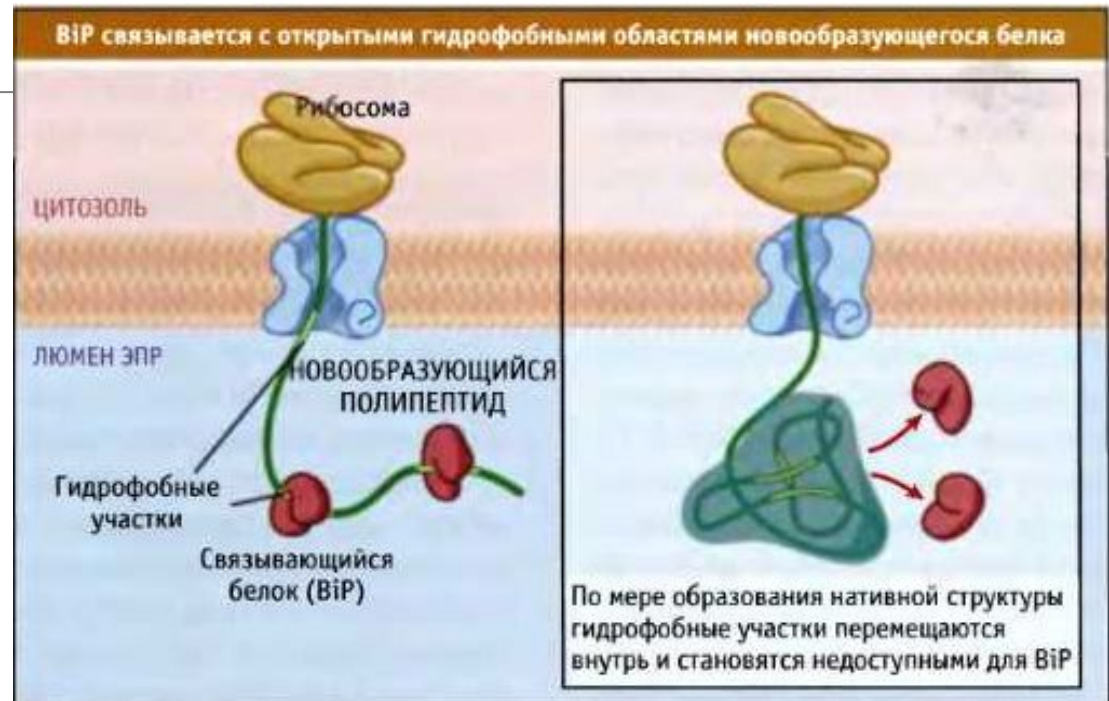
Перенос разветвленной углеводной структуры с долихолфосфата на субстрат происходит при транслокации. Процесс катализируется сложным мультисубъединичным ферментативным комплексом **олигосахарид-трансферазой (ОСТ)**. Две субъединицы ОСТ, рибофосфин I и II, пронизывают мембрану ЭПР и могут взаимодействовать со связанной рибосомой (отсюда их название), позиционируя комплекс ОСТ в непосредственной близости от канала. ОСТ модифицирует аспарагиновые остатки, когда за ними расположены любые аминокислоты, кроме пролина, а затем серин или треонин (N-X-S/T). После того как сайт выйдет из канала, гликозилирование происходит очень быстро; до его начала в люмен необходимо войти только 10–12 аминокислотным остаткам. Узнавание сайтов происходит достаточно эффективно: в клетке используется примерно 90% потенциальных сайтов, однако некоторые сайты не используются никогда. В зависимости от условий, степень гликозилирования того или иного белка меняется. После прохождения начального гликозилирования в ЭПР и в аппарате Гольджи в разные моменты происходят различные модификации структуры олигосахаридов, которые включают удаление и добавление сахарных остатков.

Сложная углеводная структура образуется на фосфолипиде долихолфосфате в результате протекания нескольких последовательных реакций. Синтез начинается на мембране ЭПР со стороны цитоплазмы, а заканчивается на стороне, обращенной в сторону люмена. Образующаяся олигосахаридная структура переносится на транслоцируемые белки ферментом олигосахаридтрансферазой. Модификация происходит по аспарагиновым остаткам, присутствующим в последовательности

1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Сворачивание

Шапероны



Многие распространенные шапероны ЭПР родственны шаперонам цитозоля. В люмене к числу наиболее полно охарактеризованных шаперонов относится белок BiP, из группы hsp70. Этот белок — самый часто встречающийся в ЭПР и взаимодействует со многими белками на ранних этапах образования их нативной структуры.

К другим шаперонам, содержащимся в люмене и цитозоле, относится белок Gpr94, принадлежащий к семейству hsp90. Хотя этот белок, так же как и BiP, находится в люмене в больших количествах, в отличие от последнего он связывается с белками, которые уже частично приобрели нативную структуру, а не с теми, которые только что вышли в люмен и таковой не обладают. Gpr94 взаимодействует с меньшим количеством субстратов, чем BiP, и неизвестно, какое свойство белка он узнает. Вероятно, функция его в основном заключается в том, чтобы способствовать эффекту BiP и других шаперонов, участвующих в формировании нативной структуры. Существование белка Gpr94 служит показателем того, что контроль качества образования нативной структуры белковой цепи носит многоуровневый характер.

1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Сворачивание

Протеиндисульфидизомераза

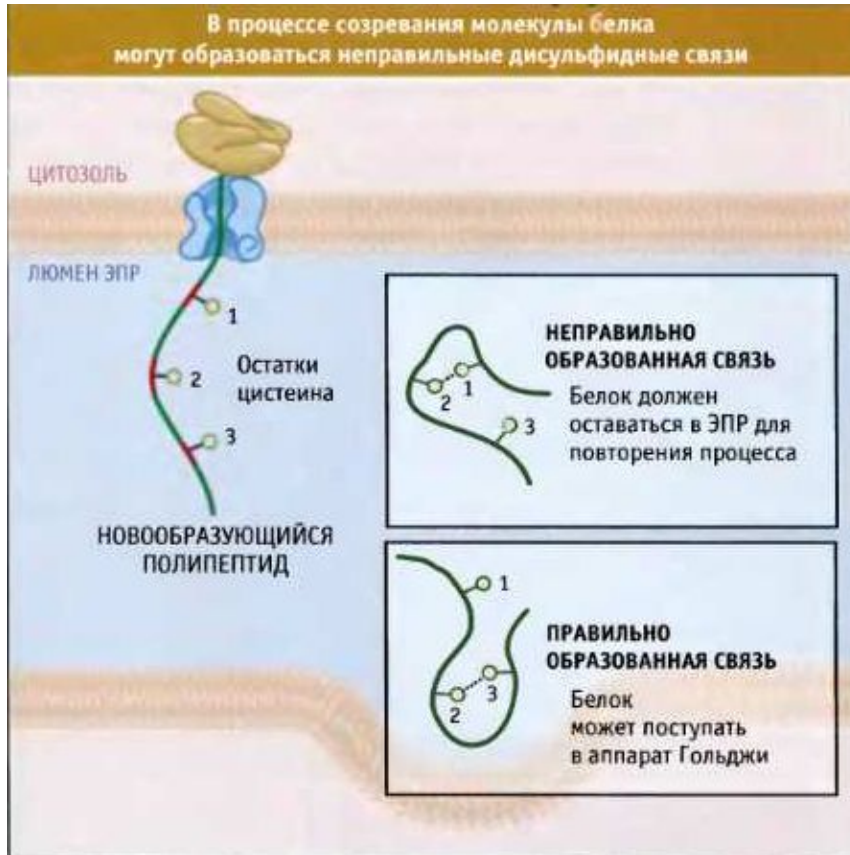
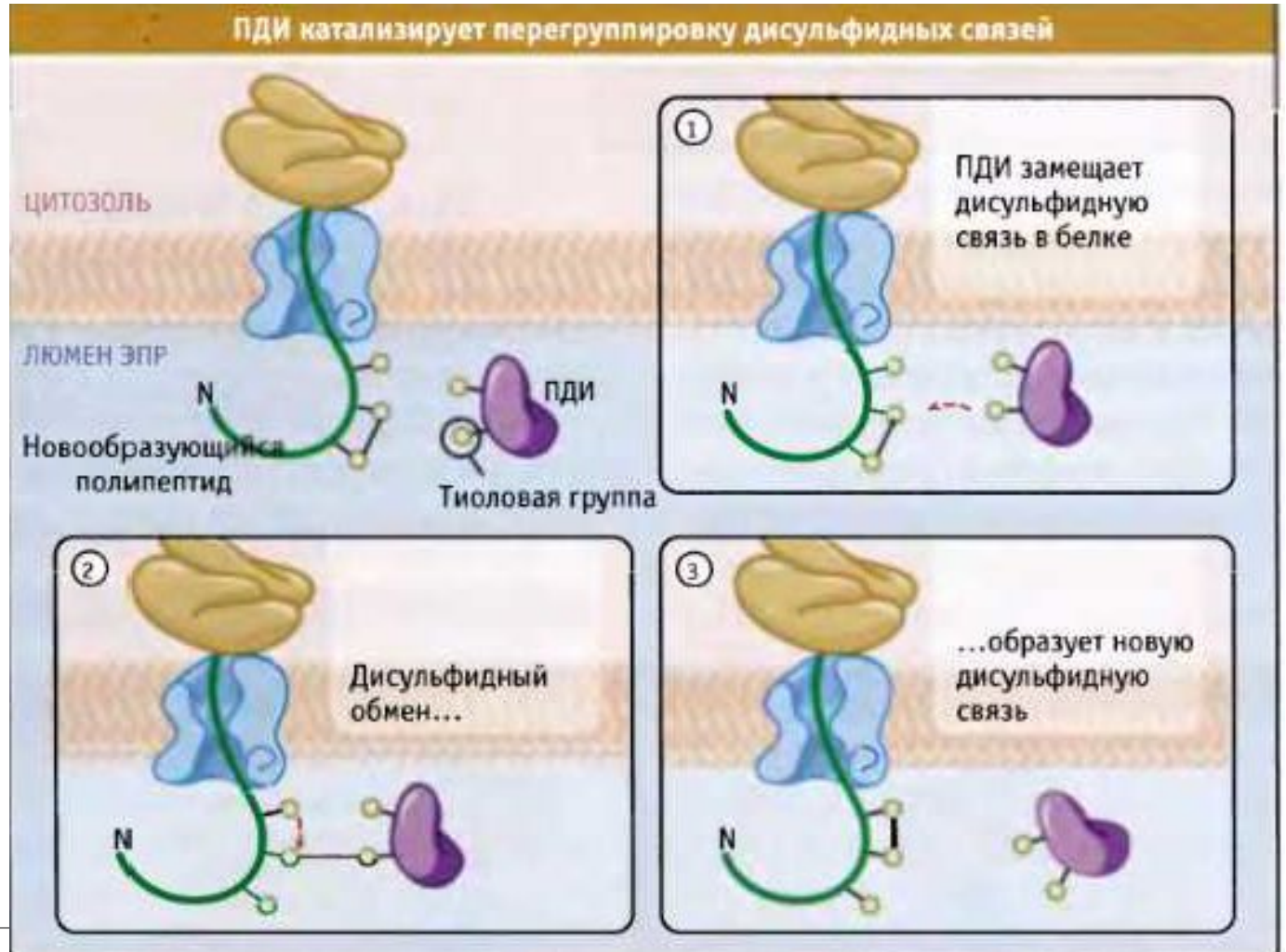


РИС. 3.30 При попытке транслоцированного белка приобрести нативную структуру могут образоваться неправильные дисульфидные связи. Эти связи должны узнаваться и замениться на правильные до поступления белка в аппарат Гольджи

1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Сворачивание

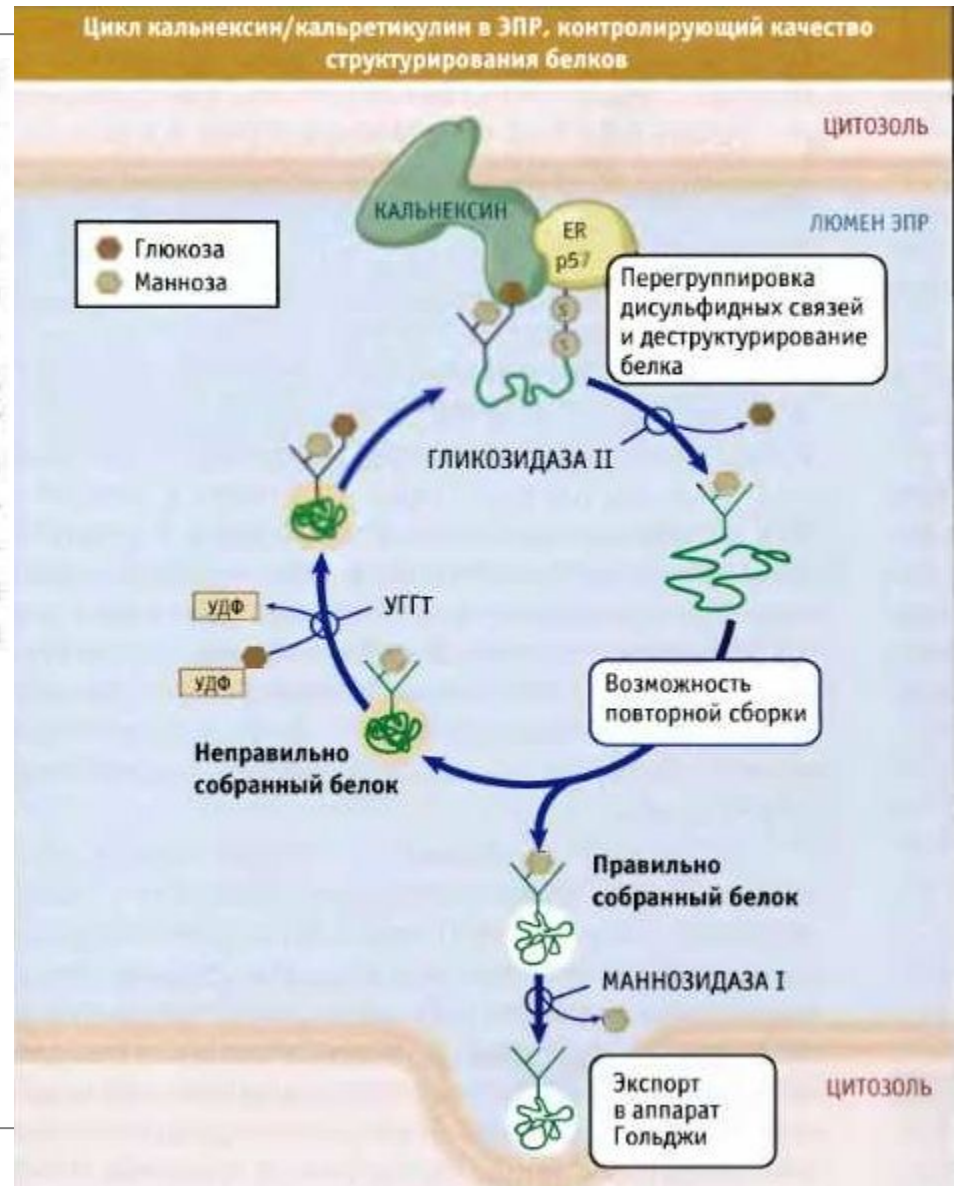
Протеиндисульфидизомераза



1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Сворачивание

Еще одна форма контроля за образованием нативной структуры белка в ЭПР осуществляется шаперонами, зависимиыми от лектинов. При этом гликопротеины в люмене ЭПР связаны с белками, присоединяющими углеводы (**лектинами**). Эти лектины обычно представлены интегральным мембранным белком кальнексин и его гомологом, присутствующем в люмене, — кальретикулином. По-видимому, они не являются шаперонами. Их функция заключается в том, что они облегчают контакт новообразованных гликопротеинов с ПДИ и шапероном ERp57. Таким образом, гликозилирование транслоцированных белков представляет собой еще один путь контроля за их качеством. Хотя кальнексин и кальретикулин узнают несколько разные сайты гликопротеинов, они функционируют одинаково



1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Деградация

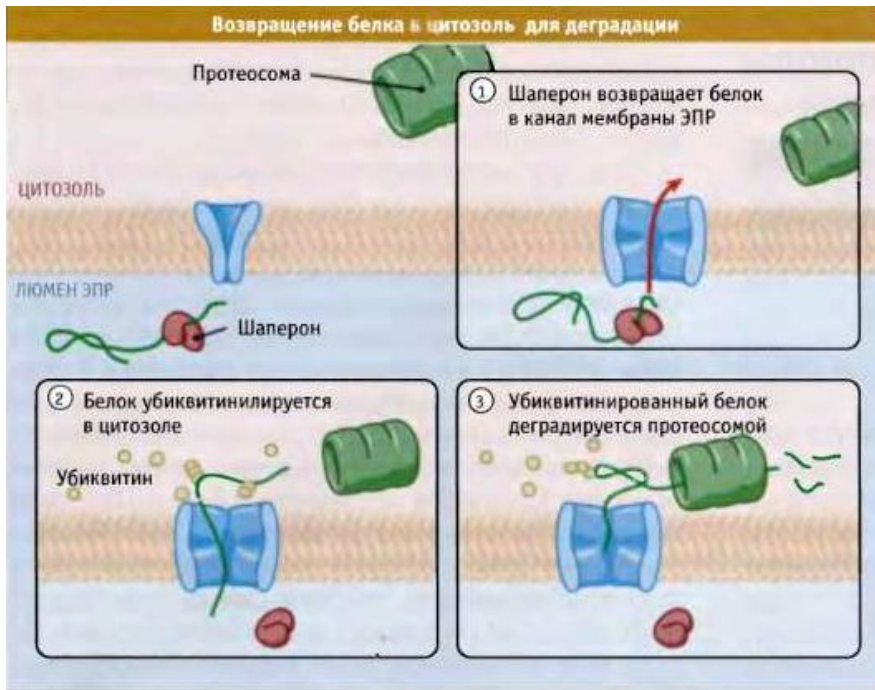
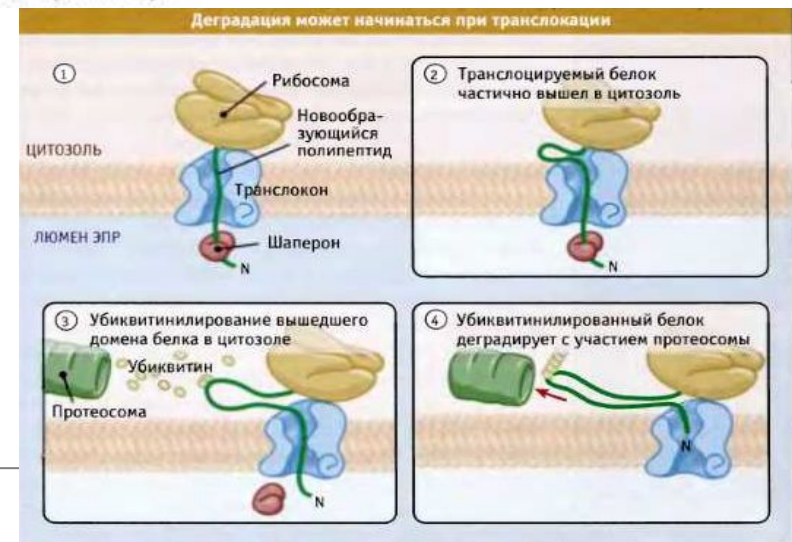


РИС. 3-35. При ретроградной транслокации белки с неправильной нативной структурой возвращаются из люмена ЭПР обратно в его мембрану и в цитоплазму. Там они подвергаются деградации в протеосомах. По-видимому, определенную роль в переадресовании играют шапероны люмена, поскольку они должны связываться с белками, обладающими неправильной нативной структурой

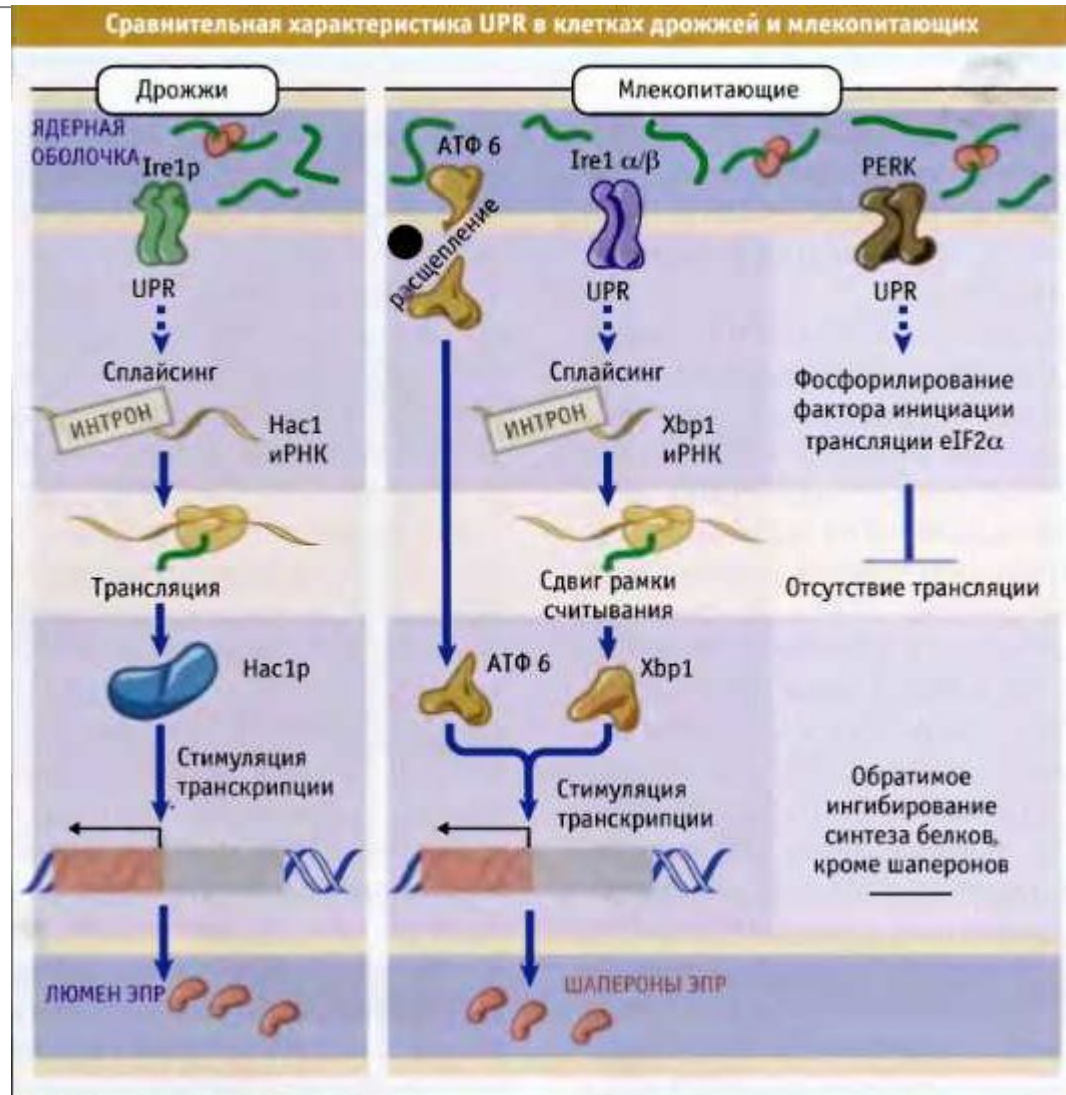
Контроль за структурой белков, осуществляемый в ЭПР, обеспечивает экспорт только таких трансмембранных и секреторных белков, которые обладают правильной нативной конфигурацией, в то время как белки неправильной структуры удерживаются в ЭПР шаперонами и имеют шанс исправить конфигурацию. Однако что же происходит с белками, которым не удастся приобрести правильную структуру? Такие белки должны каким-то образом деградировать. Одним из путей решения этой проблемы служит использование ретроградной транслокации (иногда называемой *дислокация* или *ретро-транслокация*) для экспорта неправильно собранных белков обратно в цитозоль. Там они взаимодействуют с убиквитином и деградируют с участием больших протеазных комплексов, протеосом (). Этот путь деградации называется — **деградация, связанная с ЭПР (ERAD)**.



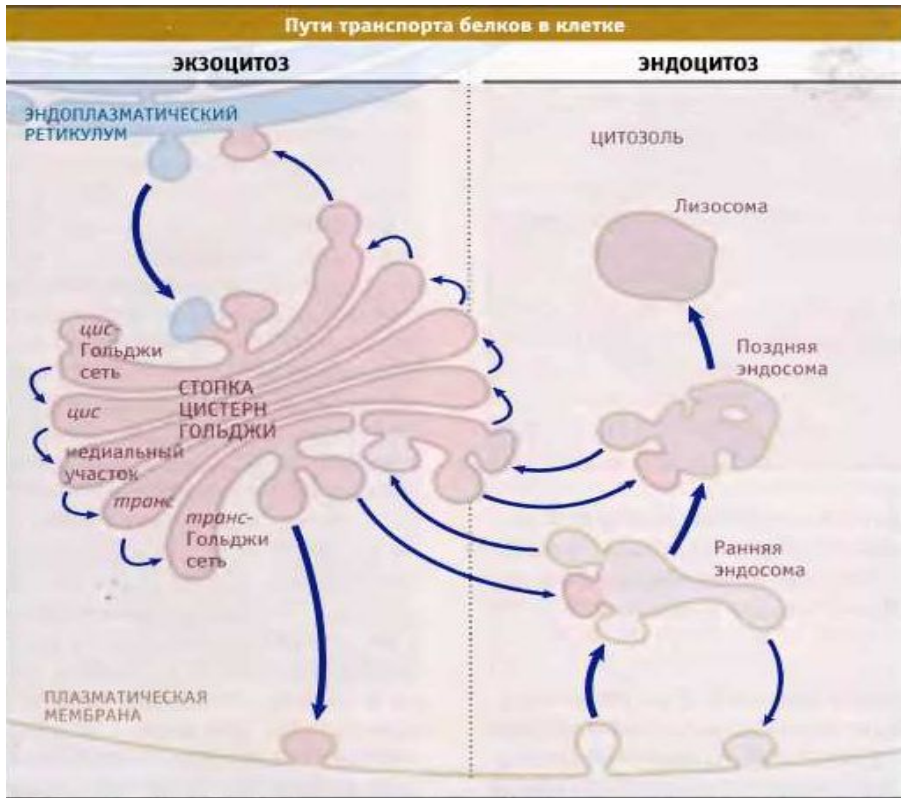
1. Секреторный путь транспорта белков. ЭПР

Деграция

Отклик
неструктурированн
ых
белков (UPR)



2. Везикулярный транспорт

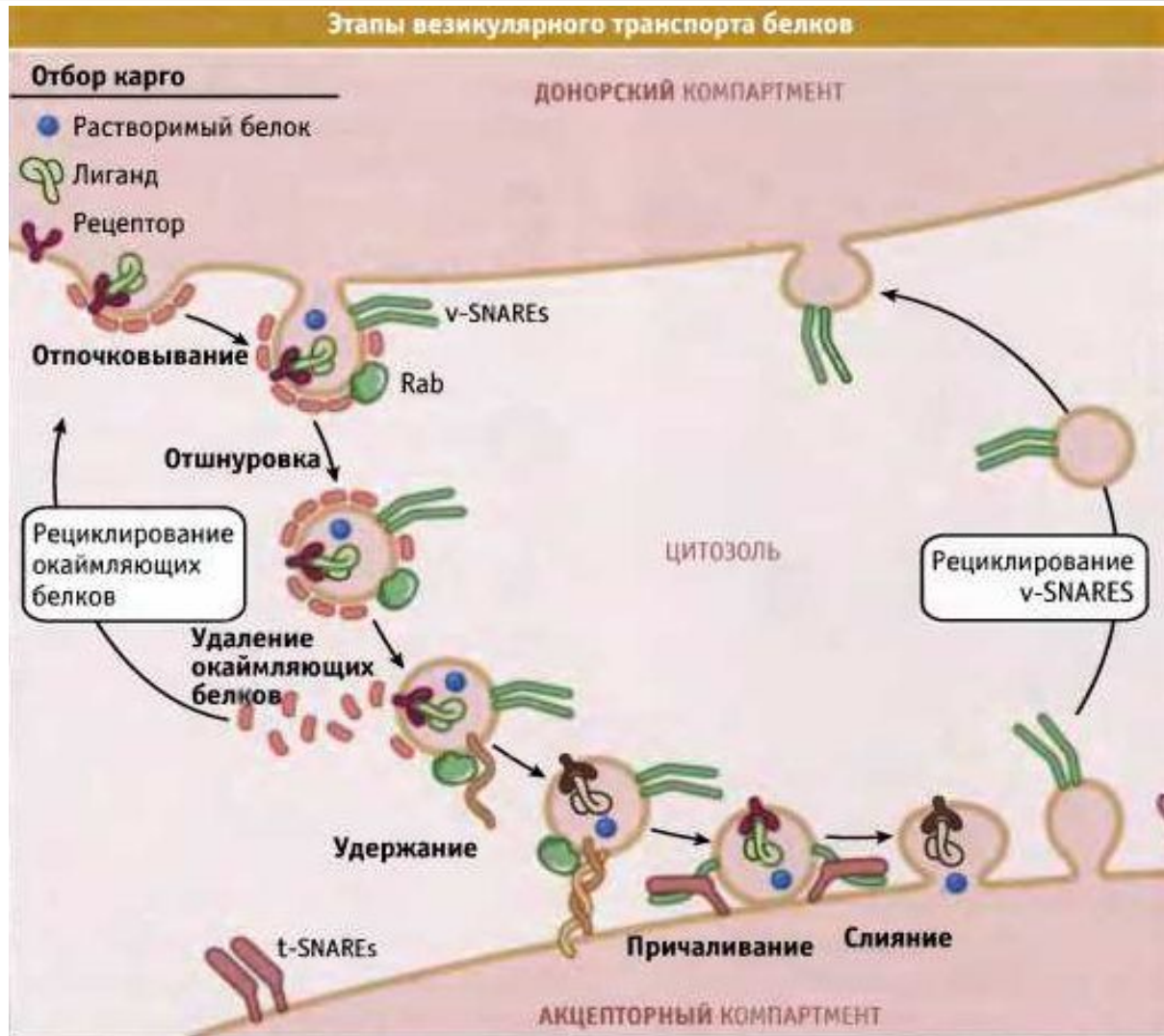


2. Везикулярный транспорт

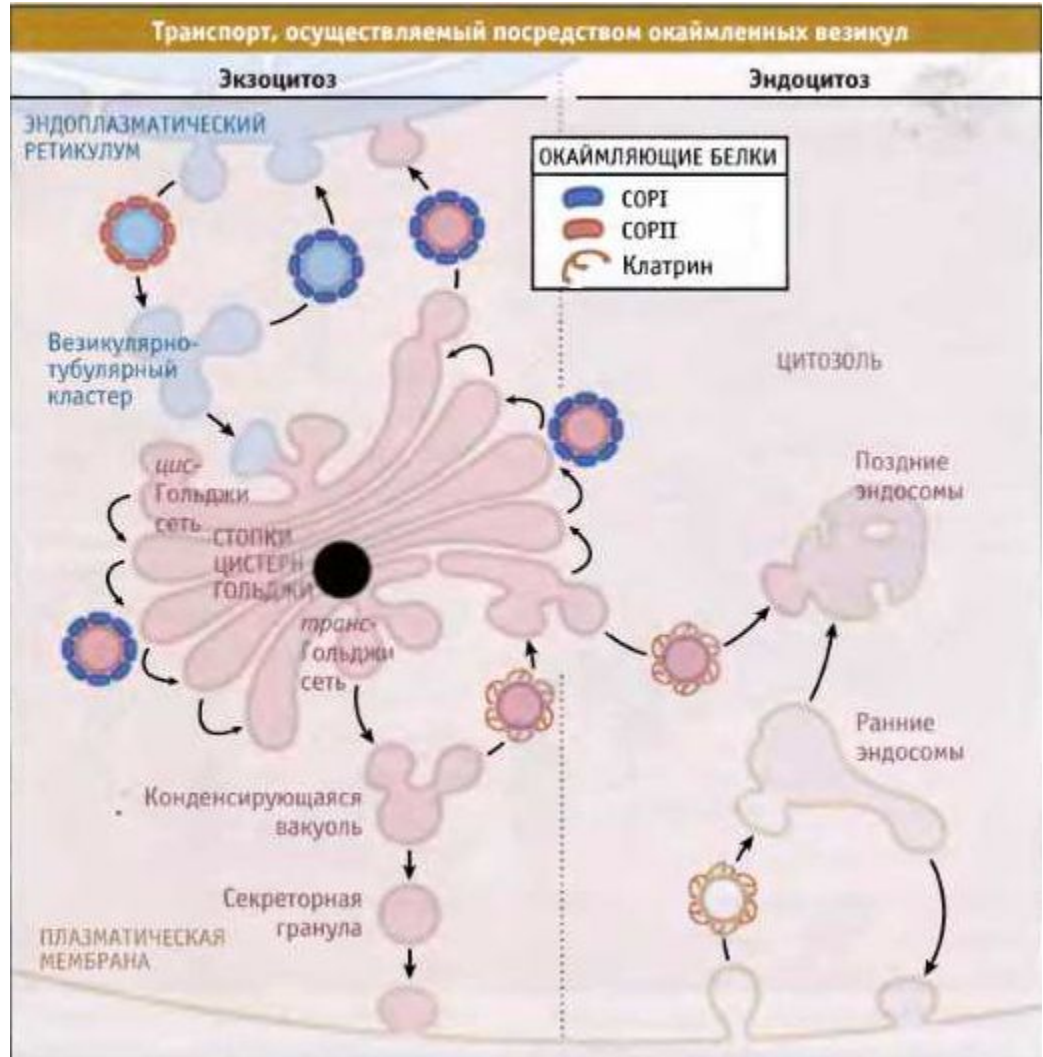
Далее модифицированные белки могут транспортироваться в различные клеточные отделы. Из ЭР в комплекс Гольджи белки поступают в транспортных пузырьках (везикулах)

В комплексе Гольджи олигосахариды присоединяются к некоторым белкам О-гликозидной связью, а N-связанные олигосахариды подвергаются дальнейшим модификациям. С помощью механизма, суть которого еще полностью не установлена, аппарат Гольджи сортирует белки и направляет их к месту назначения. Сортировка белков, предназначенных для секреции, и белков для плазматической мембраны или лизосом основана на структурных особенностях, которые не связаны с сигнальными последовательностями, поскольку последние удаляются в просвете ЭР.

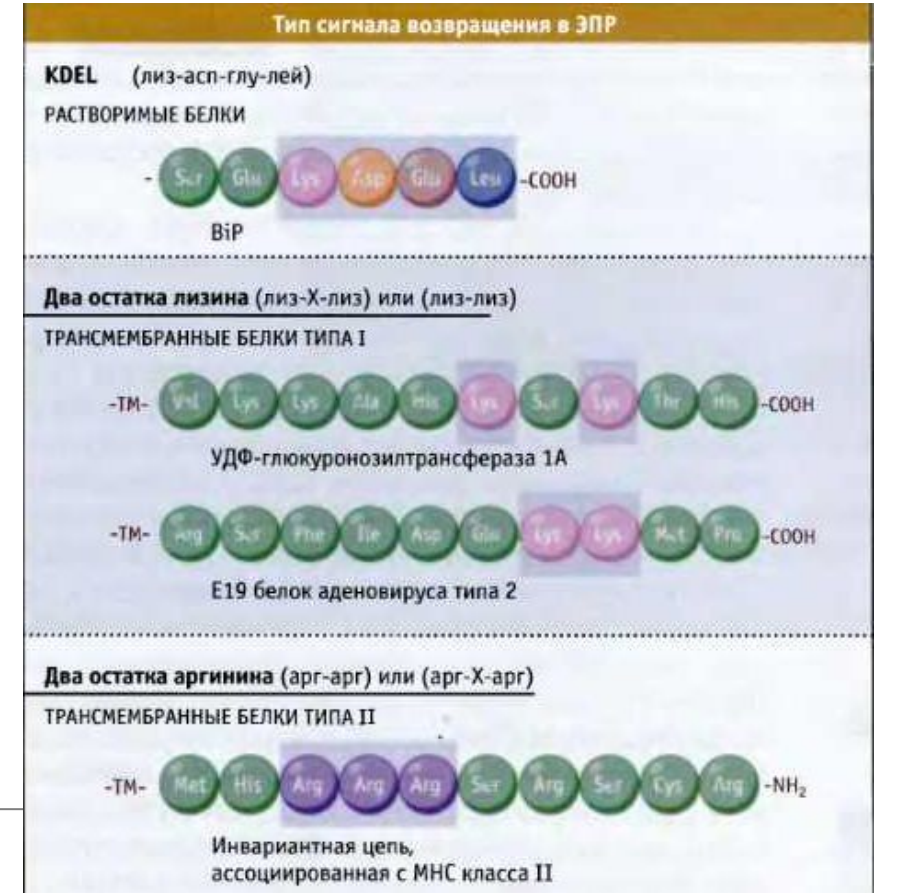
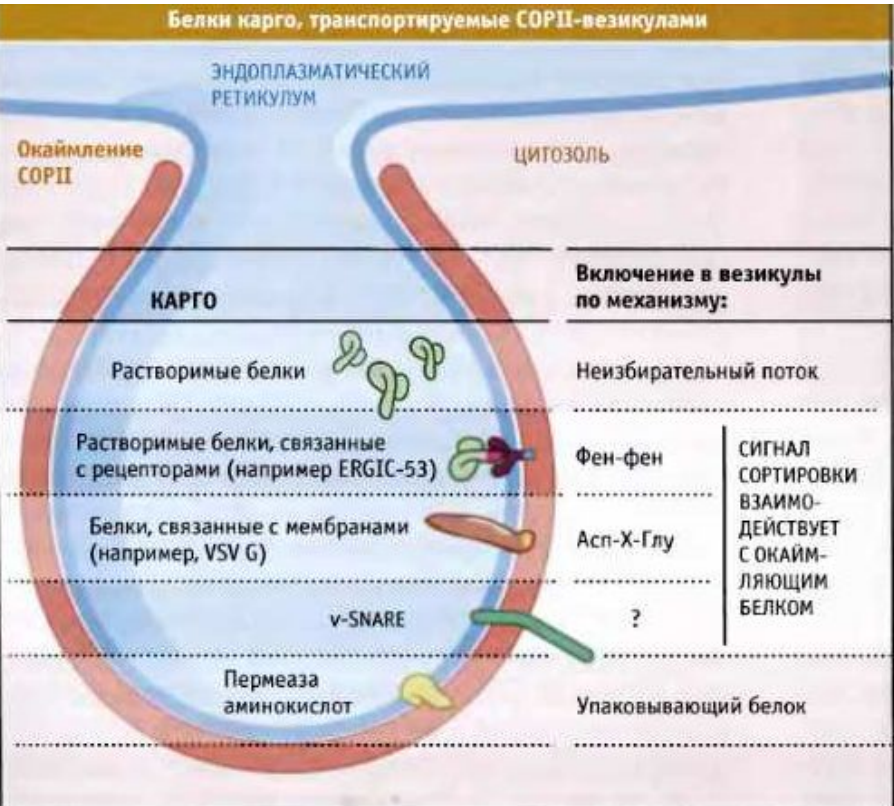
2. Везикулярный транспорт



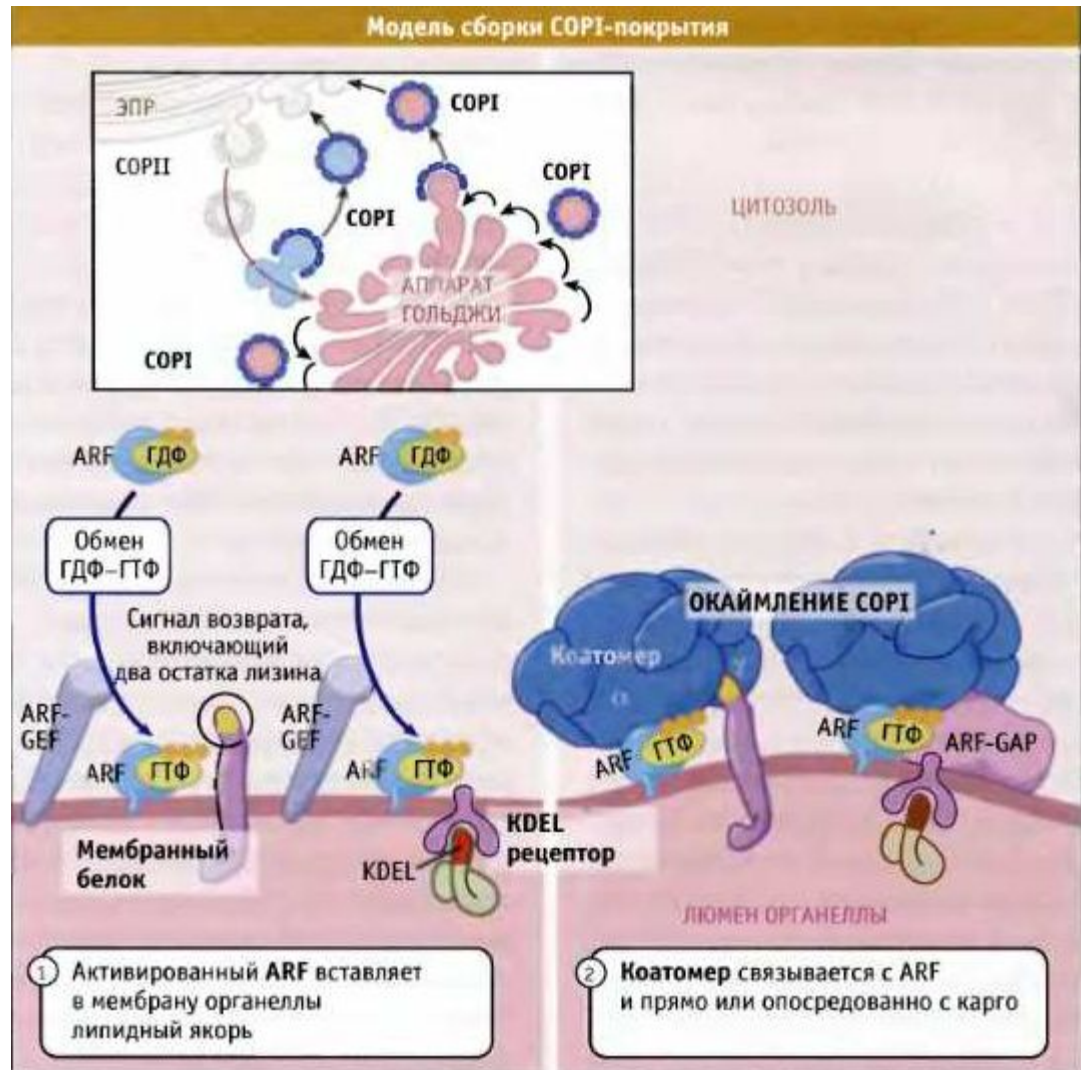
2. Везикулярный транспорт



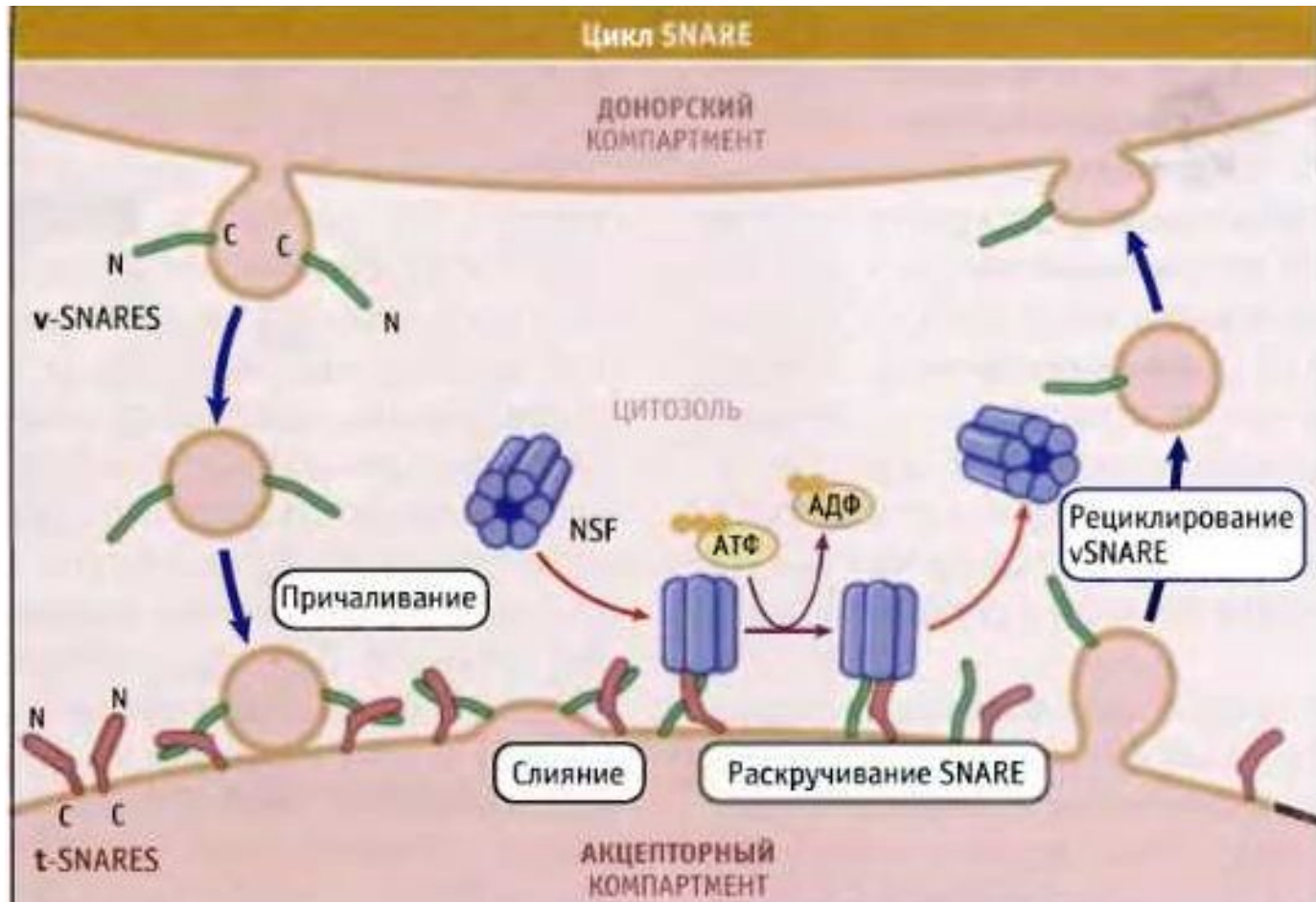
2. Везикулярный транспорт



2. Везикулярный транспорт

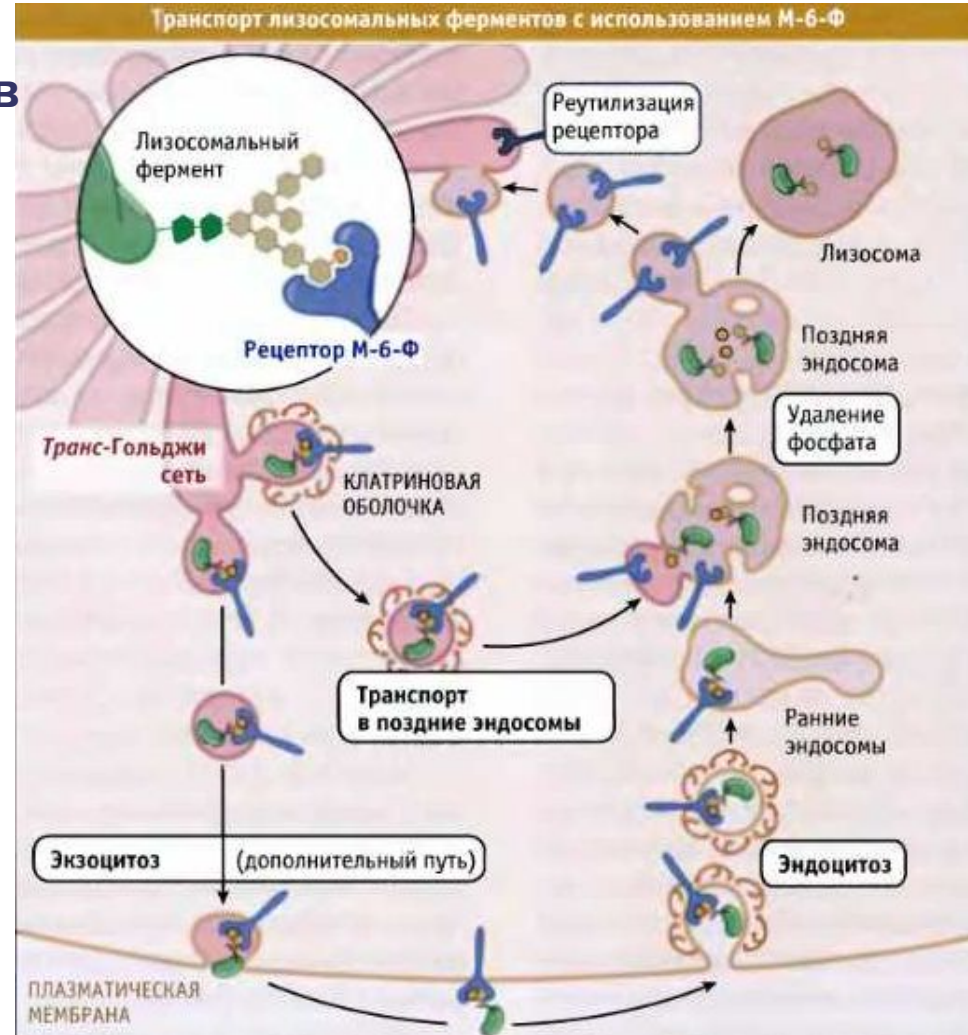
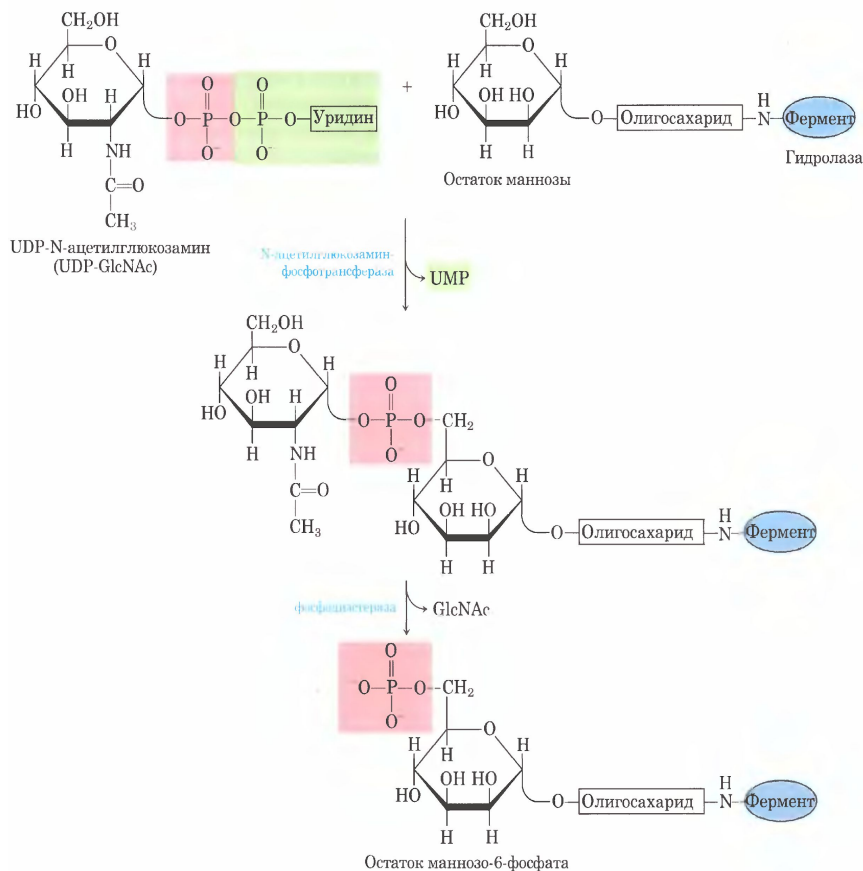


2. Везикулярный транспорт



2. Везикулярный транспорт

Транспорт лизосомальных ферментов



2. Везикулярный транспорт

Транспорт белков в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза

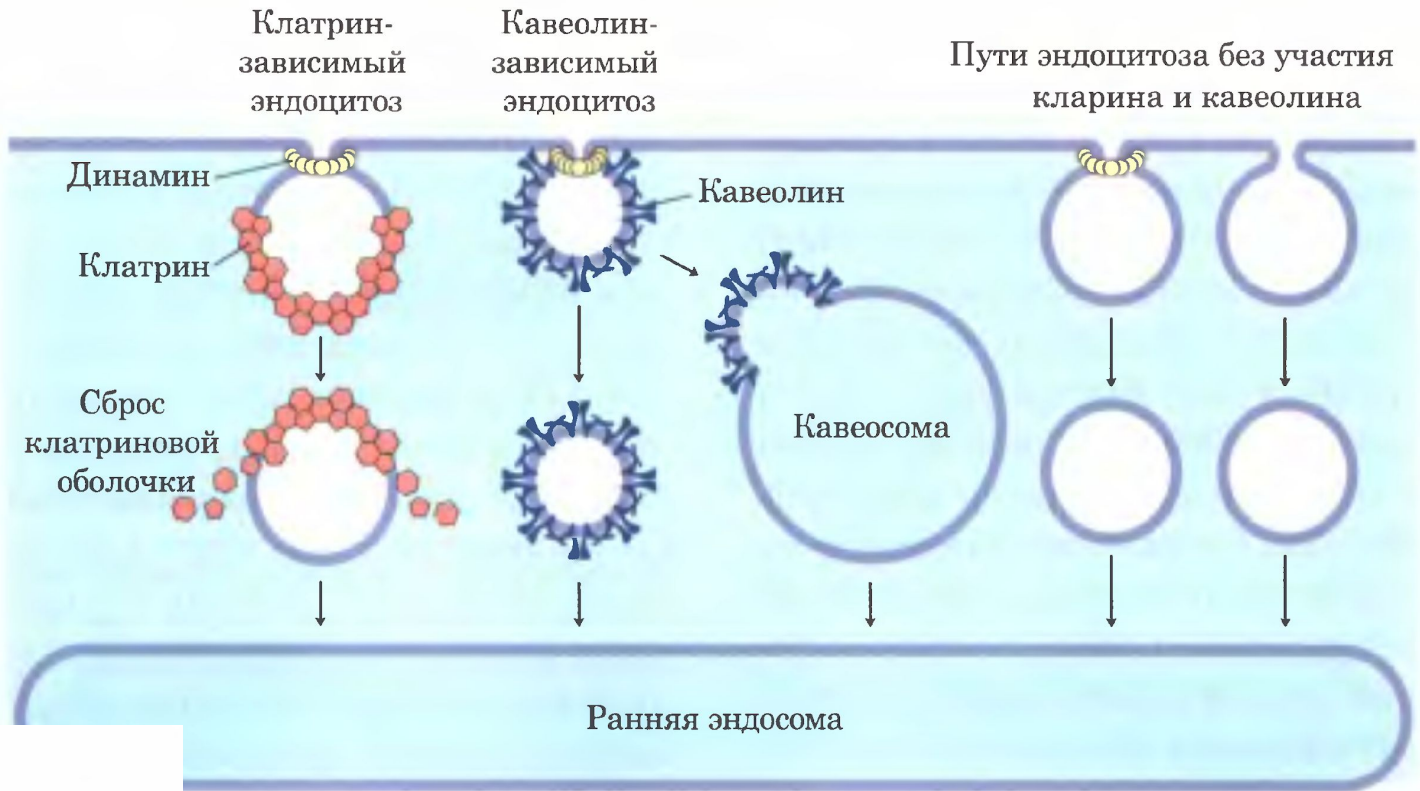


Рис. 27-45. Пути эндоцитоза в эукариотических клетках. В путях, зависимых от клатрина или кавеолина, везикулы отделяются от плазматической мембраны с помощью GTPазы динамина. В других путях не участвуют ни кавеолин, ни клатрин, а динамин может быть задействован или нет.