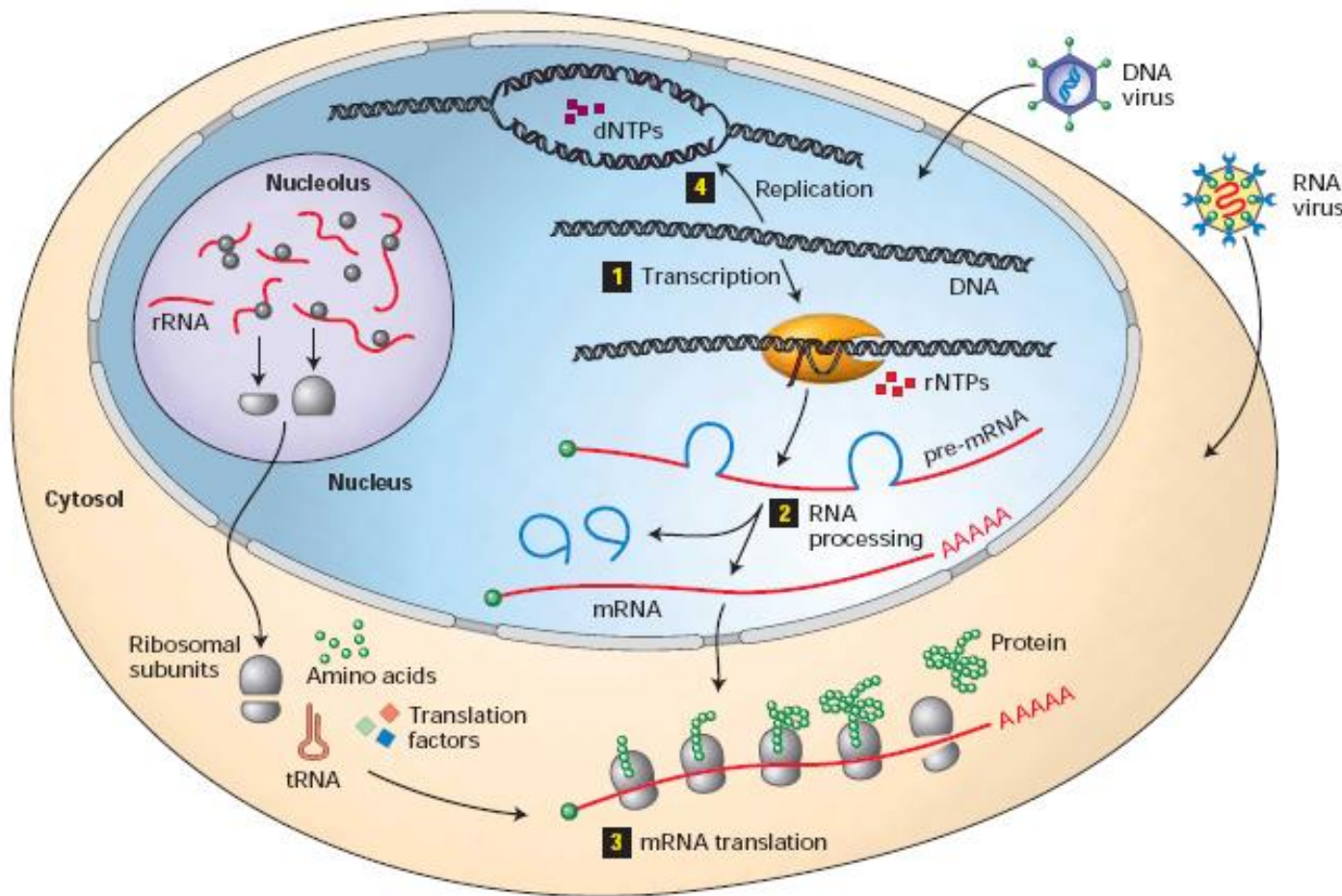


# SINTEZA PROTEINA

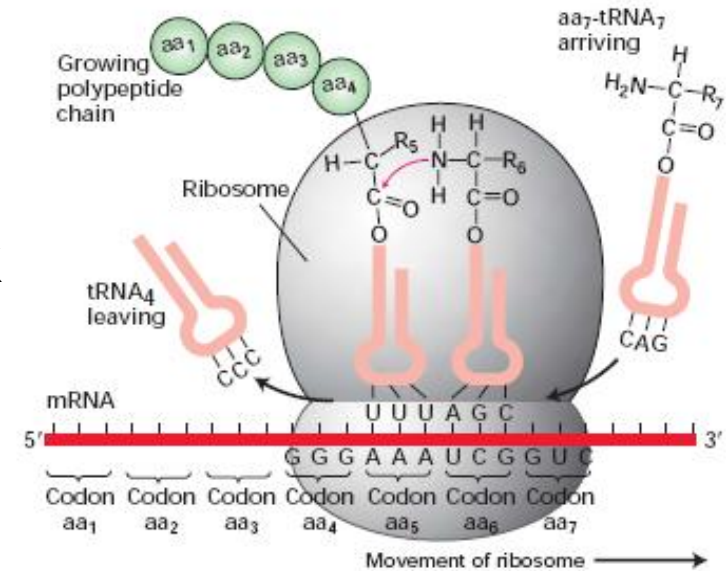
# Procesi u ćeliji koji dovode do sinteze proteina



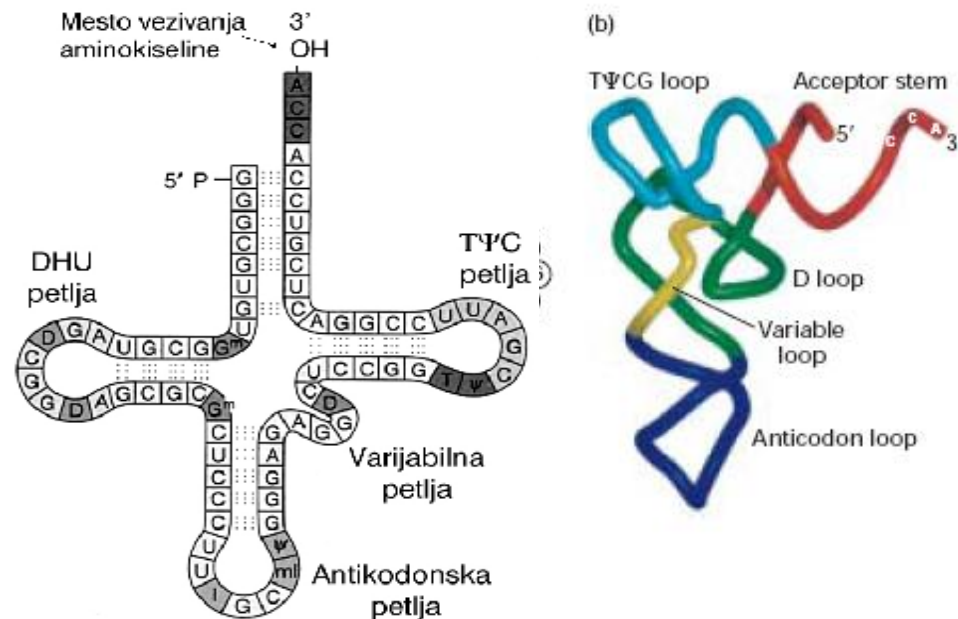
Transkripcija DNK  
Obrada RNK  
Translacija

# Tri uloge RNK u translaciji

1. **Informaciona RNK (iRNA)** prenosi genetsku informaciju prepisanu sa DNK u obliku trinukleotidnih sekvenci, kodona, od kojih svaki određuje specifičnu AK
2. **Transportna RNK (tRNK)** - dešifruje kodone u iRNK - svaki tip AK ima svoj subset tRNK, koja vezuje AK i prenosi je na rastući kraj polipeptidnog lanca ukoliko to traži sledeći kodon u iRNK. Svaka tRNK koja "nosi" AK sadrži antikodon, komplementaran kodonu u iRNK.
3. **Ribozomalna RNK (rRNK)** učestvuje u stvaranju ribozoma, koji se fizički pomeraju duž molekula iRNK, katališe udruživanje AK u polipeptidne lance. Takođe vezuju tRNK i različite pomoćne proteine neophodne za sintezu proteina. Ribozomi se sastoje od velike i male subjedinice, od kojih svaka sadrži svoj(e) rRNK molekul(e).

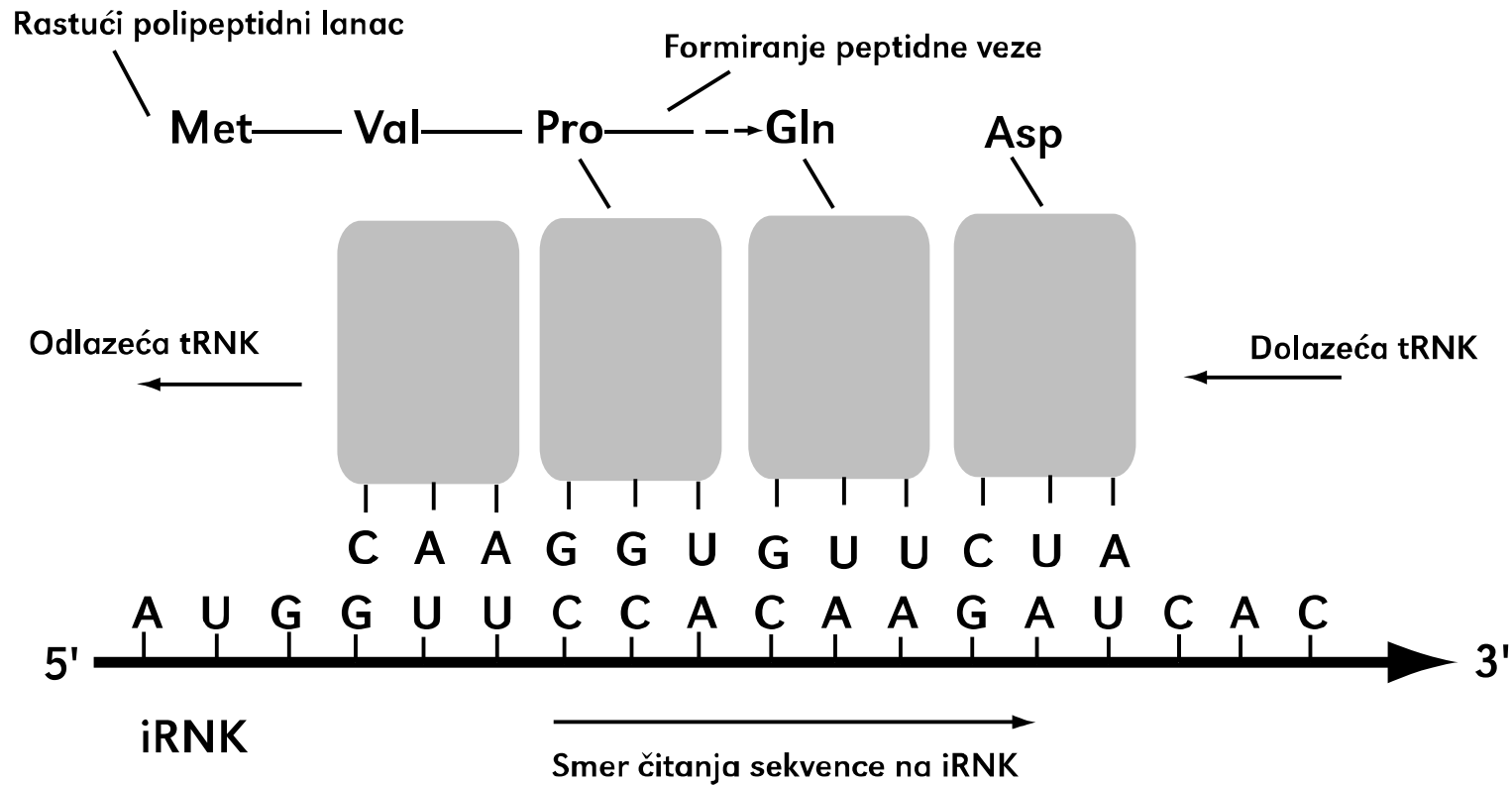


Funkcija tRNK (duge 70-80 nukleotida), zavisi od 3D strukture. U rastvoru, sve tRNK zauzimaju sličan oblik.



U svim tRNK, na 3' kraju se nalazi mesto vezivanja AK sa sekvencom CCA, koja se obično dodaje nakon završene sinteze i obrade tRNK. Neke od baza u većini tRNK se takođe modifikuju nakon sinteze.

# Prevođenje šifre baza NK u sekvencu AK proteina



Translacija - prevođenje šifre baza nukleinskih kiselina u sekvencu AK u proteinu. Translacioni sistem čine ribozomi, tRNA, aminoacil tRNA sintetaza i faktori inicijacije, elongacije i terminacije

# Za većinu AK postoje 2 ili više kodona (tj. genetski kod je degenerisan)

	Prva pozicija (5' kraj)	Druga pozicija			Treća pozicija (3' kraj)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	<b>STOP</b>	<b>STOP</b>	A
	Leu	Ser	<b>STOP</b>	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

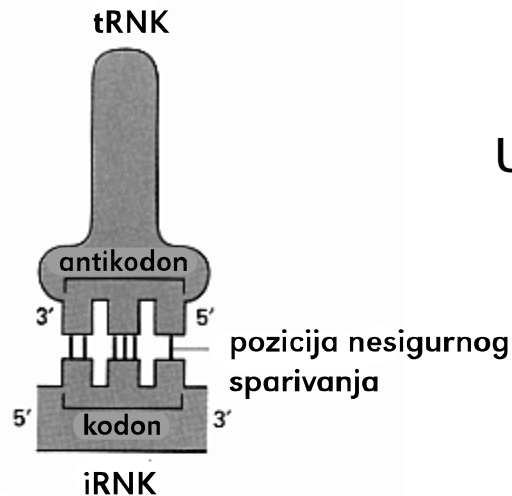
## Amino kiseline i njima odgovarajući kodoni

Alanin (Ala): GCU, GCC, GCA, GCG  
 Arginin (Arg): CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG  
 Asparagin (Asp): AAU, AAC  
 Aspartat (Asp): GAU, GAC  
 Cistein (Cys): UGU, UGC  
 Glutamat (Glu): GAA, GAG  
 Glutamin (Gln): GAA, CAG  
 Glicin (Gly): GGU, GGC, GGA, GGG  
 Histidin (His): CAU, CA  
 Izoleucin (Ile): AUU, AUC, AUA

Leucin (Leu): CUU, CUC, CUA, CUG, UUA, UUG  
 Lisin (Lys): AAA, AAG  
 Metionin (Met): AUG  
 Fenilalanin (Phe): UUU, UUC  
 Prolin (Pro): CCU, CCC, CCA, CCG  
 Serin (Ser): AGU, AGC, UCU, UCC, UCA, UCG  
 Treonin (Thr): ACU, ACC, ACA, ACG  
 Triptofan (Trp): UGG  
 Tirozin (Tyr): UAU, UAC  
 Valin (Val): GUU, GUC, GUA, GUG

Start kodon  
(NH<sub>2</sub> kraj  
polipeptida)

# Hipoteza nesigurnog sparivanja



U mnogim ćelijama se nalazi **manje od 61 tRNK** – zato što **jedan antikodon na tRNK** može da prepozna **više** (ali ne nužno svaki od) **kodona** koji odgovara toj AK. Ova mogućnost “šireg” prepoznavanja postoji zahvaljujući nestandardnom sparivanju baza na tzv. nesigurnom položaju

**Baza na trećoj (nesigurnoj) poziciji u kodonu na iRNK često može da se upari na nestandardan način sa bazom na prvoj (nesigurnoj) poziciji u antikodonu na tRNK.**

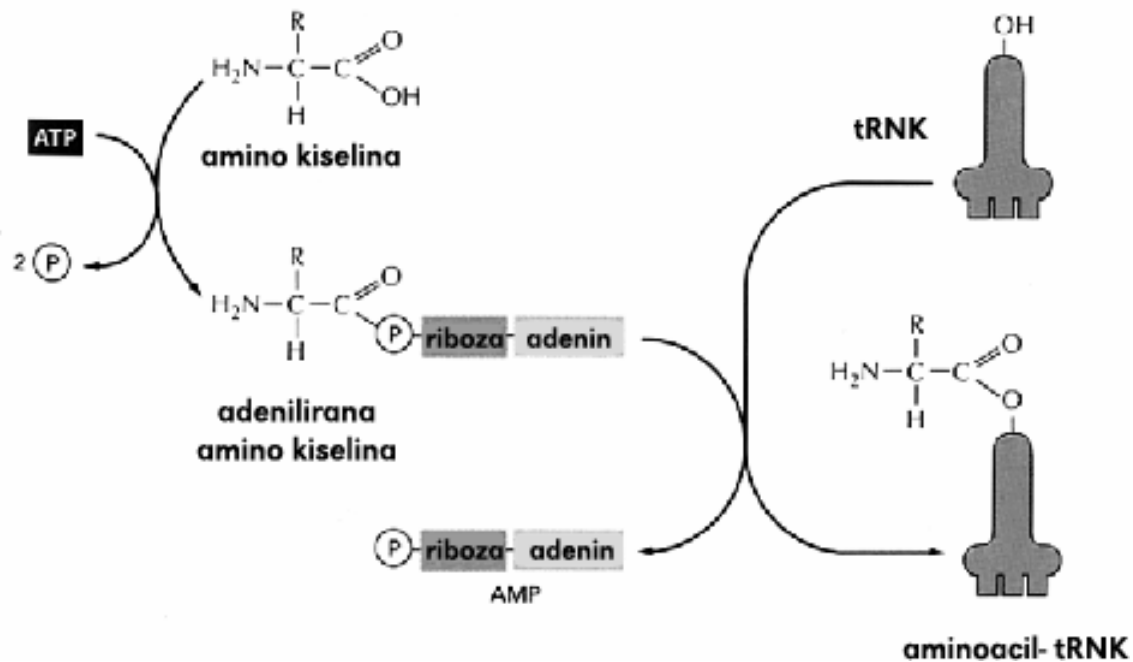
Eukariote

Nesigurna baza kodona	Moguće baze antikodona
U	G ili I
C	G ili I
A	U
G	C

Tako jedan antikodon može da prepozna više različitih kodona zahvaljujući neuobičajenom sparivanju baze na 3' kraju kodona i naspramne baze (na položaju 5') antikodona

tRNK koja sadrži I (inozin) na nesigurnoj poziciji može biti “uparena” sa tri različita kodona (U,C,A), dok se tRNK sa G ili U u nesigurnoj poziciji može “upariti” sa dva kodona (C,U tj A,G).

# AK se specifično vezuju za odgovarajuće tRNK



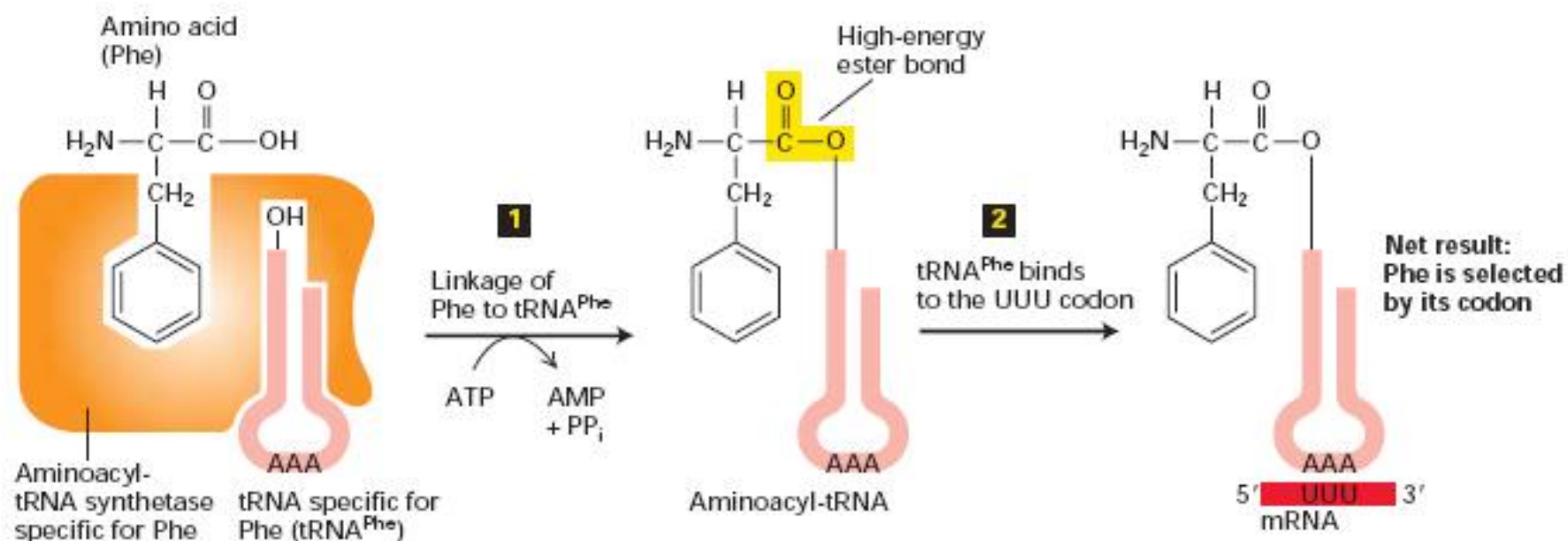
Prepoznavanje kodon(a) koji određuju datu AK od strane specifične tRNK čini drugi korak u dekodiranju genetske informacije.

Svaka od 20 različitih sintetaza prepoznaje *jednu* AK i sve njoj odgovarajuće tRNK.

AK se pre vezivanja sa tRNK aktivišu  
Aktivaciju katališu specifične aminoacil-tRNK sintetaze  
Aminoacil tRNK sa vezanom AK prepoznaje odgovarajuću tRNK sa visokom specifičnošću



# Aminoacil-tRNK sintetaze aktivišu AK, kovalentno ih povezujući sa tRNK



Korak 1: Aminoacil-tRNK sintetaza vezuje specifičnu AK, preko energijom bogate veze (žuto), za hidrosilnu grupu u položaju 3` (hidrosilna grupa krajnjeg adenzina) odgovarajuće tRNK

Korak 2 : Antikodon tRNK se zatim sparuje sa komplementarnim kodonom na iRNK koji je specifičan za datu AK. Ukoliko dođe do greške u bilo kojem od koraka, u polipetidni lanac se može uključiti pogrešna AK.

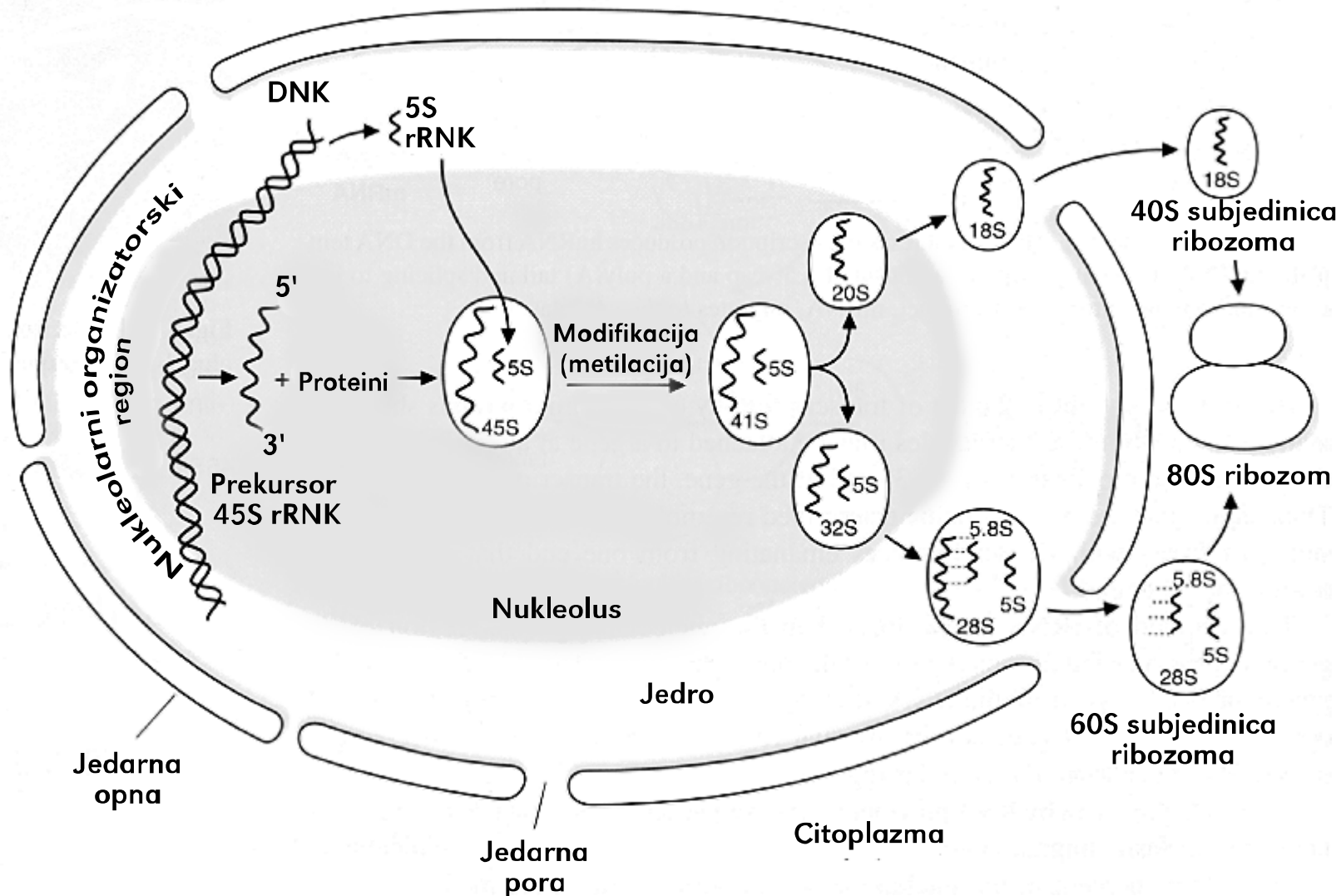
AK je vezana za tRNK visokoenergetskom vezom i stoga je *aktivisana*. Energija ove veze obezbeđuje energiju za sintezu peptidne veze u rastućem polipeptidnom lancu.

Usled strukturne sličnosti AK, *aminoacil-tRNK sintetaze* mogu da naprave grešku. Greške ispravljaju sami enzimi koji imaju sposobnost *prepoznavanja i ispravljanja grešaka* što omogućava proveru da li se prava AK vezala za njen "džep" , mesto za vezivanje AK.

Ukoliko se pogrešna AK veže za tRNK, ta ista sintetaza katališe uklanjanje pogrešne AK sa tRNK. Ova važna uloga omogućava da tRNK "donese" pravu AK mašineriji koji vrši sintezu proteina.

Ukupna greška za translaciju kod *E. coli* je niska, približno 1 na 50,000 kodona, što pokazuje značaj korektivne uloge aminoacil-tRNA sintetaze.

# Sinteza proteina se odvija na ribozomima



Efikasnost translacije se višestruko povećava vezivanjem iRNK i pojedinačnih aminoacil-tRNK za ribozome, koji usmeravaju elongaciju polipeptida brzinom dodavanja od 3 do 5 AK u sekundi

# Zaključak- aktivacija amino kiseline i “čitanje” iRNK

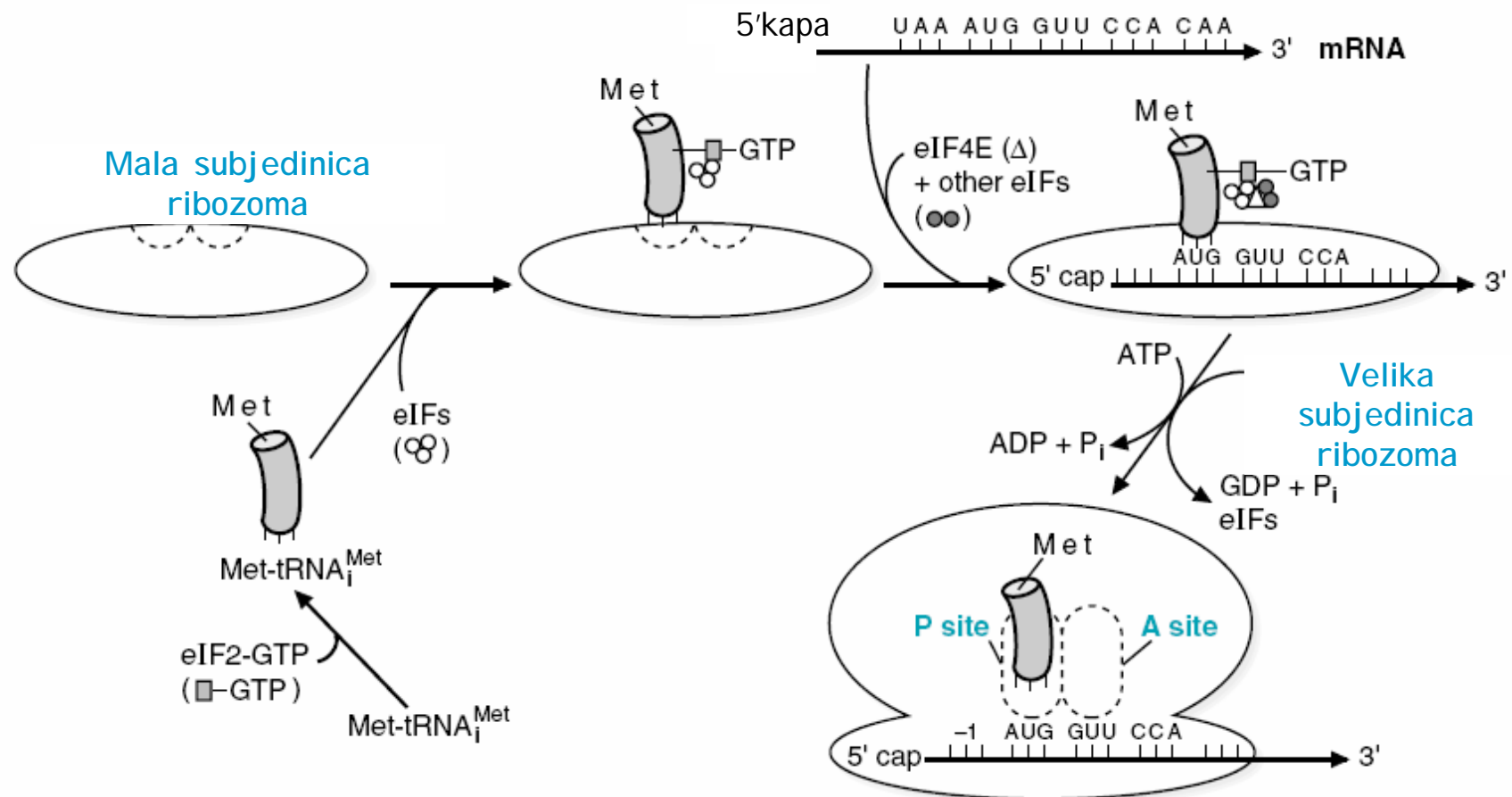
- Genetska informacija se prepisuje sa DNK na iRNK u obliku kontinuiranog, preklapajućeg, degenerisanog genetskog koda koji čine tripleti nukleotida
- Svaku AK kodira jedan ili više trinukleotidnih sekvenci (kodona) u iRNK. Svaki kodon precizira jednu AK, ali najveći broj AK ima više od jednog kodona.
- Kodon AUG za metionin je uobičajeni start kodon, koji određuje AK na NH<sub>2</sub>-kraju polipeptidnog lanca. Tri kodona (UAA, UAG, UGA) imaju ulogu stop kodona.
- *A reading frame*, neprekinuti redosled kodona u iRNK od specifičnog start kodona do stop kodona, “prevodi” se u linearnu sekvencu AK u polipeptidnom lancu.
- Za dekodiranje nukleotidne sekvence u iRNK u sekvencu AK u proteinu potrebni su i odgovarajuće tRNK i aminoacil-tRNK sintetaze.
- Sve tRNK imaju sličnu 3D strukturu koja podrazumeva akceptorsko mesto za vezivanje specifične AK i antikodonsku petlju. Antikodon se komplementarno sparuje se odgovarajućim kodonom u iRNK.

- Usled ne-standardnih interakcija, tRNK se može komplemetarno upariti sa više od jednog kodona na iRNK; slično tome, određeni kodon se može komplemetarno upariti sa više tRNK. I pak, samo odgovarajuće AK se uključuje u rastući polipeptidni lanac
- Svaka od 20 aminoacil-tRNK sintetaza prepoznaje određenu AK i kovalentno je vezuje za odgovarajuću tRNK, gradeći aminoacil-tRNK. U ovoj reakciji se AK aktivše, tako da može učestvovati u formiranju peptidne veze.
- Ribozomi—veliki kompleksi ribonukleoproteina na kojima se odvija translacija— se sastoje od velike i male subjedinice. Svaka subjedinica sadrži mnoge različite proteine i jedan glavni molekul rRNK (veliki ili mali). Velika subjedinica sadrži i dve pomoćne rRNK (5S i 5.8S kod kičmenjaka).
- rRNK iz različitih vrsta se uvijaju u slične 3D struture koje sadrže brojne petlje i vezna mesta za proteine, iRNK, i različite tRNK.

Translacija se odvija u tri stepena:

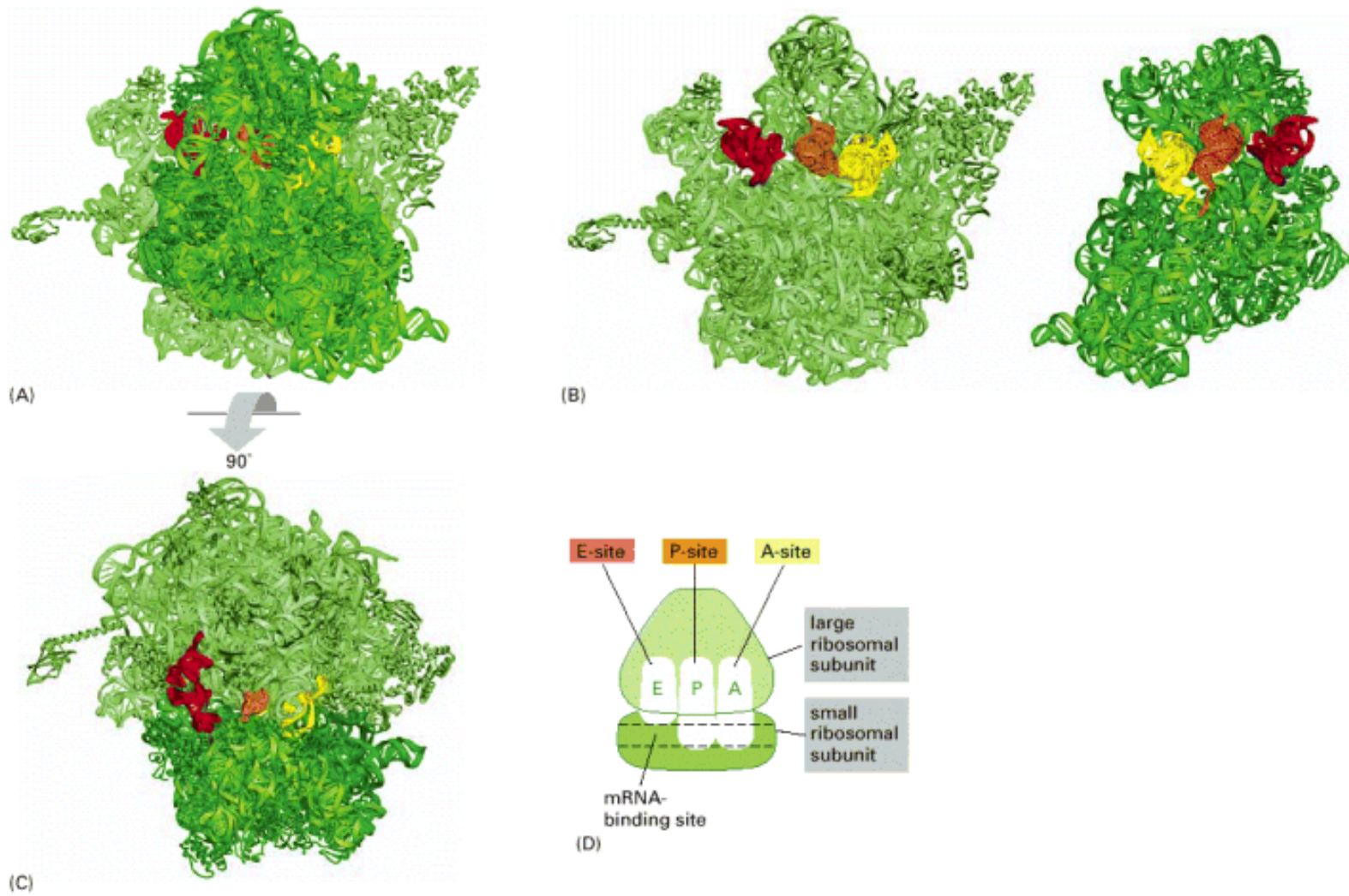
1. Inicijacija
2. Elongacija
3. Terminacija

# Inicijacija sinteze proteina



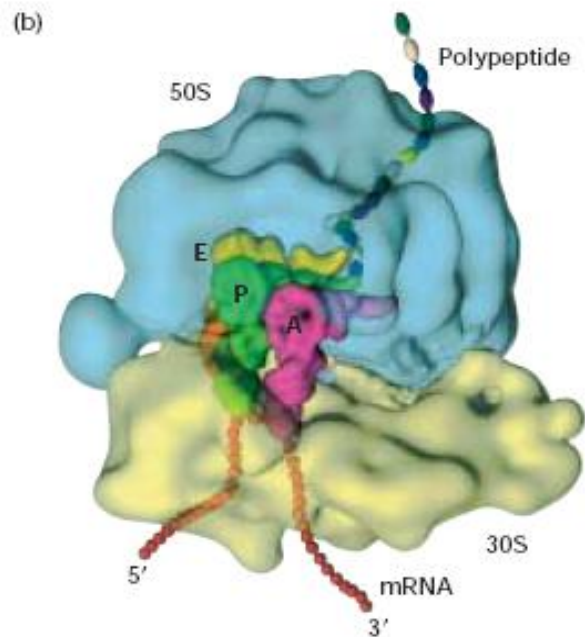
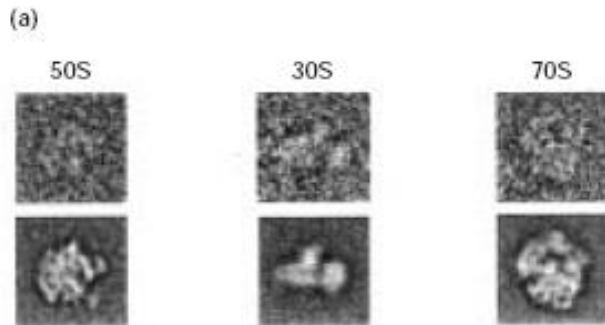
Kod eukariota, inicijacija translacije uključuje nastajanje kompleksa koji čine metionin-tRNK<sup>Met</sup>, iRNK i ribozom

# RNK vezujuća mesta na ribozomu





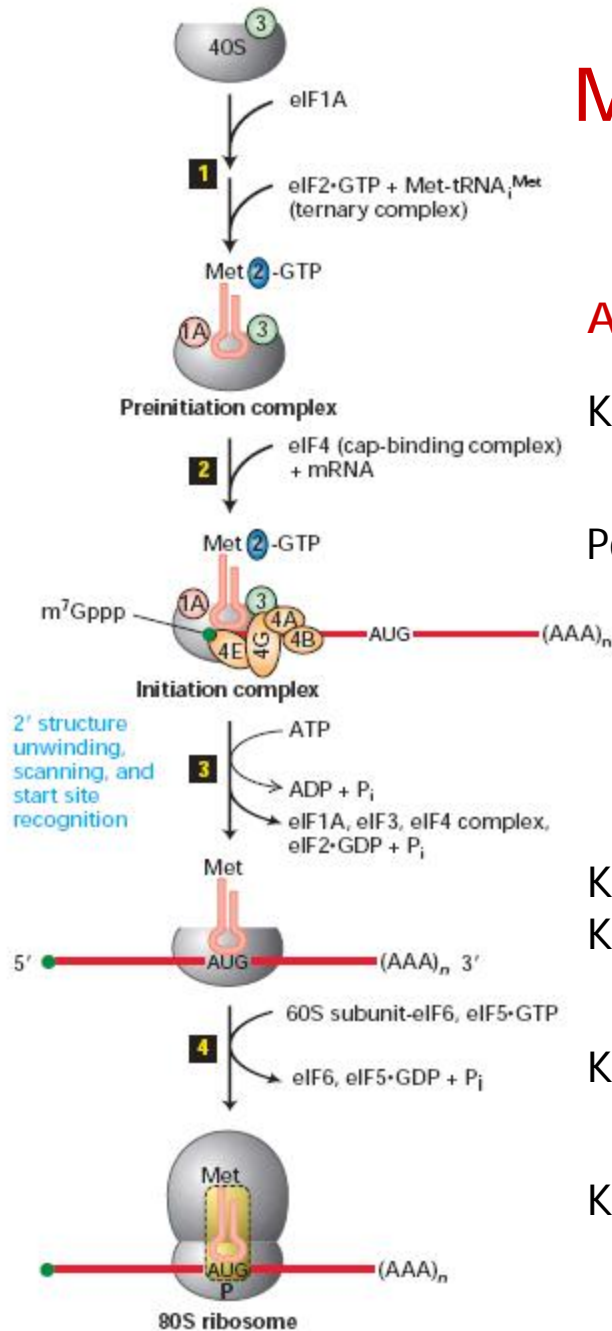
# Prikaz ribozoma *E.coli*



Postoje velike sličnosti u strukturi ribozoma između različitih organizama. Proteini se vezuju za RNK, koje čine oko 60% mase ribozoma

Prikazane su tri tRNK na A (roze), P (zeleno), E (žuto) mestu. Nastajući polipeptidni lanac se nalazi u "tunelu" u velikoj subjednici koji započinje blizu mesta vezivanja AK na tRNK koja je na P mestu.

# Metionil-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> prepoznaje start kodon AUG



**AUG** kodon za metionin predstavlja **start kodon** kod ogromne većine iRNK.

Ključni aspekt inicijacije translacije je početak sinteze proteina na start kodonu, čime se stvara preduslov za tačno "čitanje" celokupne iRNK.

Postoje dve različite metionin tRNK: tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> može da otpočne sintezu proteina, dok tRNA<sup>Met</sup> uključuje metionin u rastući polipeptidni niz. Obe tRNK koriste istu aminoacil-tRNA sintetazu (MetRS). Međutim **samo Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>** (tj., aktivisani metionin vezan za tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>) se može vezati za odgovarajuće mesto na maloj subjedinici ribozoma, **P mesto**, kako bi **otpočela sinteza popipetidnog lanca**. Ostale tRNK se vezuju za drugo mesto na ribozomu, **A mesto**.

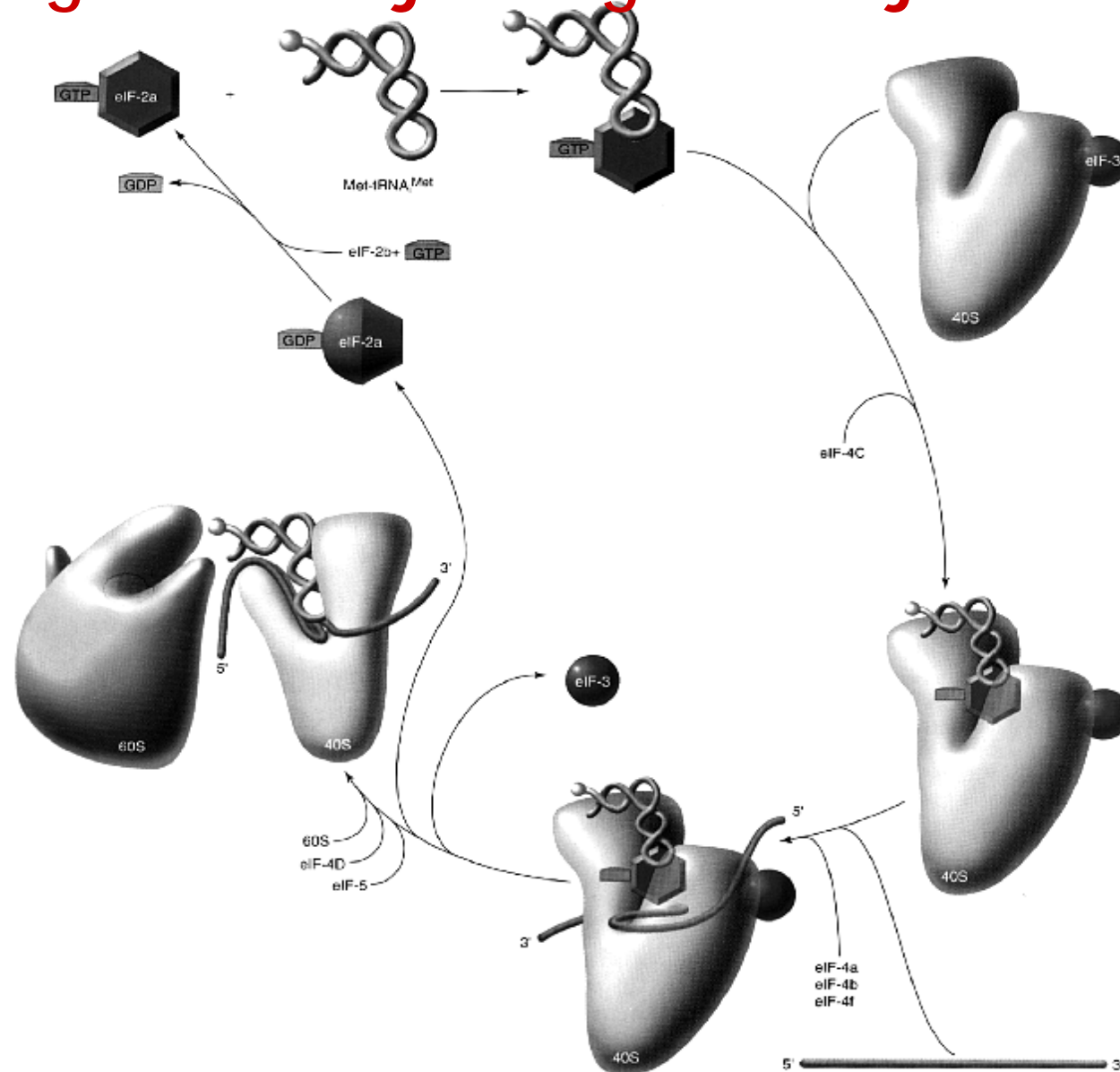
Koraci inicijacije translacije:

Koraci 1 i 2 : Vezivanjem jedne po jedne komponente za kompleks **40S** subjedinice-eIF1A i eIF3 nastaje **inicijacioni kompleks**.

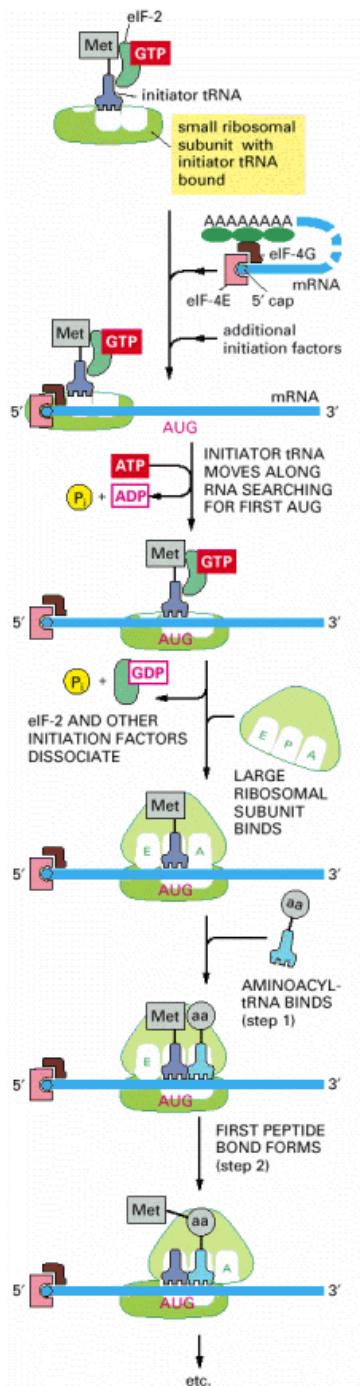
Korak 3: Ovaj kompleks "skenira" i nalazi dovodi **do postavljanja male subjedinice** i vezane **Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>** na mestu **start kodona**.

Korak 4 : Udruživanjem sa velikom (60S) subjedinicom nastaje **80S funkcionalni ribozom** spreman za translaciju iRNK. Dva faktora inicijacije, **eIF2** (korak 1) i **eIF5** (korak 4) su proteini koji vezuju GTP, i upravo njihov GTP podleže hidrolizi tokom inicijacije translacije.

# Inicijacija translacije se obično dešava blizu prvog AUG najbližeg 5' kraju iRNK



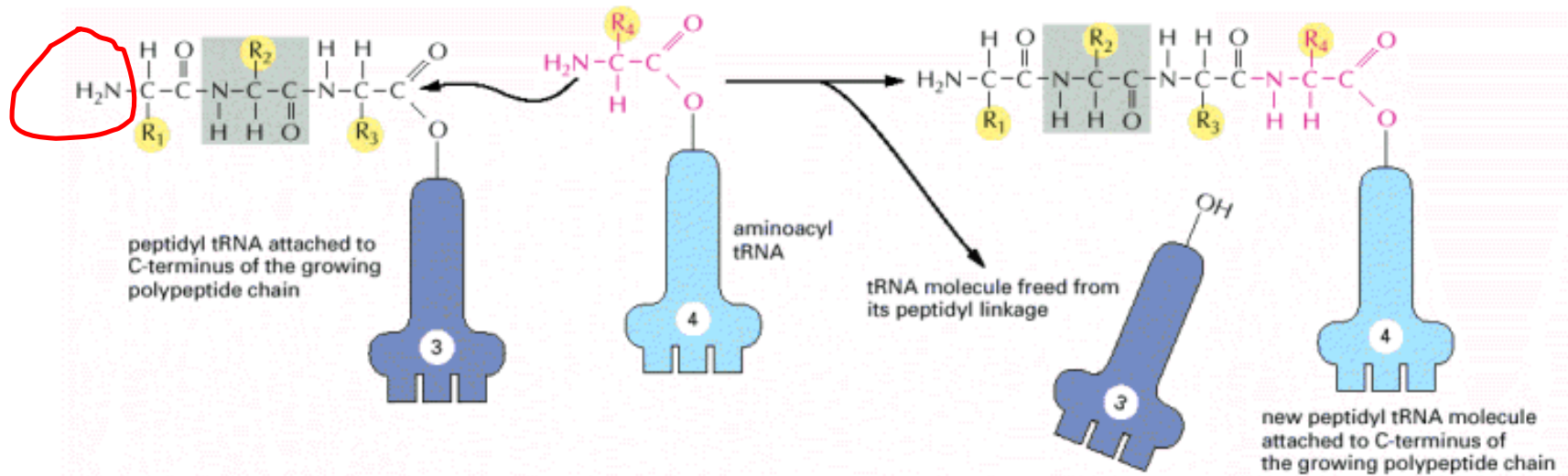
# Inicijacija sinteze proteina u ćeliji eukariota



Prikazana su samo 3 faktora inicijacije, od mnogih, koji su potrebni za ovu fazu sinteze proteina.

Da bi sinteza proteina bila efikasna potreban je i očuvani poli A rep iRNK za koji su vezani poliA vezujući proteini koji intereaguju sa eIF4G. Na ovaj način, mašinerija translacije se osigurava da su oba kraja iRNK intaktna pre inicijacije translacije.

## Ugrađivanje sledeće AK u rastući lanac proteina



Polipeptidni lanac se produžava dodavanjem nove AK na C-terminalni kraj.

Stvaranje peptidne veze je energetski povoljno obzirom da je sam C-terminalni kraj aktiviran kovalentnim povezivanjem molekula tRNK.

Tokom inicijacije translacije, za **5' kapu** iRNK koja se "prevodi" vezuje se **eIF4E** subjedinica eIF4 kapa vezujućeg kompleksa. **iRNK-eIF4** kompleks se udružuje sa kompleksom preinicijacije preko interakcije eIF4G subjedinice i **eIF3**, gradeći **inicijacioni kompleks**.

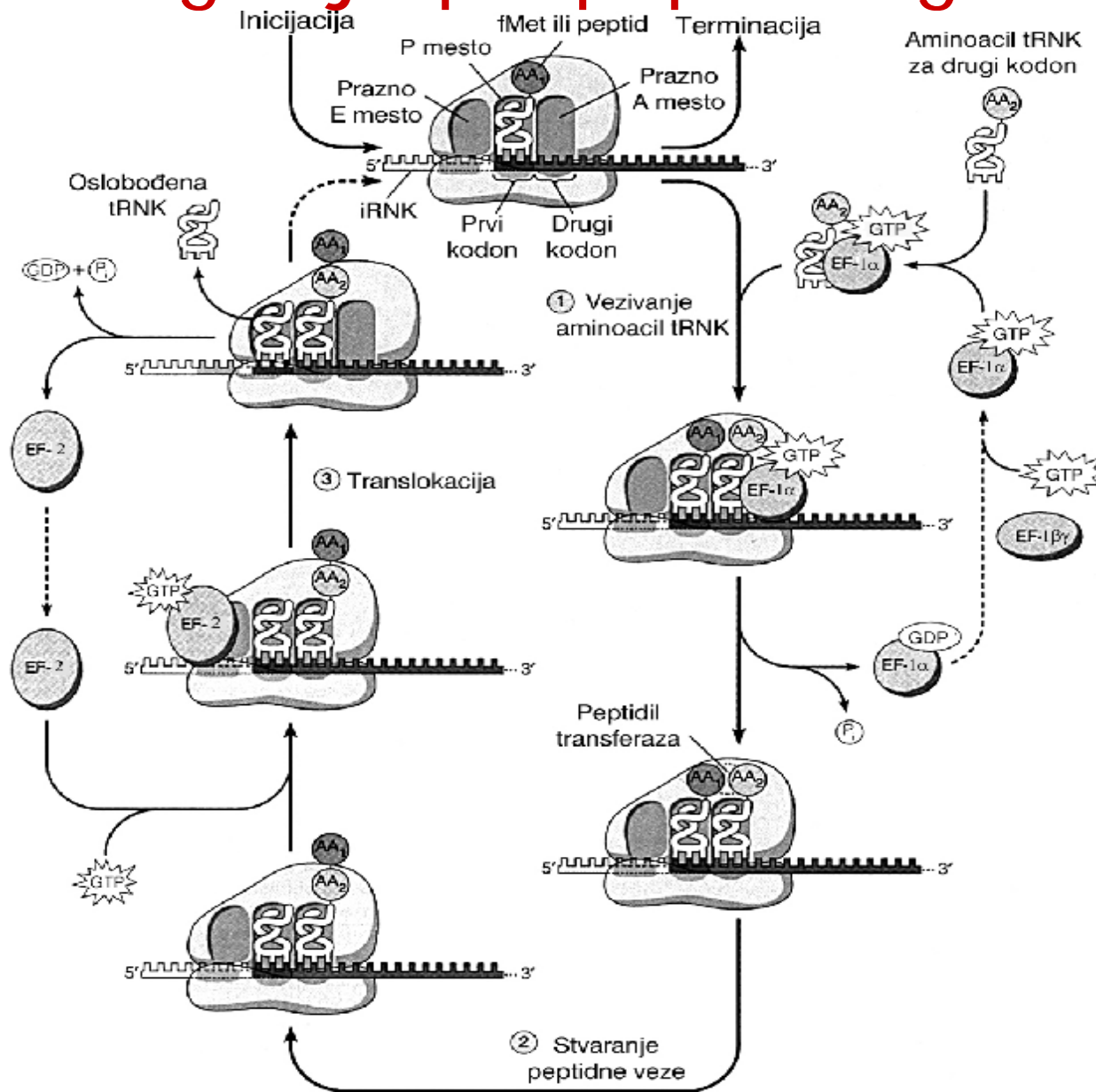
Inicijacioni kompleks "klizi" niz (**skenira**), **iRNK** dok **helikazna** aktivnost **eIF4A** koristi energiju hidrolize ATP-a da **rasplete sekundarnu strukturu iRNK**. Skeniranje prestaje kada **tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>** antikodon **prepozna start kodon**, koji je prvi AUG nishodno od 5' kraja u većini iRNK eukariota. Prepoznavanje start kodona dovodi do hidrolize GTP-a udruženog sa eIF2, ireverzibilan korak koji sprečava dalje skeniranje.

Prepoznavanje početnog AUG olakšavaju specifični nukleotidi koji ga okružuju tzv, **Kozak sekvenca** : (5) **ACCAUGG** (3). A koji prethodi AUG i G koji sledi neposredno iza su najvažniji nukleotidi koji određuju efikasnost inicijacije translacije.

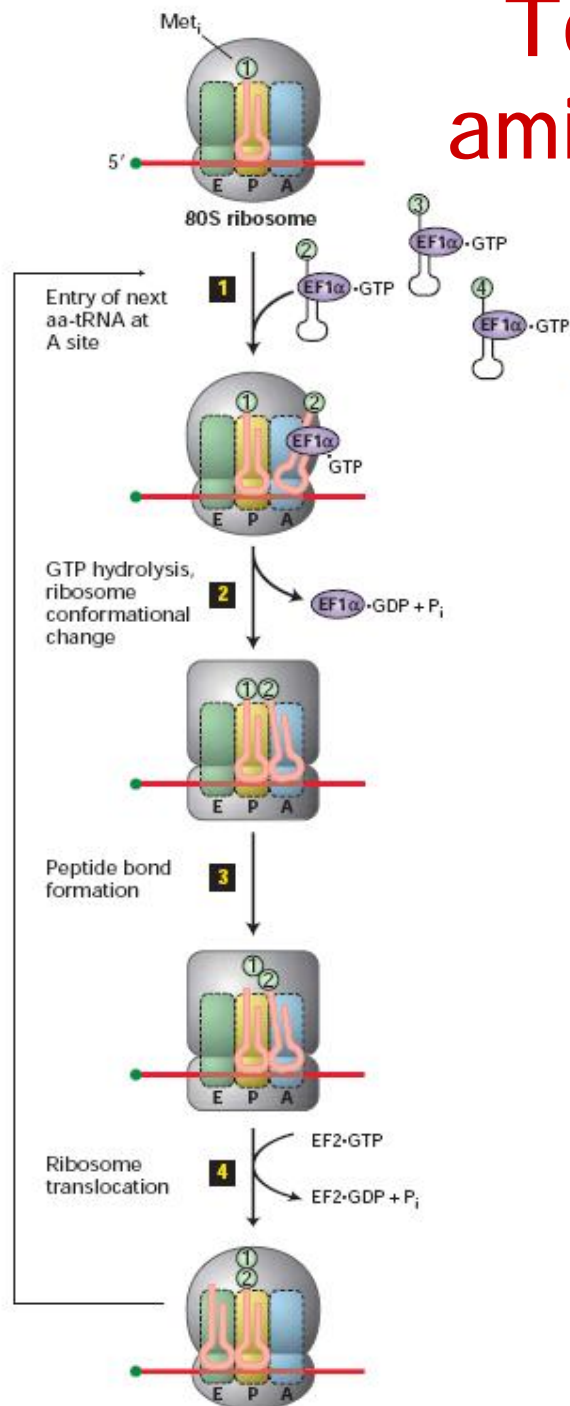
Kada se **mala subjedinica** ribozoma sa vezanom tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> Met tačno **smesti na start kodon**, spaja se sa velikom (60S) ribozomalnom subjedinicom i nastaje 80S ribozom. Za ovo je potreban **eIF5** i hidroliza GTP-a koji je sa njim udružen. Spregnuta reakcija hidrolize GTP-a čini da je ovo ireverzibilan korak, tako da se subjedinice ribozoma ne razdvajaju sve dok se translacija celokupne iRNK i sinteza proteina ne završe.

Tokom elongacije lanca, rastući polipeptidni lanac ostaje vezan za tRNK na P mestu ribozoma.

# Elongacija polipeptidnog lanca



# Tokom elongacije, svaka nova aminoacil-tRNK se kreće kroz 3 mesta na ribozomu



Korak 1: Kada nastane 80S ribozom sa Met-tRNK<sub>i</sub><sup>Met</sup> na P mestu ribozoma, kompleks koji nosi sledeću AK (AK<sub>2</sub>) koju kodira iRNK vezuje se za A mesto.

Korak 2: Hidroliza GTP-a u EF1α GTP dovodi do konformacione promene ribozoma,

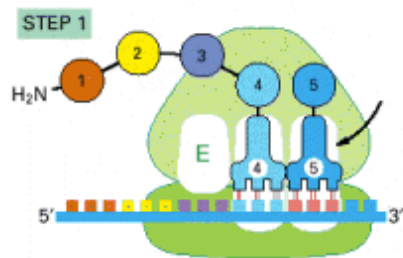
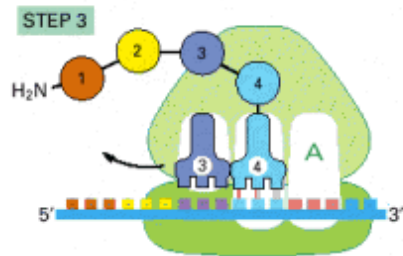
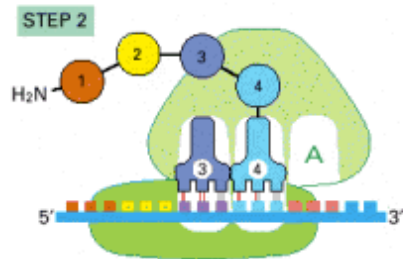
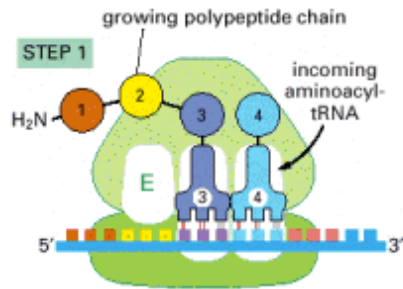
Korak 3: Velika rRNK katališe nastajanje peptidne veze između Met<sub>i</sub> i AK<sub>2</sub>.

Korak 4 Hidroliza GTP-a u EF2 GTP dovodi do nove konformacione promene ribozoma koja dovodi do translokacije za jedan kodon niz iRNK, tako da se neacilovana tRNK<sub>i</sub><sup>Met</sup> pomera na E mesto i tRNK sa vezanim dipeptidom prelazi na P mesto.

Ciklus se može ponoviti vezivanjem narednog kompleksa koji nosi AK<sub>3</sub> za slobodno A mesto. U narednim ciklusima elongacije, tRNK na E mestu se izbacuje tokom koraka 2 kao rezultat konformacione promene izazvane hidrolizom GTP-a u EF1α GTP.



# Kretanje molekule iRNK.



Svaka AK koja se dodaje na rastući kraj pp lanca je rezultat komplementarnog sparivanja iRNK i tRNK. Kodon iRNK određuje specifičnost ovog uparivanja.

Korak 1: nova aminoacil tRNK se vezuje za A mesto ribozoma

Korak 2: formira se nova peptidna veza i iRNK se pomera za 3 mesta (kodon) kroz malu subjedinicu

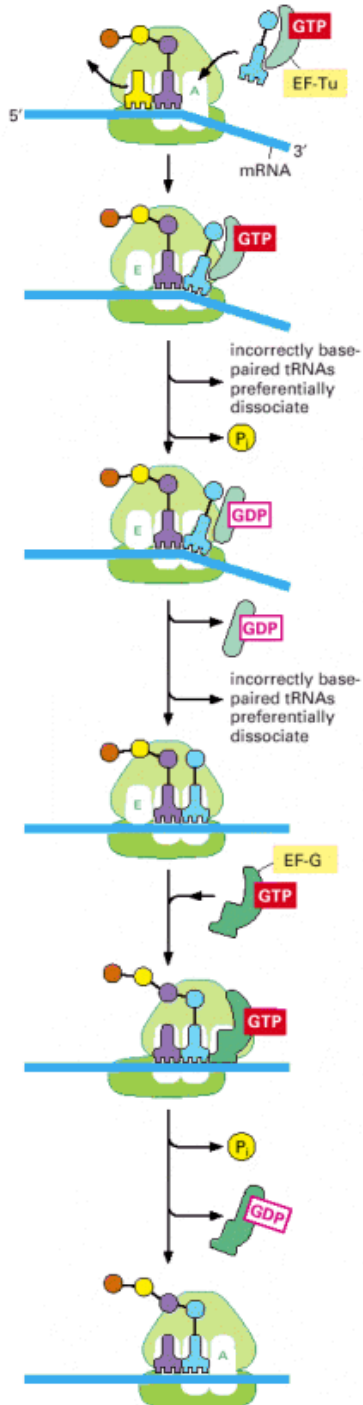
Korak 3. uklanja se iskorišćena tRNK, ribozom se "resetuje" tako da može da se veže sledeća tRNK

I ako se na slici mala subjedinica znatno pomera u odnosu na veliku subjedinicu, u realnosti su ove konformacione promene mnogo manje izražene. Smatra se da one predstavljaju malo rearanžiranje unutar svake subjedinice kao i malo pomeranje između obe subjedinice.

Kao što je i prikazano, iRNK se pomera u 5`-3` smeru, prvo nastaje N-terminalni kraj a AK se dodaju na C-terminalni kraj.

Rastući pp lanac je stalno, tokom elongacije, vezan za P mesto velike subjedinice.

# CIKLUS TRANSLACIJE -prokariote



U inicijalnom koraku , aminoacil tRNK koja je tesno povezana sa EF-Tu se vezuje za kodon na A mestu male subjedinice. Tokom ovog koraka, kodon-antikodon formacija aktivira GTP hidrolizu preko EF-Tu posle čega se on odvaja od aminoacil tRNK, koja sada popunjava A mesto i može dalje da učestvuje u elongaciji. Kašnjenje između vezivanja aminoacil tRNK i njenog uključivanja u sintezu proteina, predstavlja korak kojim se obezbeđuje kontrola translacije.

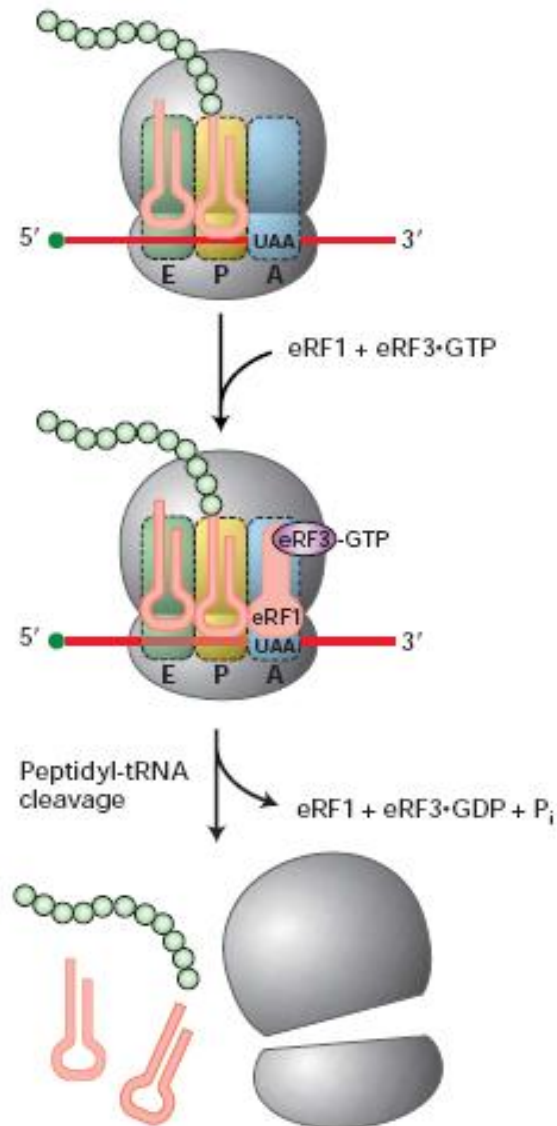
U daljem toku, faktor elongacije EF-G u GTP-vezanoj formi ulazi u ribozom i vezuje se za ili blizu A mesta velike subjedinice, što ubrzava pomeranje dve vezane tRNK iz A/P u P/E hibridno stanje. Kontakt sa ribozomom stimuliše GTP-aznu aktivnost EF-G, što dovodi do znatnih konformacionih promena u EF-G pošto on prelazi iz GTP u GDP-vezanu formu. Ovo dovodi do pomeranja tRNK koja je vezana za A/P hibridno stanje u P-mesto i omogućava napredovanje translacije za jedan kodon.

Hibridna stanja podrazumevaju pozicije koje zauzimaju tRNK između A/P i P/E mesta.

EF-Tu i EF-G su oznake za faktore elongacija bakterija i odgovaraju faktorima elongacije EF-1 i EF-2.

Za svaku formiranu peptidnu vezu molekuli EF-Tu i EF-G se oslobađaju u svojoj inaktivnoj, GDP vezanoj formi. Da bi se ponovo mogli iskoristiti, moraju ponovo preći u GTP vezanu formu. (GTP faktori izmene- *GTP exchange factors*).

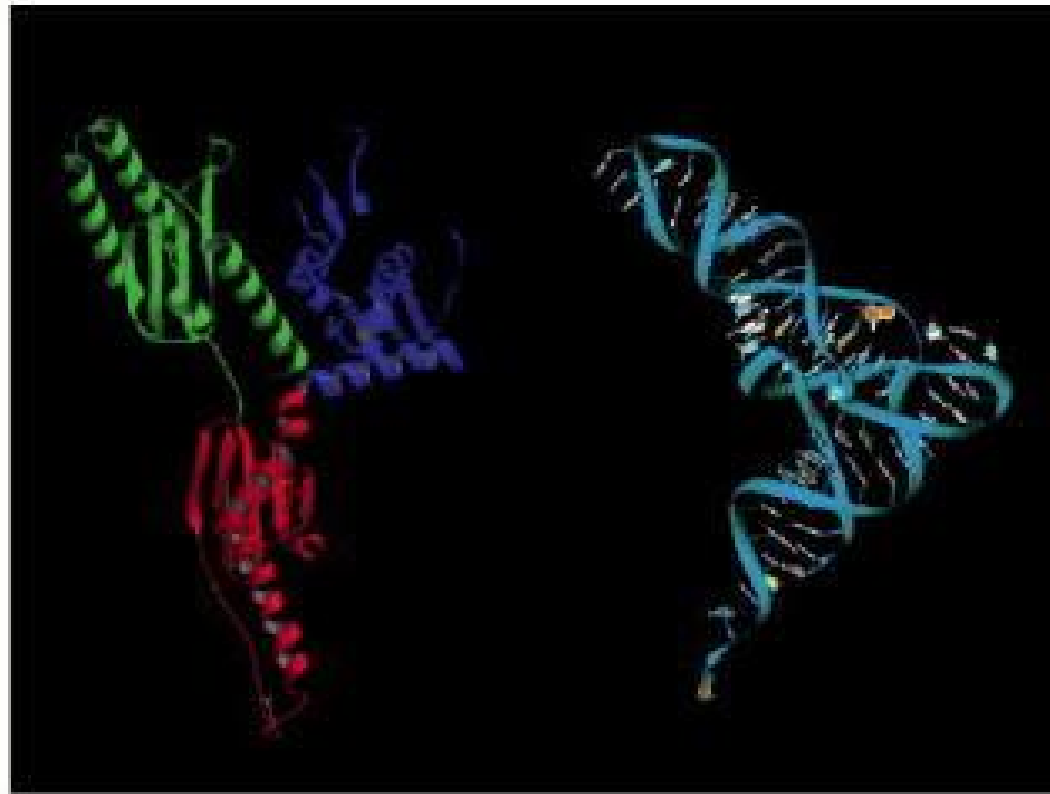
# Translacija se završava delovanjem faktora oslobađanja kada se stigne do Stop kodona



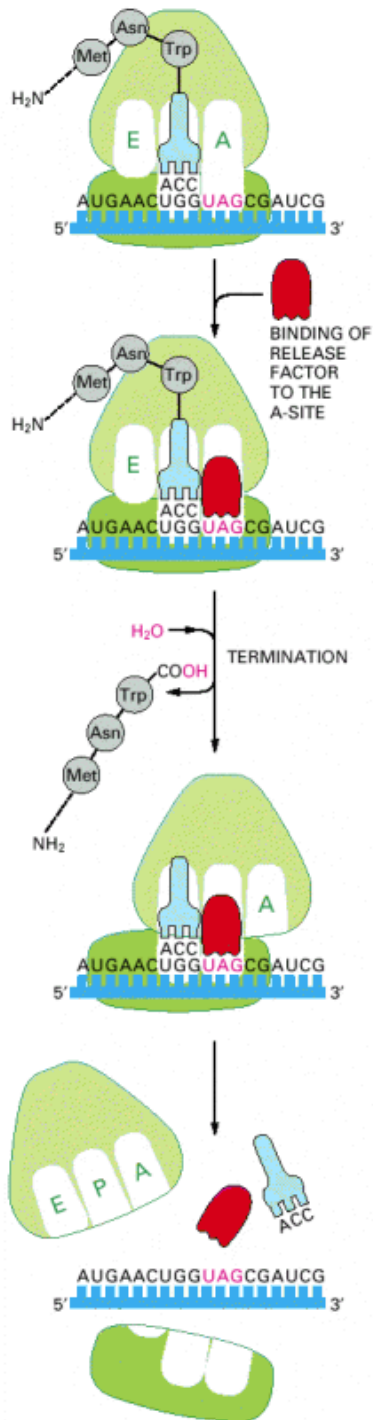
Postoje dva tipa specifičnih faktora oslobađanja:

- **eRF1**, čiji je oblik sličan tRNK, vezuje se za A mestu u direktno prepoznaje stop kodon
- **eRF3** je GTP-vezujući protein. Kompleks eRF3-GTP deluje zajedno sa eRF1 kako bi pospešio cepanje peptidil-tRNK, čime se oslobađa kompletan protein

## Struktura humanog faktora oslobađanja eRF1



sličnost sa molekulom tRNK



## Finalna faza sinteze proteina

Vezivanje oslobađajućeg faktora na A mesto, pošto se na njemu nađe STOP kodon, prekida translaciju. Umesto amino grupe se dodaje voda na peptidil-tRNK čime se vrši hidroliza veze između peptida i tRNK na P mestu.

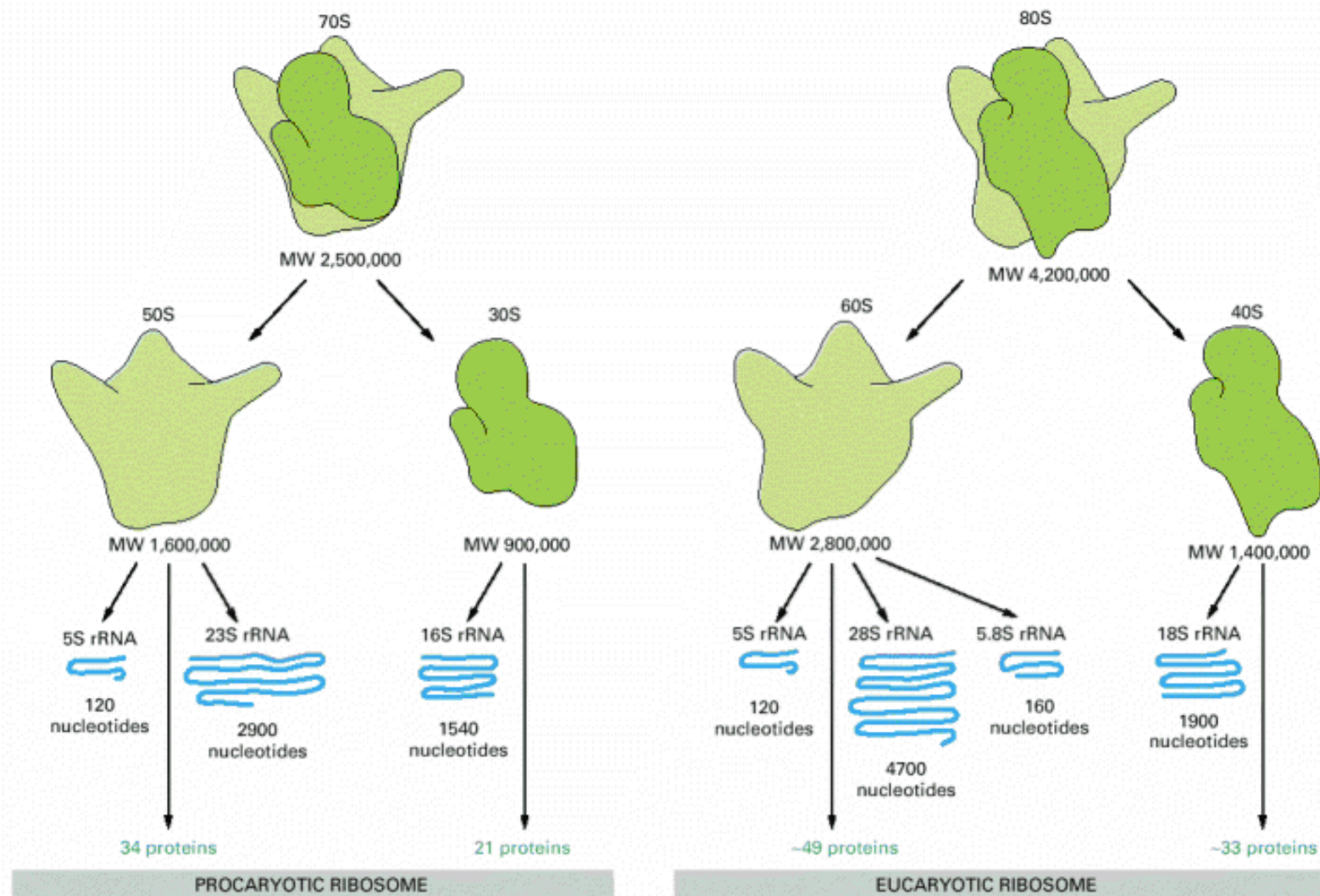
Kompletan pp lanac se oslobađa, i posle delovanja faktora recikliranja ribozoma (*ribosome recycling factor, nije prikazan*), ribozom disosuje na 2 pojedinačne subjedinice

## Ribozomi u citoplazmi ćelije eukariota

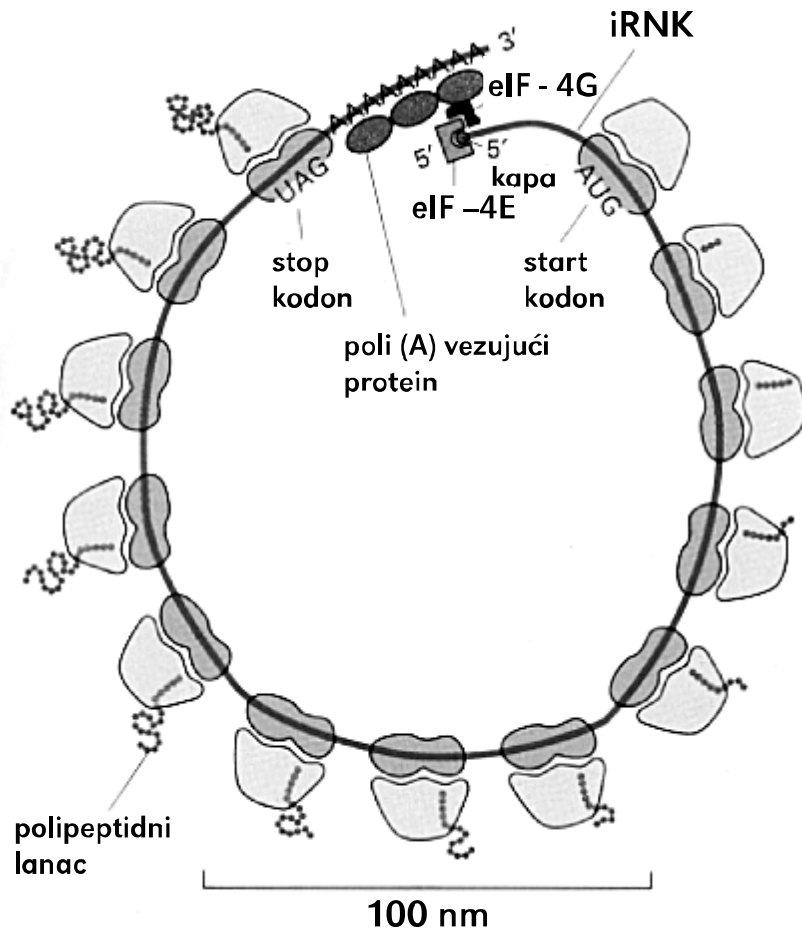


Elektronska mikrografija- neki ribozomi su slobodni u citoplazmi dok su drugi vezani za membranu EPR.

# Upoređivanje strukture ribozoma prokariota i eukariota



# Poliribozom – niz ribozoma vrši translaciju na istom molekulu iRNK

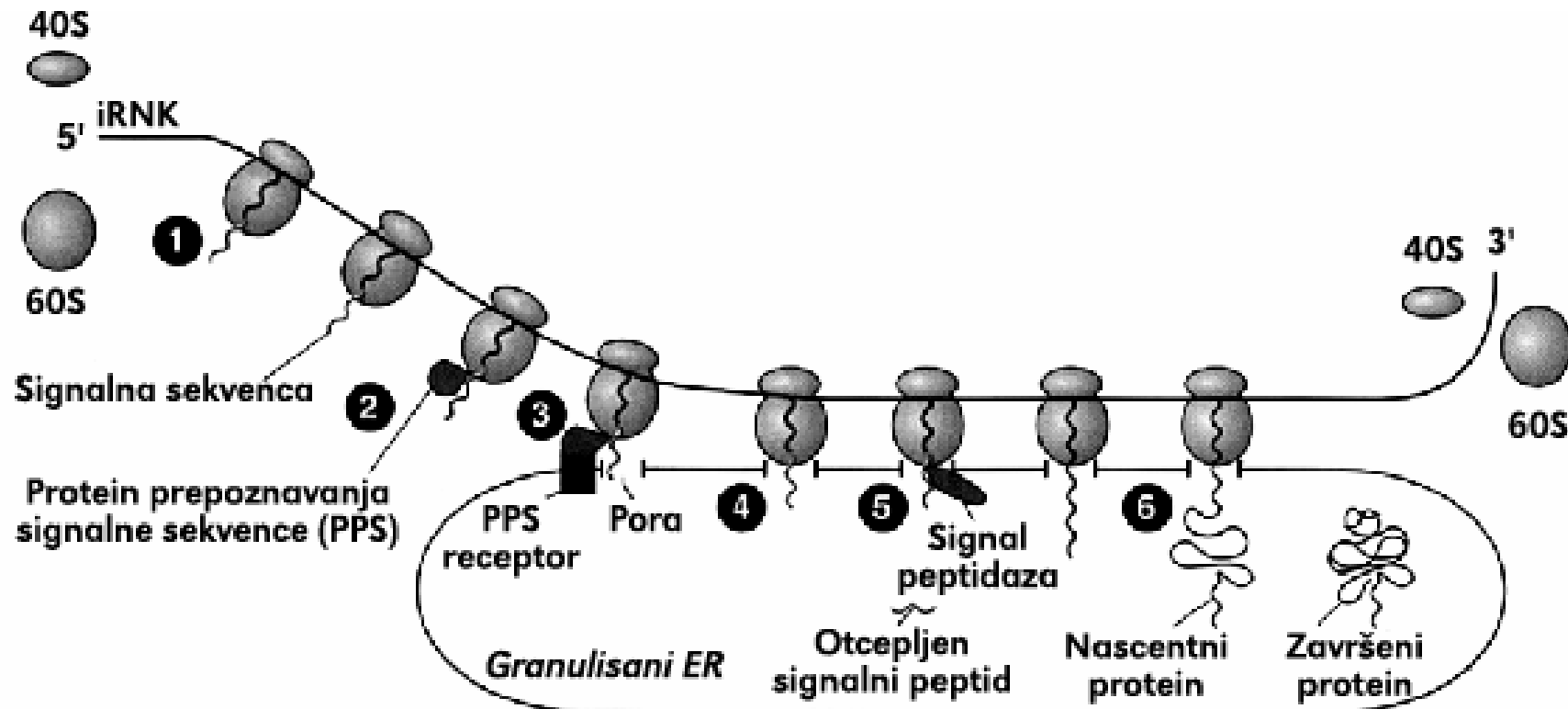


Dva fenomena značajno povećavaju ukupnu brzinu kojom ćelije mogu da sintetišu protein:

- istovremena translacija istog molekula iRNK pomoću multiplih ribozoma (delovanjem poliribozoma)
- brza reciklaža subjedinica ribozoma pošto su se odvojili od 3' kraja iRNK.



# Sinteza proteina na zrnastom endoplazmatskom retikulumu



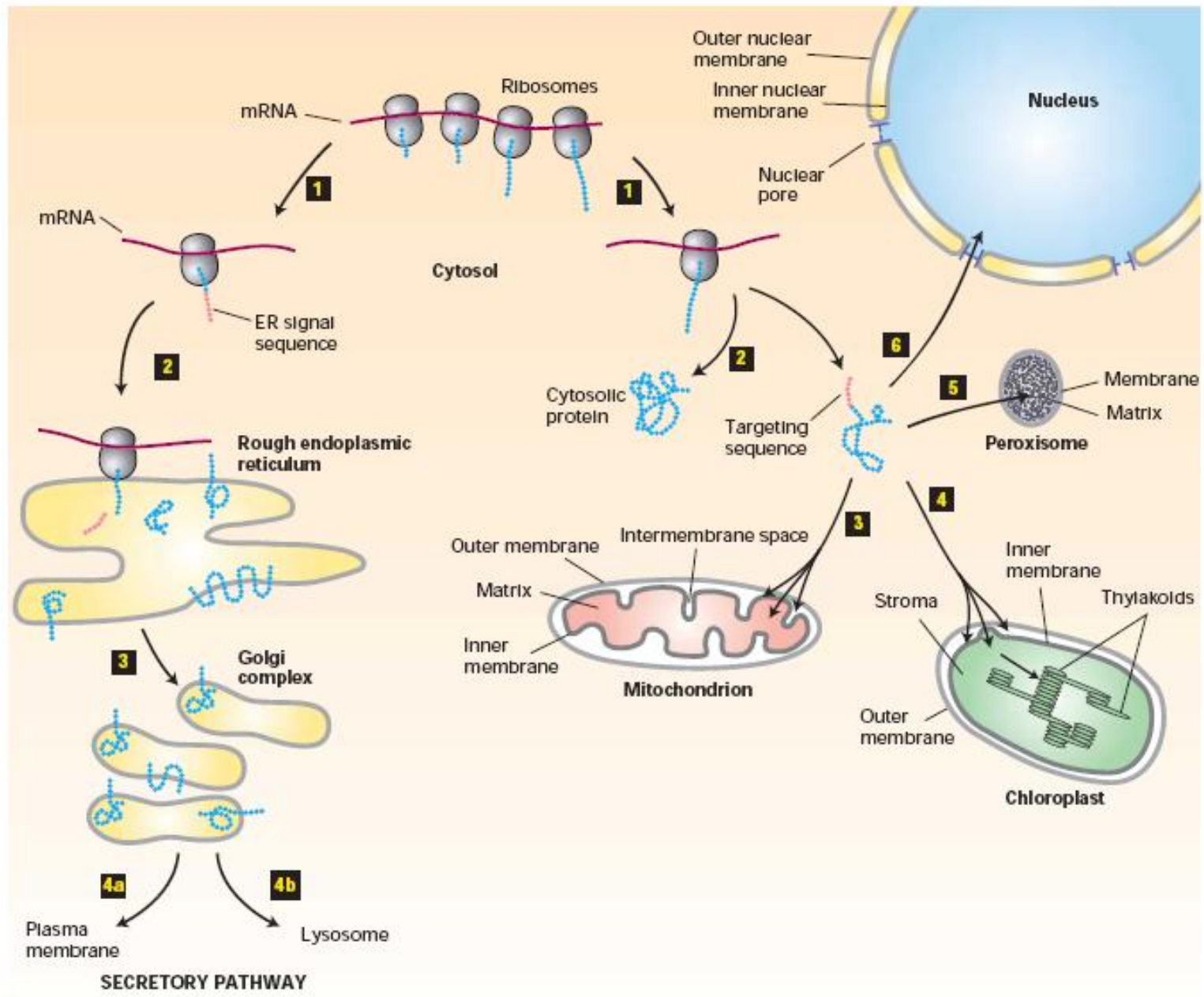
# Zaključak: Sinteza proteina

- Od dve metionin tRNK koje se nalaze u ćelijama, samo jedna ( $tRNK_i^{Met}$ ) učestvuje u inicijaciji translacije.
- Svaka od faza translacije—inicijacija, elongacija lanca, i terminacija—zahteva specifične proteinske faktore uključujući i GTP-vezujuće proteine; GTP hidrolizuje u GDP kada se korak uspešno završi.
- Tokom inicijacije, subjedinice ribozoma se udružuju blizu mesta početka translacije na molekulu iRNK sa tRNK koja nosi amino-terminalni metionin ( $Met-tRNA_i^{Met}$ ) koji je uparen sa start kodonom.
- Elongacija lanca podrazumeva ponavljanje četvorostepenog ciklusa: slabo vezivanje dolazeće aminoacil-tRNK za A mesto na ribozomu; čvrsto vezivanje odgovarajuće aminoacil-tRNK za A mesto udruženo sa oslobađanjem prethodno iskorišćene tRNK sa E mesta; transfer rastućeg peptidil lanca na dolazeću AK što katališe velika rRNK; i translokacija ribozoma na sledeći kodon, pomerajući tako peptidil-tRNK sa A mesta na P mesto i neacilovane tRNK sa P mesta na E mesto.

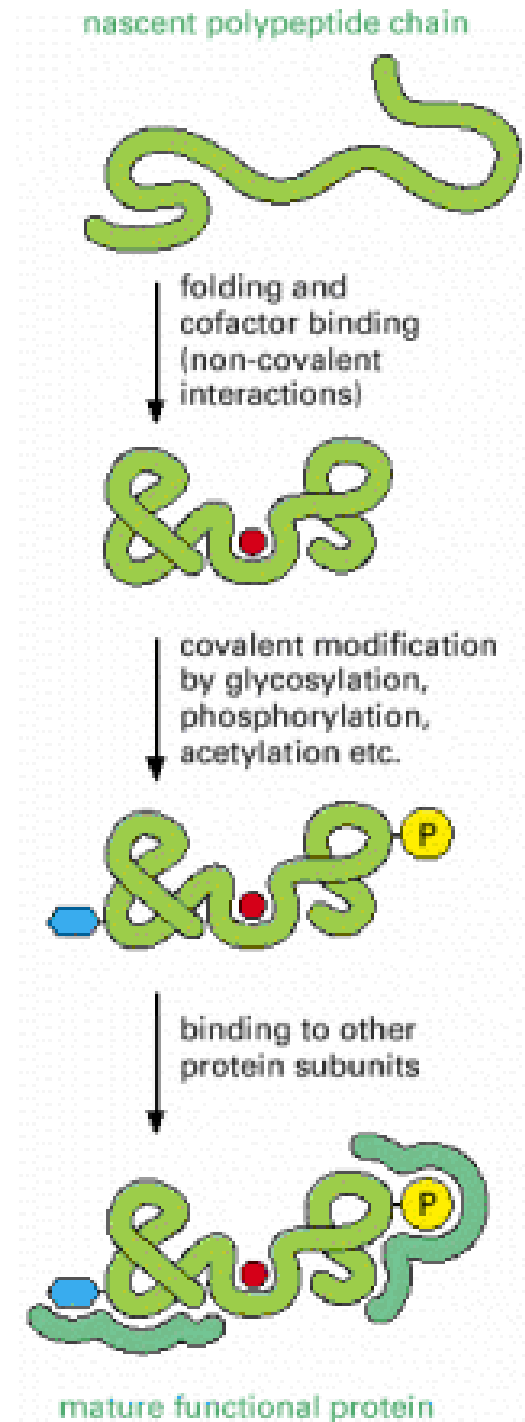
- U svakom ciklusu elongacije, ribozom prolazi kroz dve promene konformacije koje "nadziru" GTP-vezujući proteini. Prvi omogućava čvrsto vezivanje dolazeće aminoacil-tRNK za A mesto i izbacivanje tRNK sa E mesta, dok drugi utiče na translokaciju.
- Terminacija translacije se odvija dejstvom dve vrste faktora terminacije : onih koji prepoznaju stop kodone i onih koji pospešuju hidrolizu peptidil-tRNK.
- Efikasnost sinteze proteina se povećava istovremenom translacijom jednog molekula iRNK pomoću više ribozoma. U ćelijama eukariota, interakcije posredovane proteinima dovode dva kraja poliribozoma u bliski kontakt, pospešujući brzu izmenu subjedinica ribozoma, što dalje povećava efikasnost sinteze proteina

# OBRADA PROTEINA

# Posttranslaciona obrada proteina

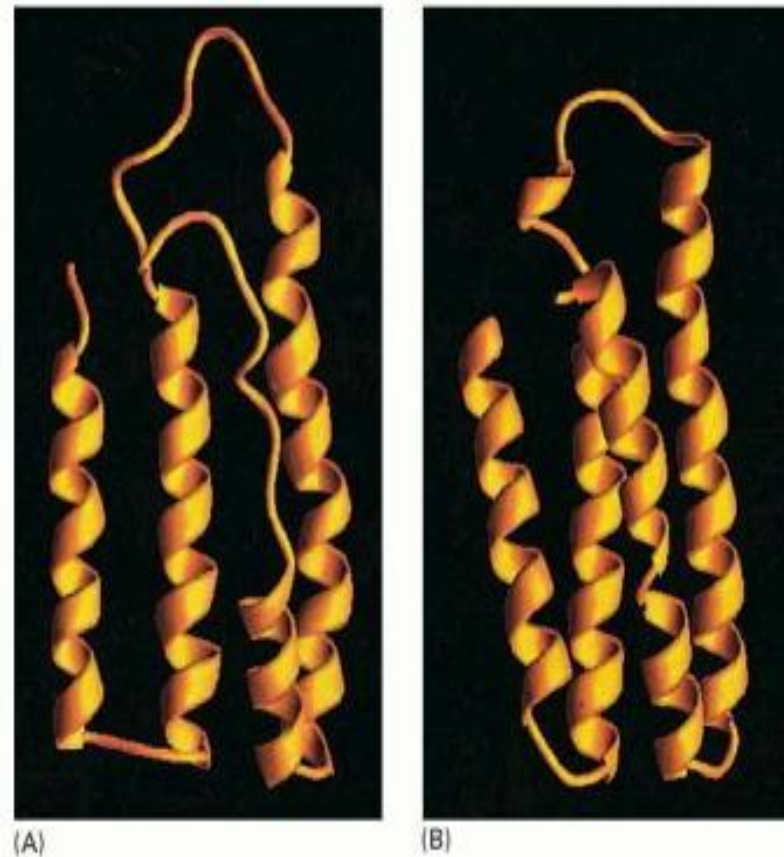


- Proces genske ekspresije se ne završava upotrebom genetskog koda za kreiranje sekvence amino kiselina koje grade protein.
- Da bi proteini mogli biti korisni, novosintetisani polipeptidni lanci
  - Moraju se uviti u svoju jedinstvenu trodimenzionalnu konformaciju
  - Vezati neke male molekule kofaktore neophodne za njihovu aktivnost
  - Moraju da budu adekvatno modifikovani protein kinazama ili drugim enzimima modifikacije
  - Moraju da se udruže korektno sa drugim subjedinicama sa kojima funkcionišu



- Informacija neophodna za sve navedene korake sazrevanja proteina sadržana je u sekvenci amino kiselina koja je proizvedena u toku translacije
- Uvijanjem proteina:
  - hidrofobni regioni se postavljaju u unutrašnjost molekula
  - uspostavljaju se brojne nekovalentne interrekcije između različitih delova molekula
- Zbir svih ovih energetski povoljnih interakcija određuje finalno uvijanje proteina kao konformaciju sa najmanjom slobodnom energijom.

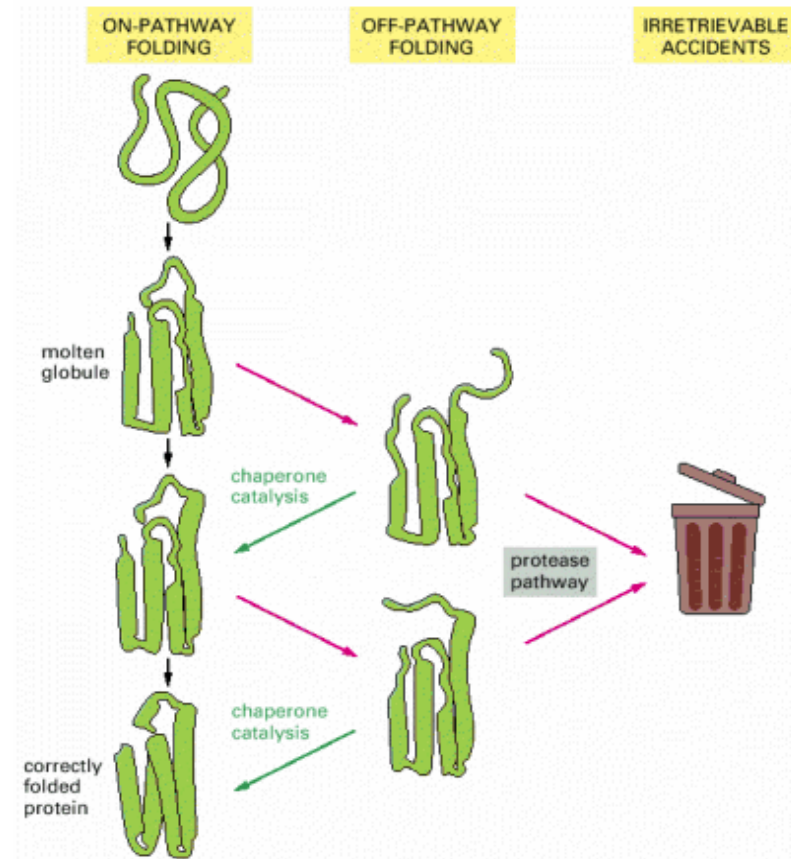
- Eksperimentima je pokazano da proteinski domen u proteinu koji se sastoji od više domena, neposredno nakon sinteze na ribozomu, gradi kompaktnu strukturu unutar nekoliko sekundi koja sadrži najveći broj finalnih sekundarnih struktura ( $\alpha$  heliksi i  $\beta$  nabrane strukture) koje su poslagane u paralelne nizove.
- Ova neobično otvorena i fleksibilna struktura se naziva **izlivena globula**, i ona za mnoge domene proteina predstavlja polaznu tačku za relativno spori proces u kome se vrši prilagođavanje mnogih bočnih lanaca i eventualno formiranje korektne tercijerne strukture.



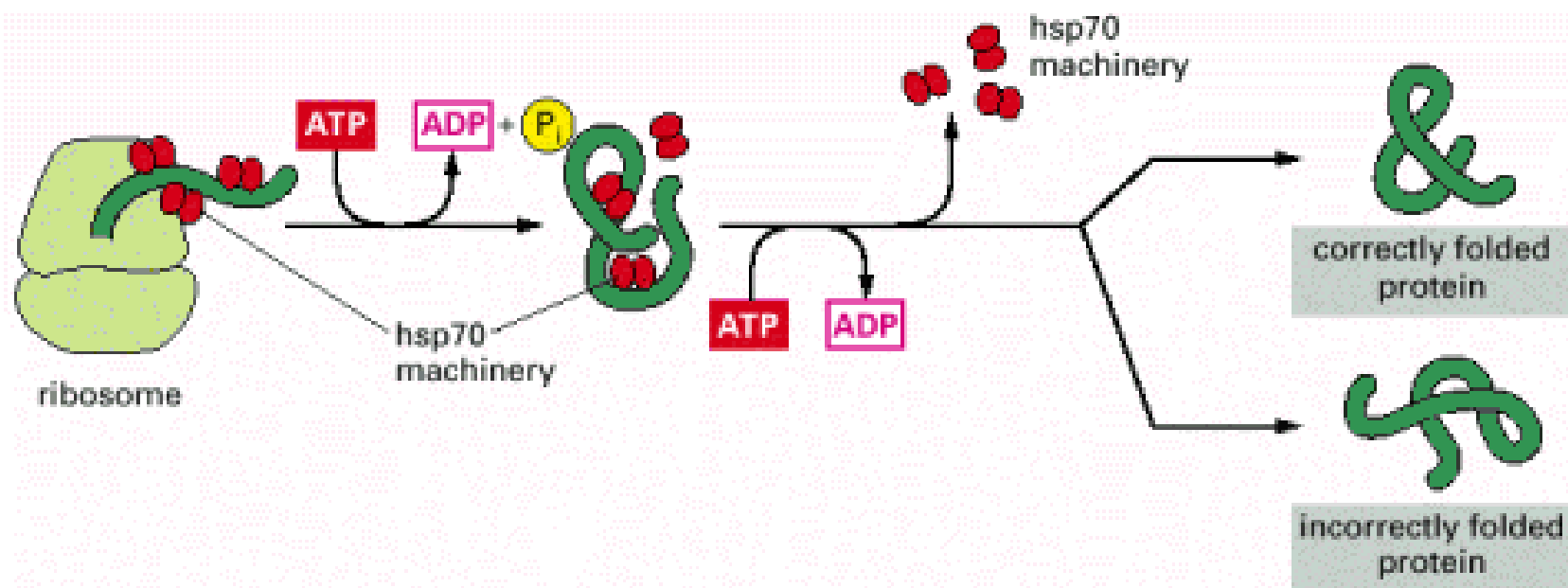


## Proteini nadzornici potpomažu uvijanje mnogih proteina

- Proteini nadzornici (**chaperons**) pripadaju *heat-shock* proteinima (*hsp*), zato što se sintetišu u dramatično povećanoj količini posle kratkotrajnog izlaganja ćelije povišenoj temperaturi (npr. 42°C za ćelije koje normalno žive na 37°C).
- U ćelijama eukariota postoji najmanje dve glavne familije šaperona- *hsp60* i *hsp70*.
- Različiti članovi familije funkcionišu u različitim organelama.

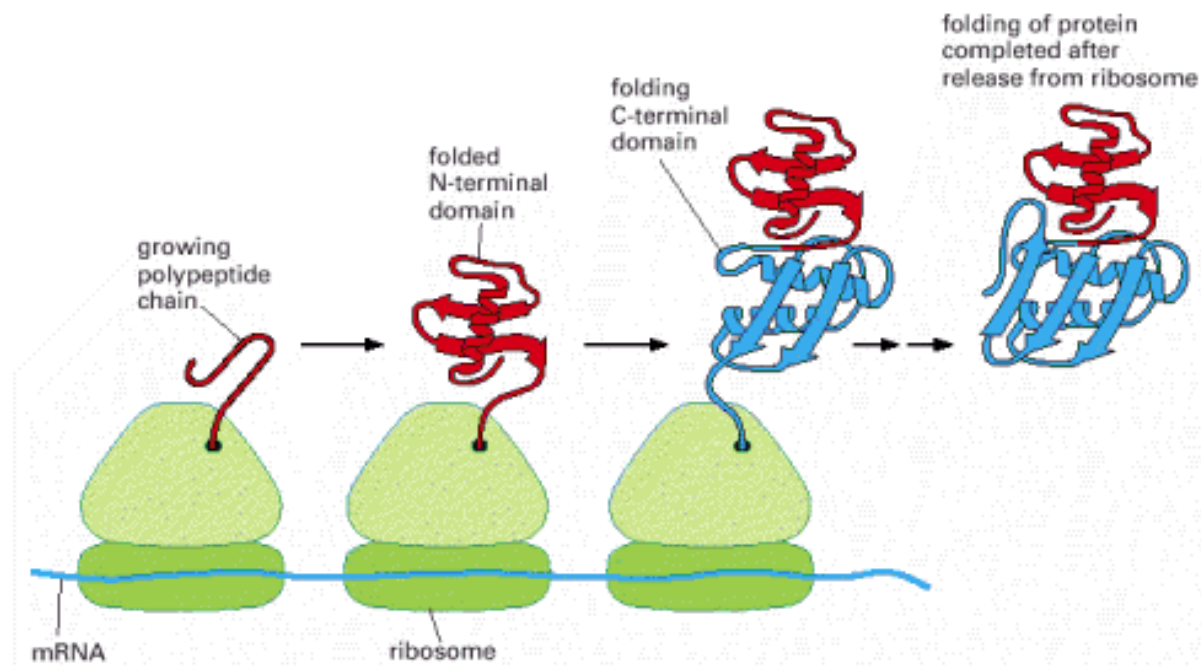


- Hsp60 i hsp70 proteini rade udruženi sa malim sopstvenim setom proteina
- Oni imaju afinitet za izložene hidrofobne delove nekompletno uvijenih proteina, hidrolizuju ATP, često vezujući i oslobađajući proteine u svakom ciklusu hidrolize i ATP-a.
- **Hsp70** se vezuje za deo od oko 7 hidrofobnih amino kiselina pre nego što protein napusti ribozome.

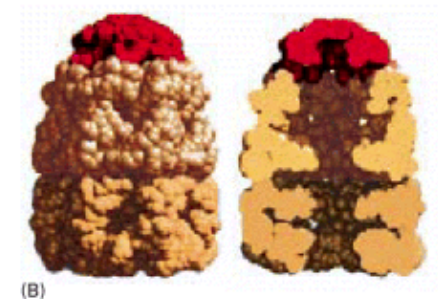
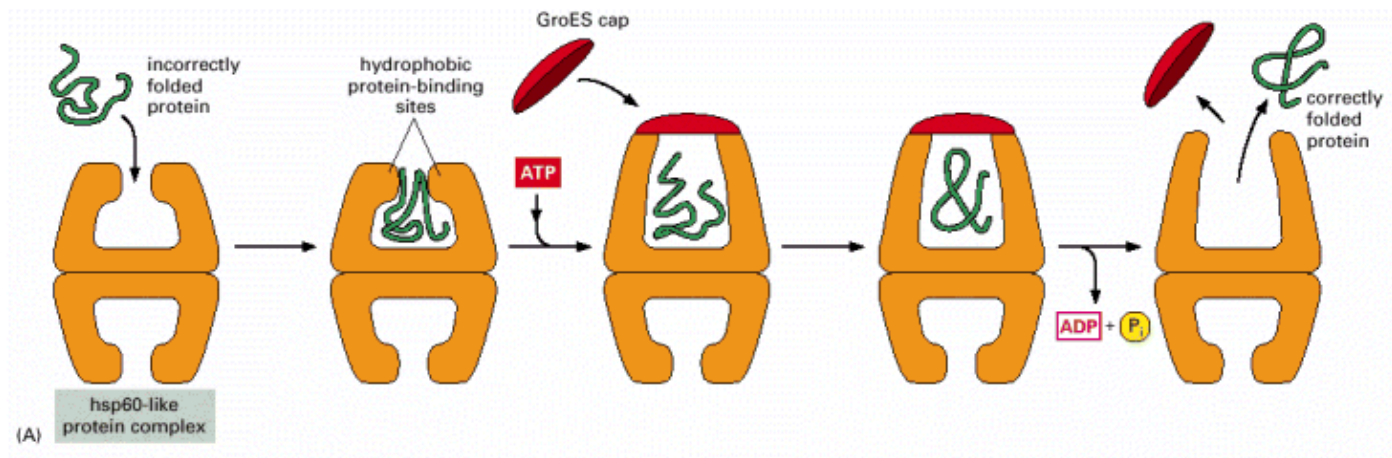


# Kotranslaciono oblikovanje proteina

Rastući pp lanac počinje da zauzima svoju sekundarnu i tercijernu strukturu kako napušta ribozom. Prvo se oblikuje N-terminalni kraj dok se C-terminalni kraj još sintetizuje. To znači da ipak pp lanac još uvek ne poseduje adekvatnu konformaciju pošto napusti ribozom.

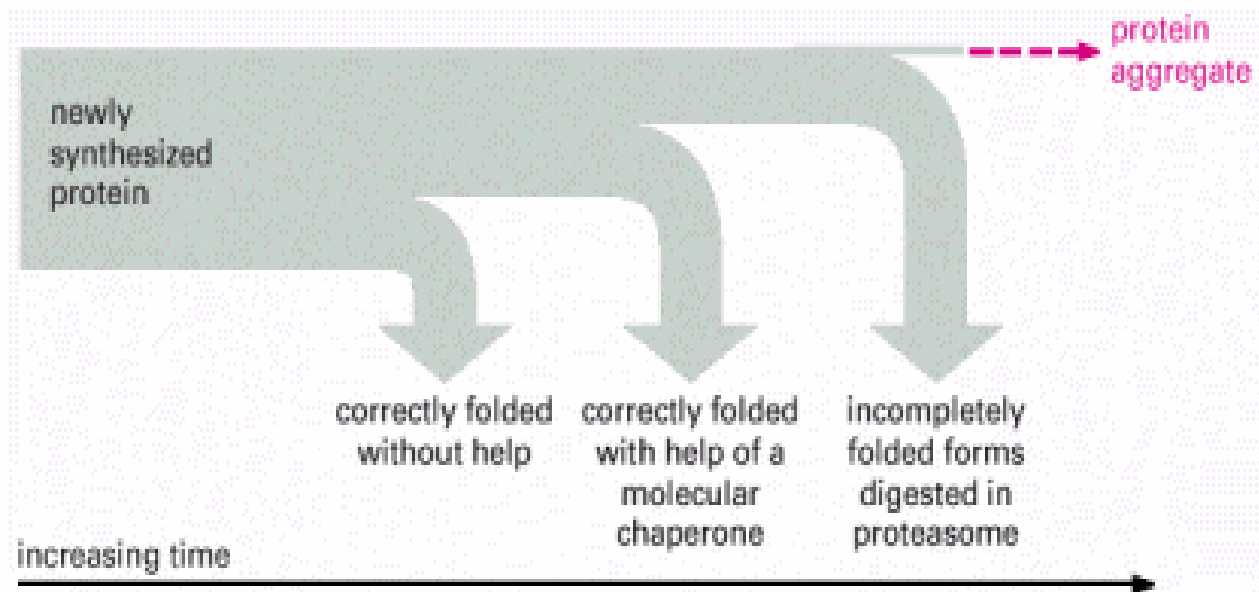


- **Hsp60-like proteini** grade cilindričnu strukturu koja deluje na proteine nakon što su oni u potpunosti sintetisani.
- Formiraju izolacionu komoru u koju ulaze pogrešno uvijeni proteini, sprečavajući njihovu agregaciju i obezbeđujući odgovarajuće okruženje u kome pokušavaju da se ponovo uviju.



- Molekularni šaperoni prepoznaju i uklanjaju hidrofobne delove proteina, vezujući se za njih i pokušavaju da poprave protein dajući mu šansu da se ponovo ispravno uvije.
- Pokrivajući hidrofobni deo takođe sprečavaju agregaciju proteina.
- Proteini koji se korektno i brzo uvijaju ne reaguju sa šaperonima.
- Ako pokušaj da se protein ponovo uvije propadne, uljučuje se treći mehanizam

## - Kompletno uklanjanje proteina proteolizom

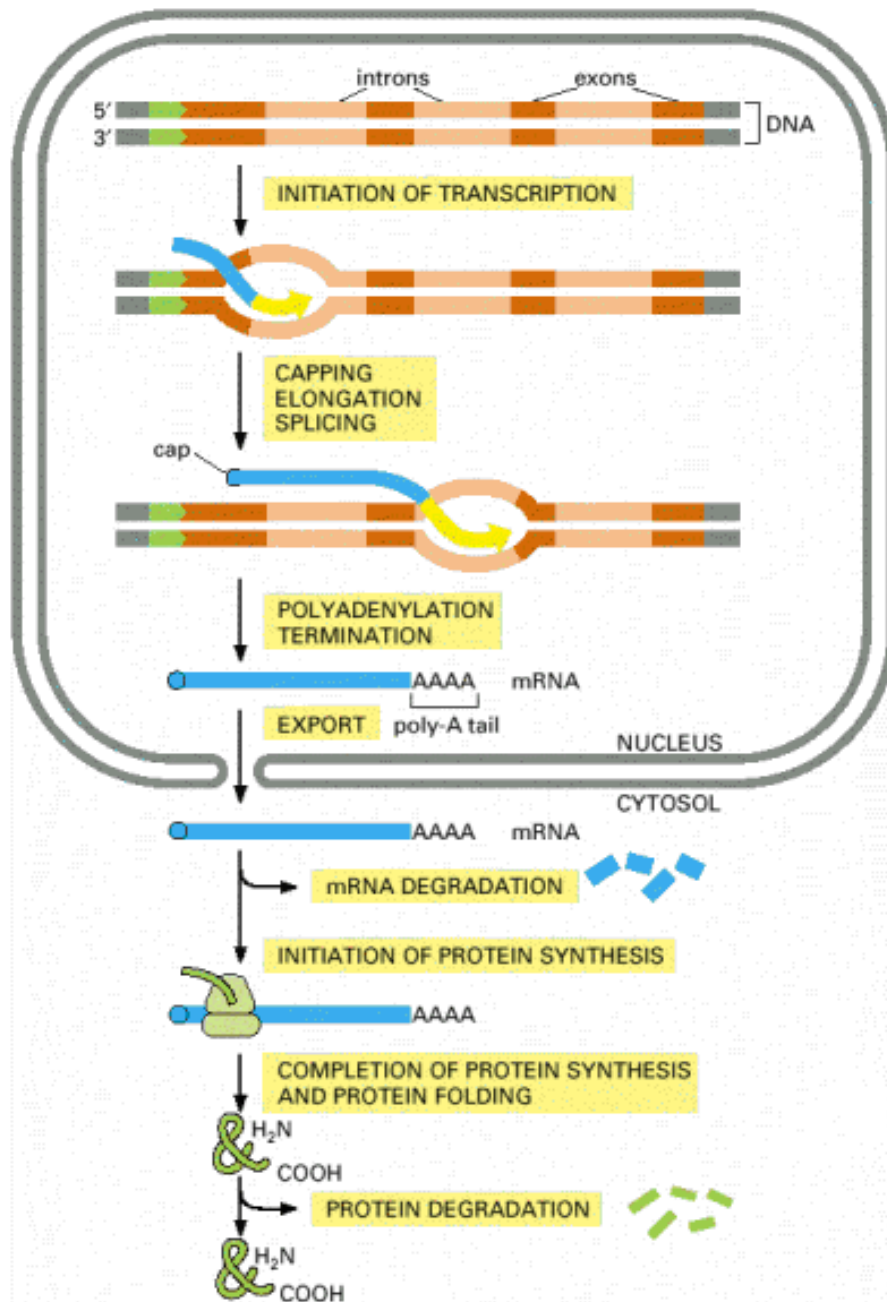


## Izloženi hidrofobni regioni - ključni signal u kontroli kvaliteta proteina

- Hsp70 učestvuju u uspostavljanju strukture za oko 20% proteina
- Hsp60-like molekularni proteini nadzornici za oko 10%.
- Kako se ovi proteini izabiraju za ponovno ATP-katalizovano uvijanje?
- Protein koji ima izložen značajan deo hidrofobnih amino kiselina na svojoj površini je obično abnormalan ili nije uspeo da se korektno uvije u odgovarajuću konformaciju, ili je pretrpeo neki uticaj pa je delimično razvijen kasnije ili nije uspeo da pronađe odgovarajuću subjedinicu u većem kompleksu proteina.
- Ovakav protein može da bude neupotrebljiv u ćeliji i takođe može biti opasan za ćeliju (agregati koji mogu se mogu taložiti).
- Najveći broj ćelija ima moćan sistem za kontrolu kvaliteta.

## “Pravilo N-kraja”

- veza između poluživota proteina i N-terminalne rezidue.
- Destabilizujuću N-terminalnu reziduu prepoznaje posebna ubikvitin ligaza.



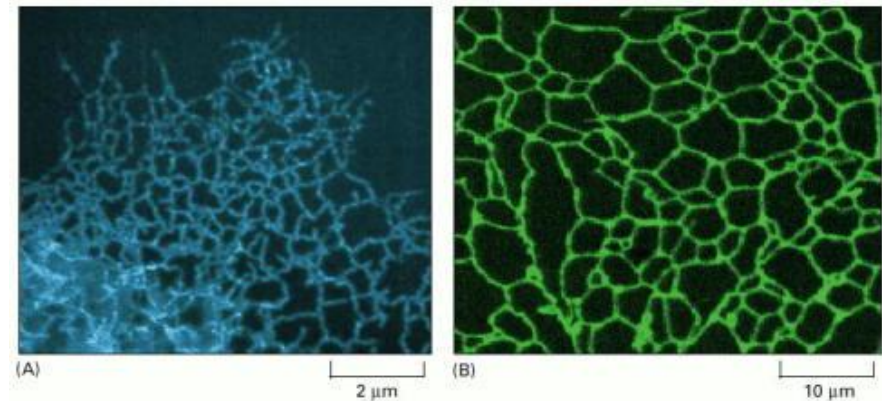
## Produkcija proteina u ćeliji eukariota

Krajnji stepen produkcije svakog proteina, zavisi od odvijanja svakog od pojedinačnih koraka uključenih u sintezu i obradu proteina do njihove finalne strukture i funkcije.



## Obrada proteina u endoplazmatskom retikulumu

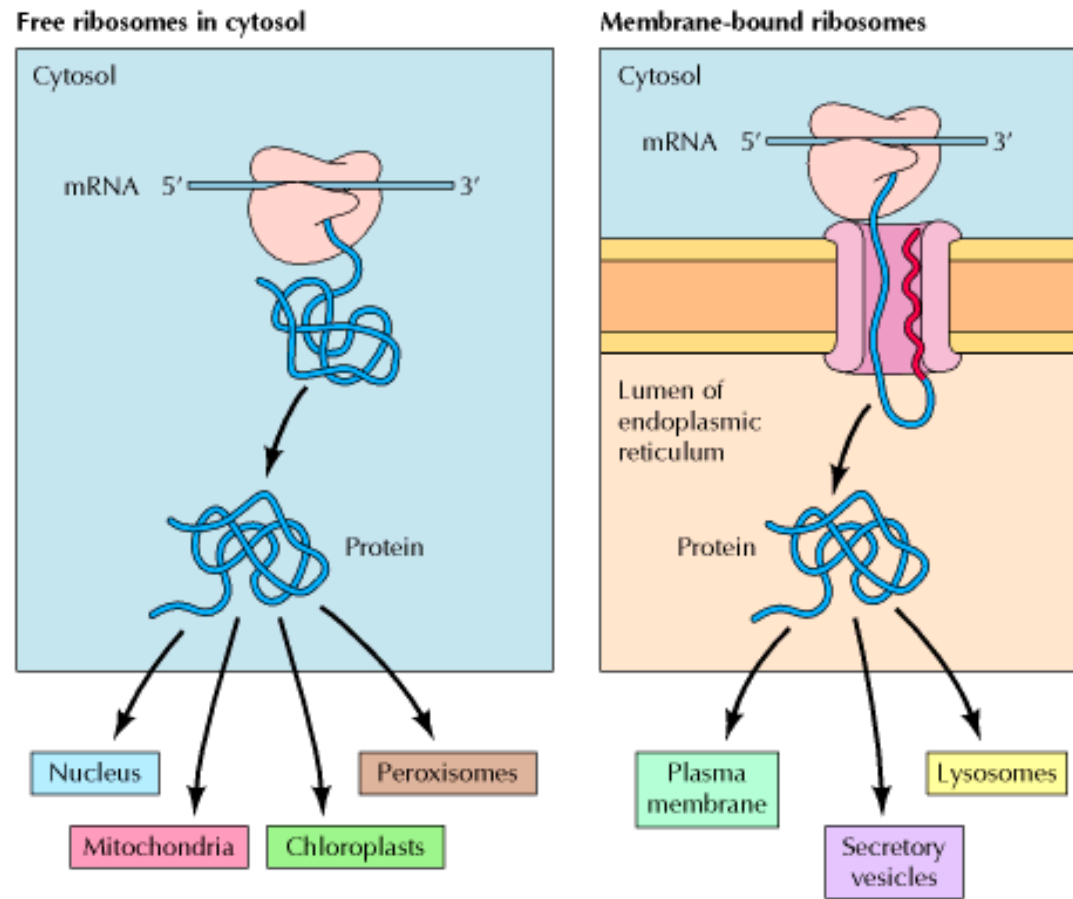
- Membrana ER tipično čini više od polovine ukupnih membrana u prosečnoj animalnoj ćeliji.
- ER ima centralnu ulogu u biosintezi lipida i proteina.
- Proizvode se svi transmembranski proteini i lipidi za najveći broj ćelijskih organela uključujući ER, Golđi aparat, lizosome, endosome, sekretorne vezikule i plazma membranu.
- Proizvodi i najveći deo lipida za membrane mitohondrija i peroksizoma.



# Endoplazmarni retikulum (ER)

ER je mreža membranoznih cevčica i kesica (cisterae) koja se pruža od jedarne membrane kroz citoplazmu

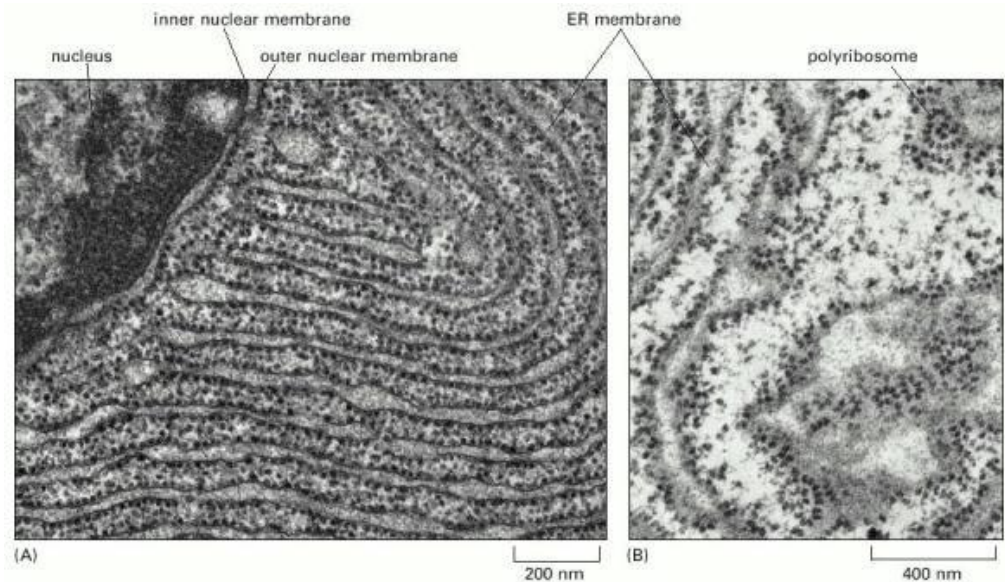
Proteini namenjeni sekreciji ili ER, Golđi aparatu, lizozomima, ili plazma membrani se najpre usmeravaju u ER, uglavnom dok još traje translacija na ribozomima vezanom za membranu



Proteini koji ostaju u citosolu ili su namenjeni jedru, mitohondrijama, ili peroksisomima se sintetisu na slobodnim ribozomima i oslobađaju u citosol kada se završi njihova translacija

# Ribozomi vezani za membranu definišu granularni ER

- Import proteina u ER - **ko-translacioni proces**.
- Jedan kraj proteina je obično translociran u ER pre nego što se sintetiše ceo protein
  - protein nije nikada oslobođen u citosol i ne uvija se pre nego što stupi u kontakt sa transporterom u ER
  - šaperoni nisu potrebni za održavanje proteina neuvijenim
- Ribozom koji sintetiše protein je direktno pričvršćen za membranu ER.
- Kada se na ribozomu sintetiše protein sa signalnom sekvencom za ER tada se ribozom usmerava na membranu ER



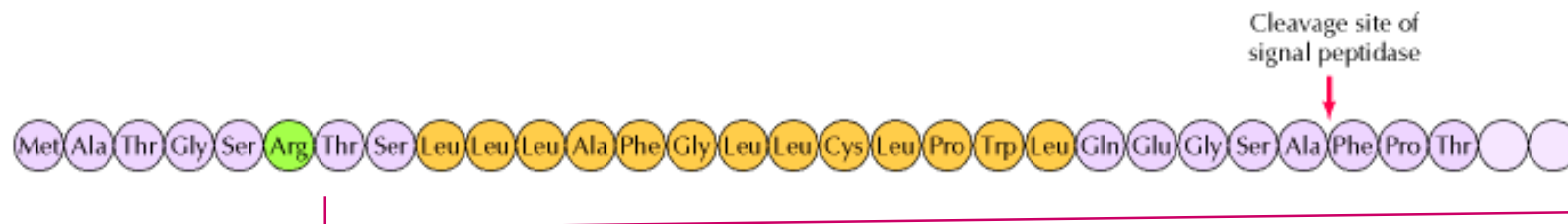
Kotranslacioni put započinje udruživanjem ribozoma sa ER.

Ribozomi se usmeravaju ka vezivanju za membranu ER membrane prisustvom **sekvence AK** na polipeptidnom lancu koji se sintetiše

Slobodni i ribozomi vezani za membranu se ne mogu razlikovati po funkciji: sinteza proteina uvek otpočinje na ribozomima koji su slobodni u citosolu.

Ribozomi uključeni u sintezu proteina namenjenih sekreciji se usmeravaju u ER zahvaljujući **signalnoj sekvenci** na NH<sub>2</sub> kraju rastućeg polipeptidnog lanca.

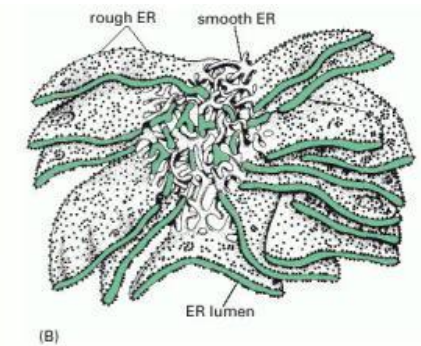
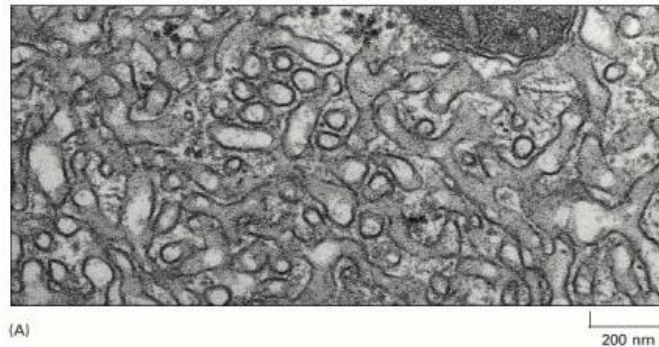
Signalne sekvence - kratki nizovi hidrofobnih AK koje se isecaju sa polipeptidnog lanca tokom njegovog prelaska u lumen ER.



*Signalna sekvenca hormona rasta*

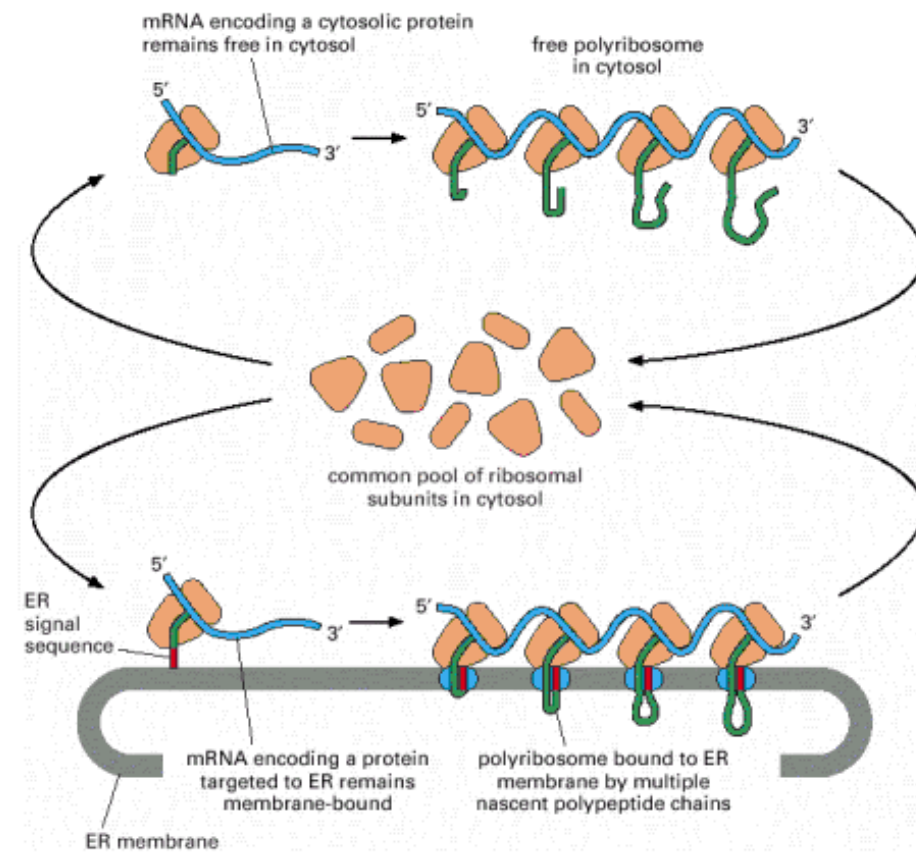
# Glatki endoplazmatski retikulum

- Sadrži **izlazna ER mesta** kroz koja transportne vezikule koje nose novosintetisane proteine i lipide prolaze pri transportu u Goldžijev aparat.
- Ima i druge uloge
  - **metabolizam lipida** (sinteza steroidnih hormona, lipoproteina)
  - reakcije detoksikacije (cyt P450)
  - sekvestracija kalcijuma



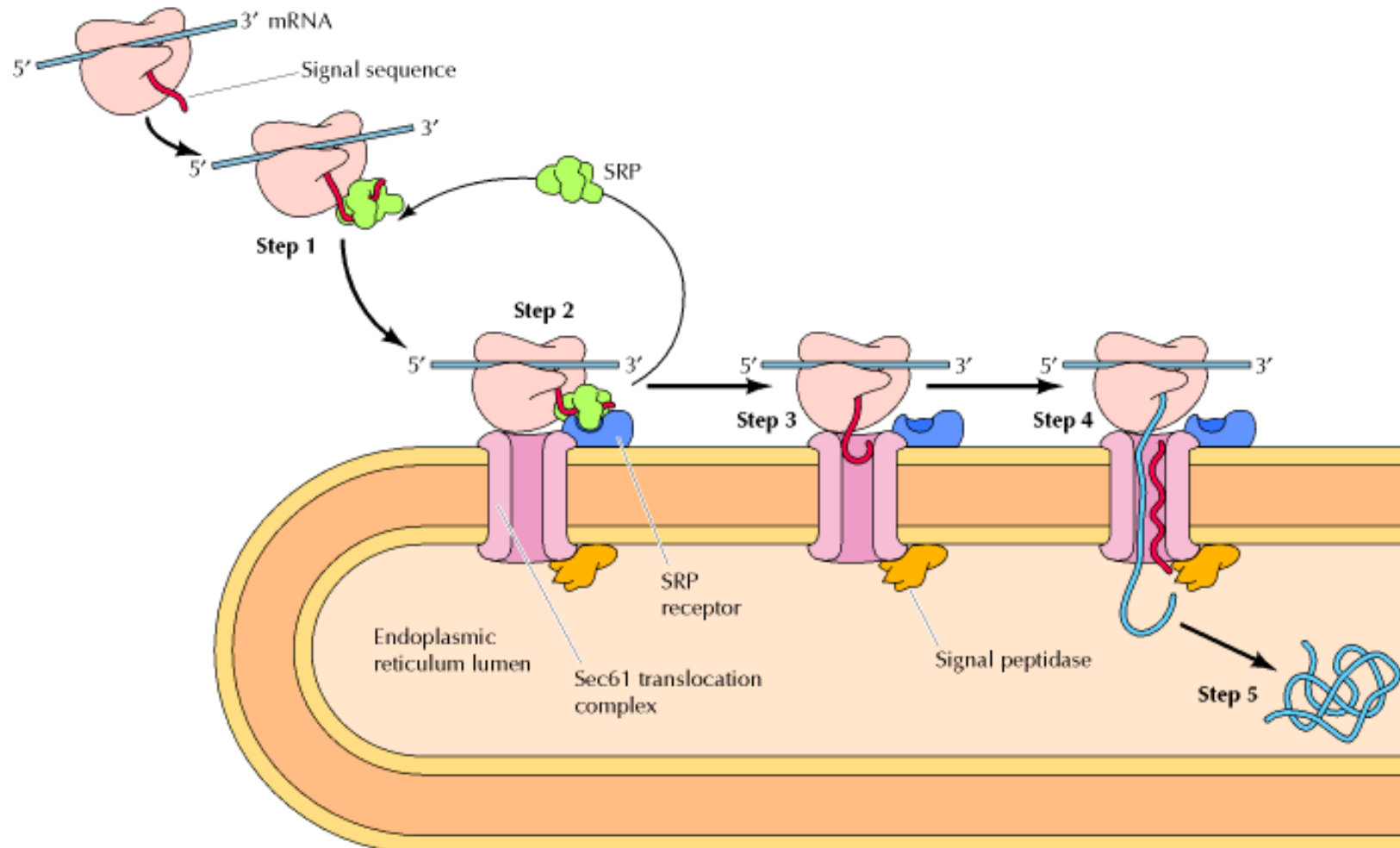
# Ribozomi vezani za membranu definišu granularni ER

- Pojedinačni ribozomi se slučajno raspoređuju između dve populacije iRNK:
  - iRNK koje kodiraju proteine sa signalnom sekvencom i pričvršćene su preko poliribozoma za membranu ER
  - iRNK koje kodiraju proteine bez signalne sekvence

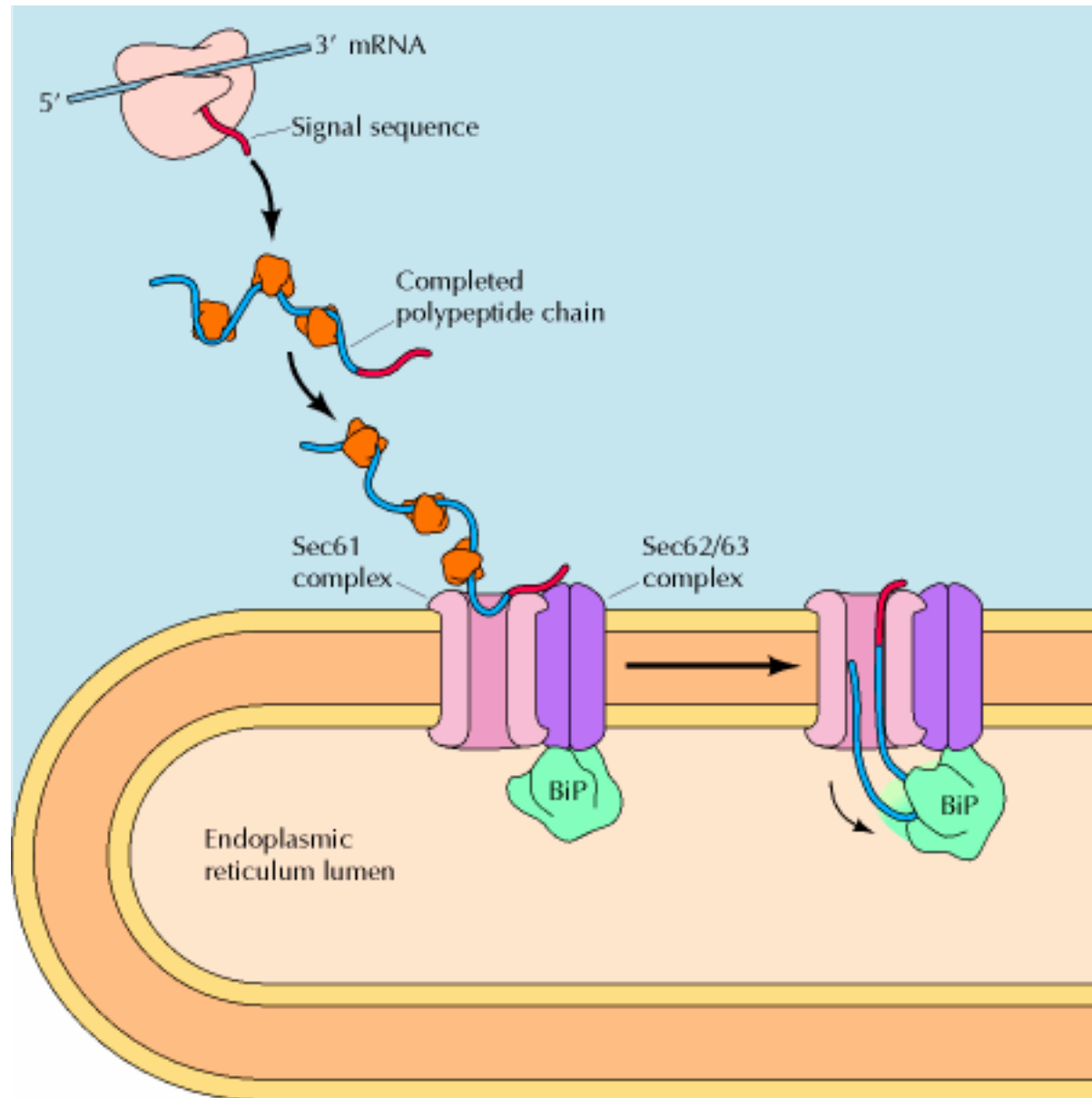


Kako se pojavljuju sa ribozoma, signalne sekvence prepoznaju i vezuju čestice koje prepoznaju signal (signal recognition particle - SRP) 6 polipeptida i mala citoplazmatska RNK (7S rRNK).

SRP se vezuje za ribozom i signalnu sekvencu, inhibirajući dalju translaciju i usmeravajući ceo kompleks (SRP, ribozom, i rastući polipeptidni lanac) u zrnasti ER vezivanjem za SRP receptor na membrani ER membrani



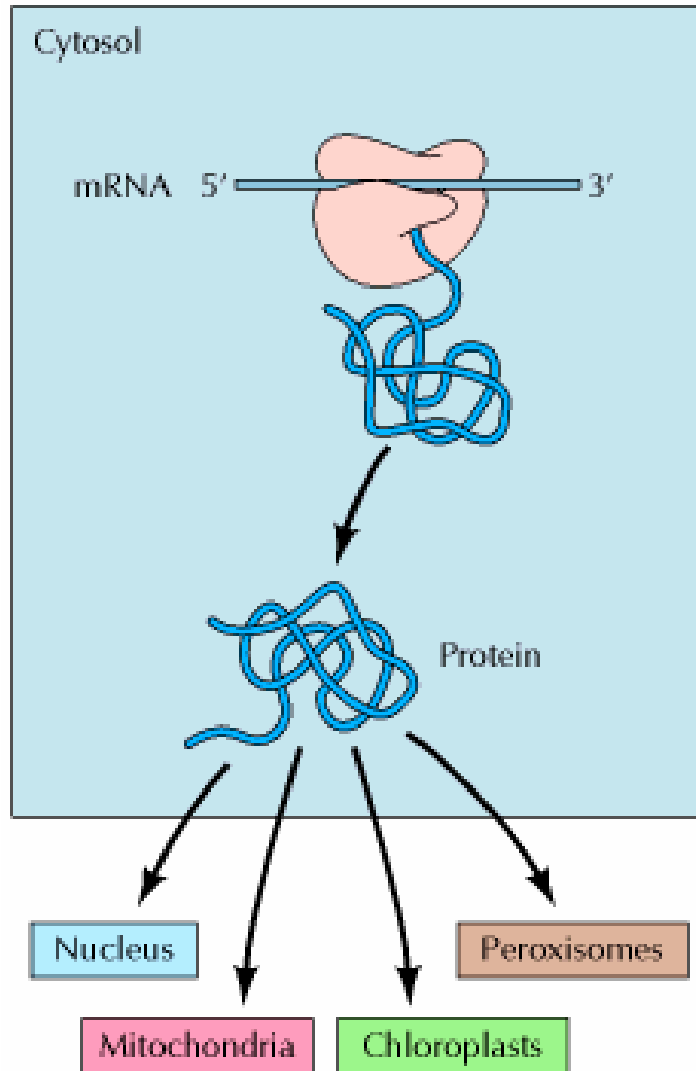
# Posttranslaciona obrada proteina



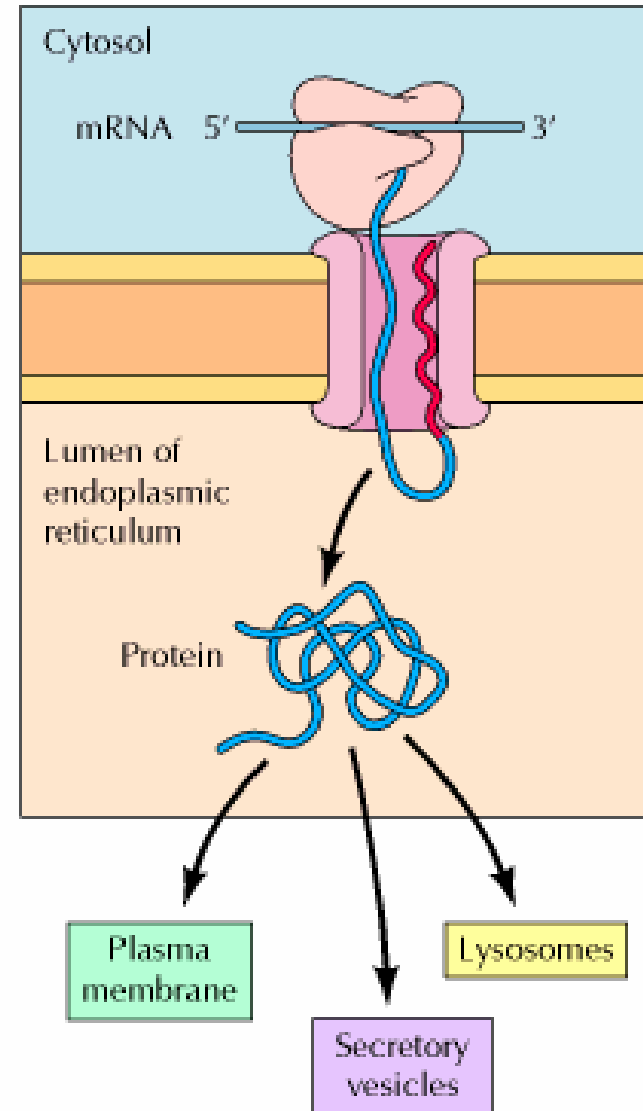


# Sortiranje proteina

Free ribosomes in cytosol

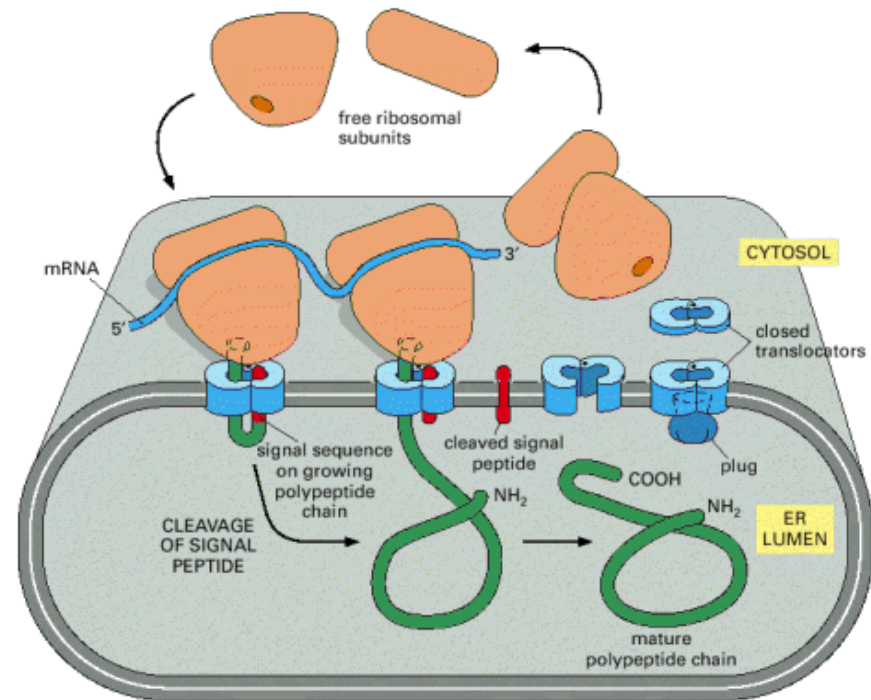


Membrane-bound ribosomes



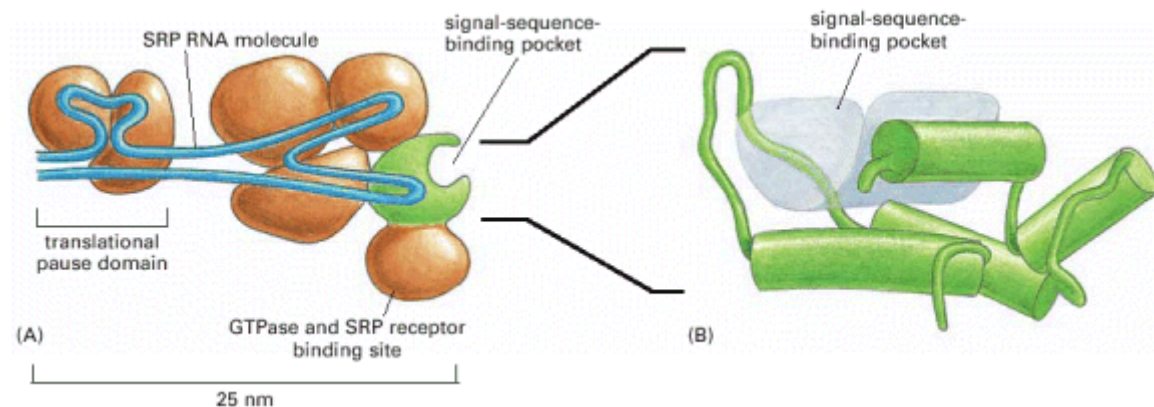
# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- **Signalna sekvenca** se nalazi na N-terminalnom kraju peptida.
- **N-terminalna ER signalna sekvenca usmerava :**
  - solubilne sekretovane proteine i
  - prekursore drugih proteina uključujući i membranske proteine.
- **Čestica za prepoznavanje signala (SRP)** usmerava ER signalnu sekvencu do specifičnih receptora u granuliranom ER



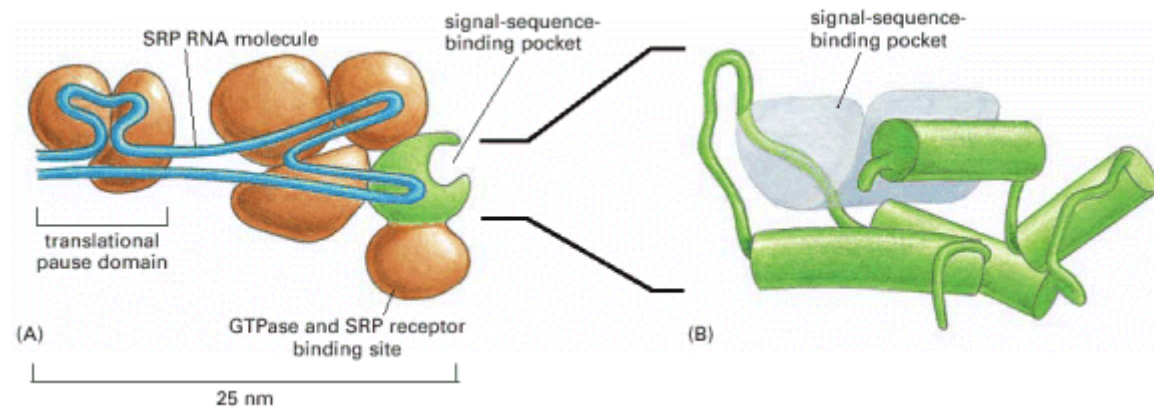
## Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- Čestica za prepoznavanje signalne sekvence (*signal-recognition particle SRP*)
  - cirkuliše između ER membrane i citosola i vezuje se za signalnu sekvencu i receptor u ER membrani
  - sastoji se od 6 različitih polipeptidnih lanaca vezanih za jednu malu RNK (7s rRNK)
  - konzervirana tokom evolucije (homologija čestice i receptora u svih proučavanih organizama)



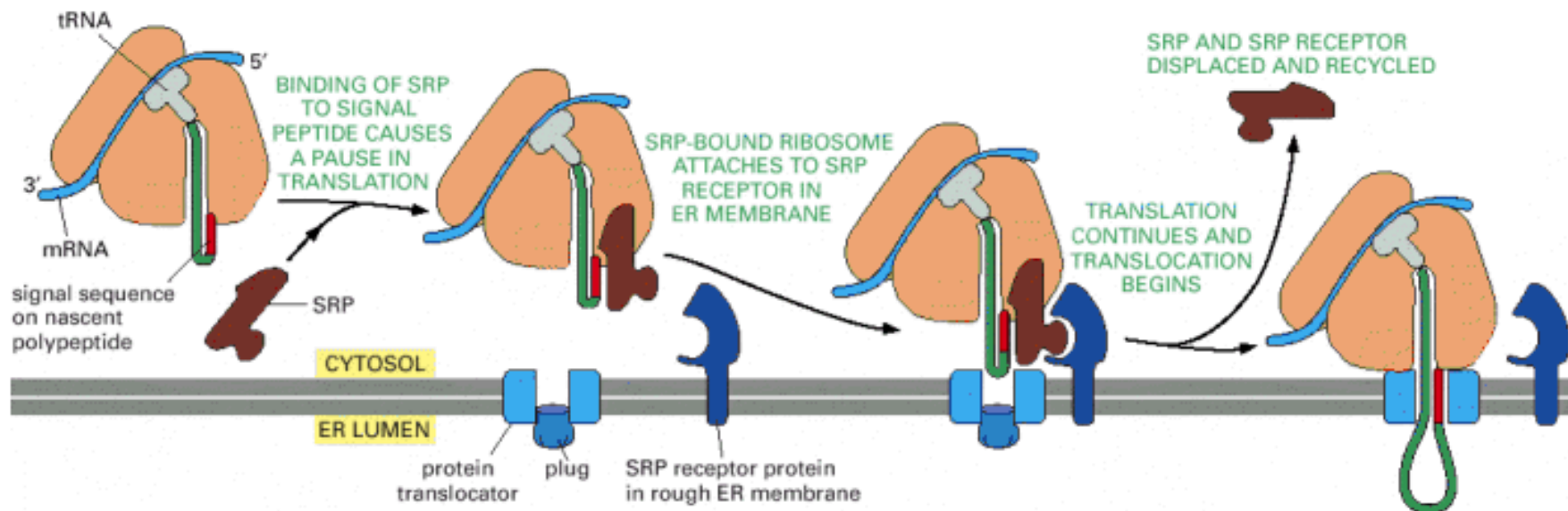
# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- **Signalna sekvenca** - različita sekvenca amino kiselina
  - ima 8 ili više nepolarnih amino kiselina u svom centru
  - mesto vezivanja signalne sekvence je veliki hidrofobni džep obložen metioninom
- **Čestica za prepoznavanje signalne sekvence** se vezuje za signalnu sekvencu čim peptid počne da izlazi iz ribozoma
- nastaje pauza u sintezi proteina što ribozomima daje dovoljno vremena da se vežu za ER membranu (posebno značajno za sintezu sekretovanih i lizozomalnih hidrolaza)



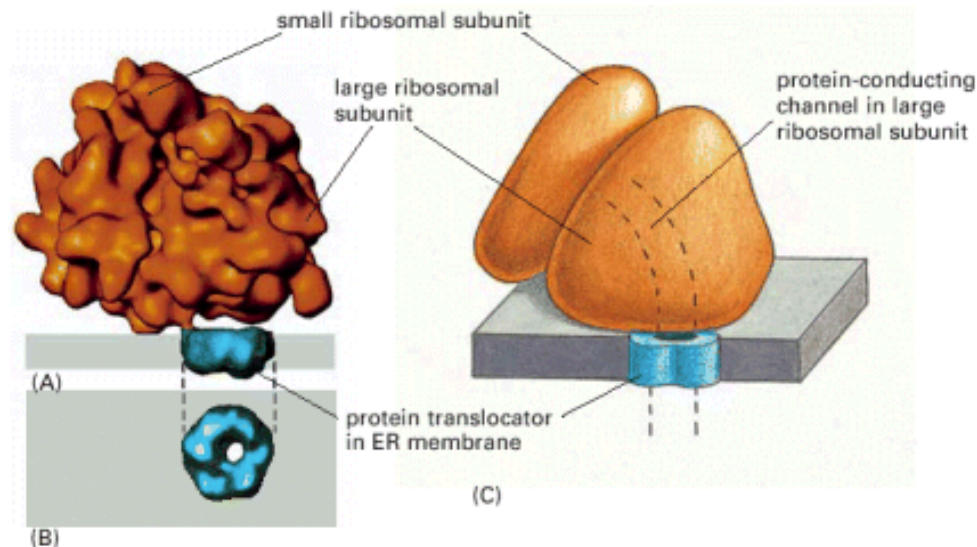
# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- **Kompleks - signalna sekvenca/ribozom kompleks** se vezuje za SRP receptor
  - SRP receptor - integralni membranski protein izložen samo na citosolnoj površini GER.
- Interakcija dovodi **SRP/ribozom kompleks do proteina translokatora**.
- SRP i SRP receptor se tada oslobađaju i rastući polipeptidni lanac prolazi kroz membranu
- SRP ima GTP vezni domen. Hidroliza GTP-a osigurava takvu konformacionu promenu SRP da se odvoja tek pošto ribozom dođe u kontakt sa translokatorom



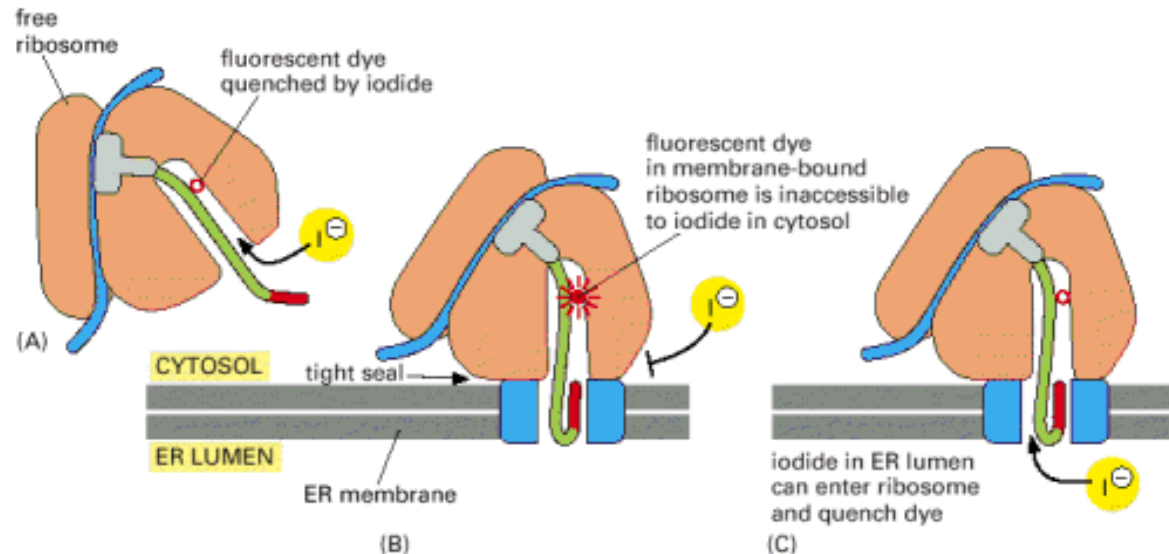
# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- Protein translokator
  - gradi vodom ispunjenu poru u membrani
  - naziva se Sec61 kompleks
  - sadrži tri ili četiri kompleksa proteina , svaki građen od tri transmembranska proteina.
  - Centralna pora translokatora je u liniji sa "tunelom" velike subjedinice kroz koju pp lanas napušta ribozom



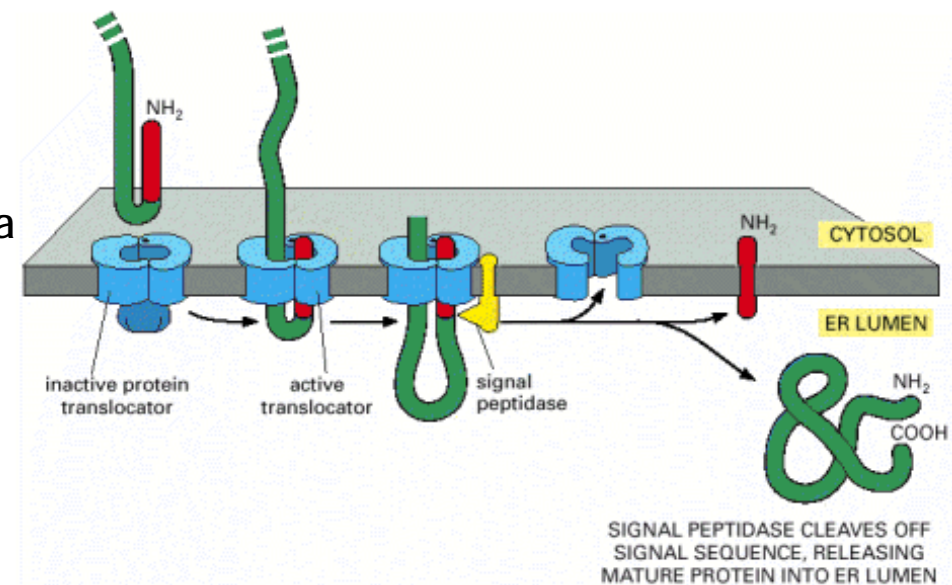
# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- Vezani ribozom gradi tesnu vezu sa translokatorom i sprečava da molekuli pobegnu iz ER
- Luminalni proteini ER zatvaraju translokator i on se samo prolazno otvara u toku prolaza polipeptidnog lanca
- Smatra se da signalna sekvenca otvara pore
- Signalna sekvenca se dakle prepoznaje dva puta
  - jednom u reakciji sa SRP
  - drugi put preko vezivanja za translokator



# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- ER signalna sekvenca se uklanja sa većine solubilnih proteina posle translokacije
- Uklanja je signal peptidaza sa luminalne strane ER.
- Postoji dodatno mesto za cepanje koje specifično prepoznaje peptidaza.
- Signalne sekvence koje se nalaze unutar polipeptidnog lanca, a ne na N-kraju nemaju ovo dodatno mesto prepoznavanja i nikada se ne isecaju (one služe da zadrže transmembranski protein u membrani)
- N-terminalne signalne sekvence imaju dve signalne funkcije:
  - usmeravaju protein na ER membranu
  - služe kao start-transfer signal koji otvara pore
- Kada C kraj proteina prođe kroz poru signalna sekvenca se oslobađa i brzo razgrađuje.

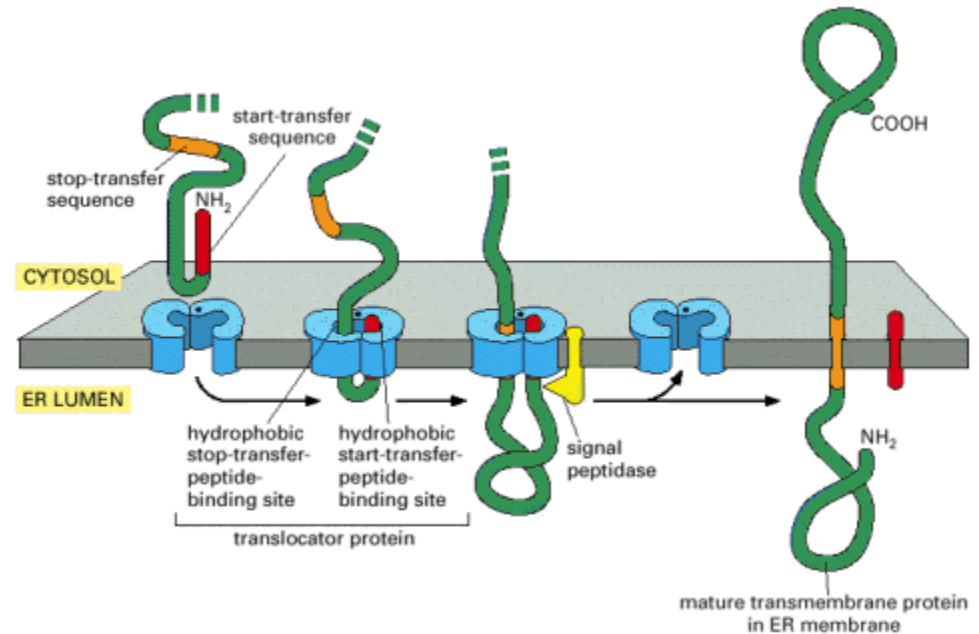


Pošto je protein u potpunosti translociran, pora se zatvara ali se translokator otvara bočno, unutar lipidnog dvosloja, kako bi hidrofobna signalna sekvenca difundovala u lipidni dvosloj, gde se dalje brzo razgrađuje.



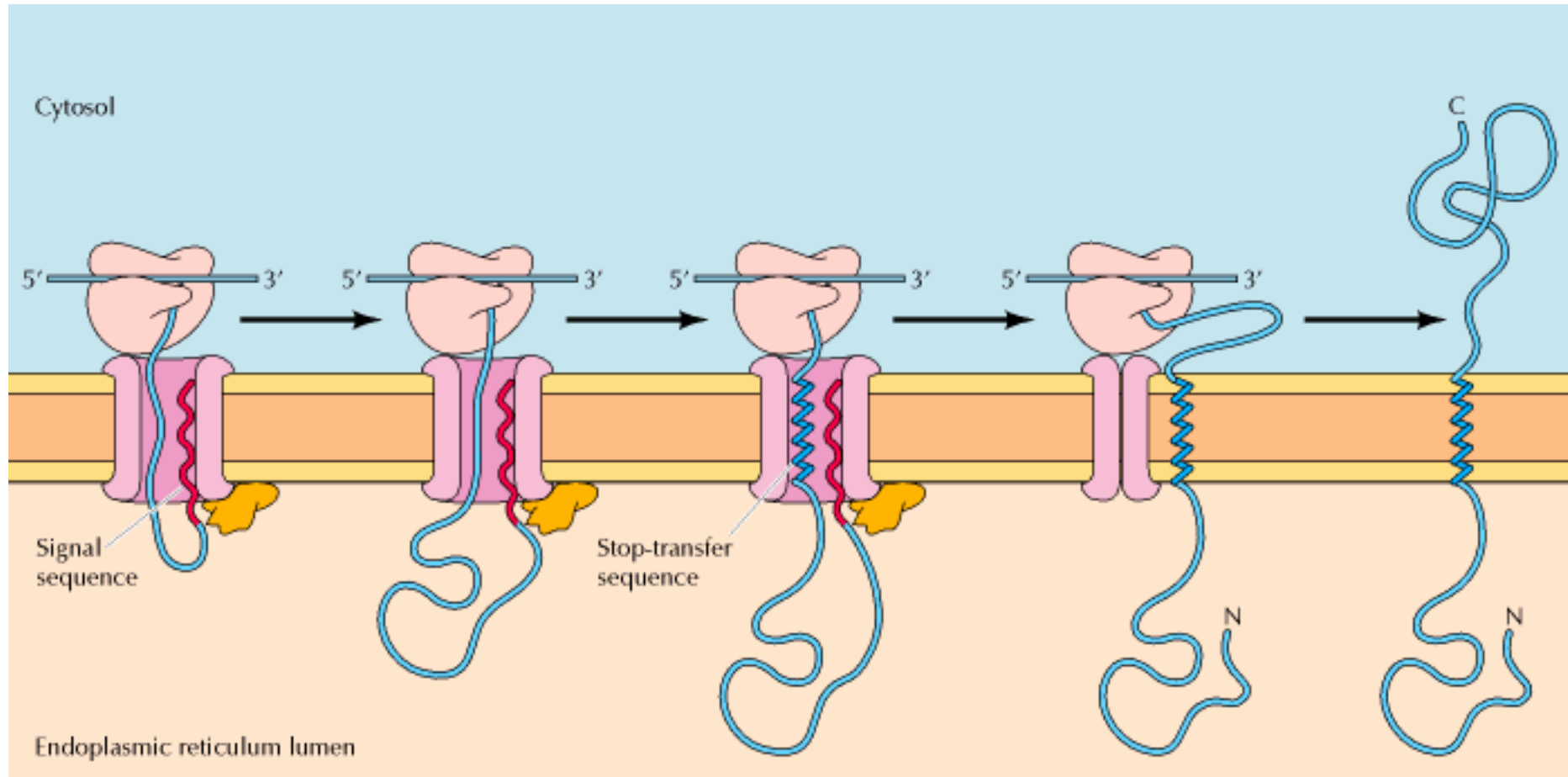
# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- Postoje tri načina insercije proteina sa jednim transmembranskim domenom u membranu
- I - dodatni hidrofobni region - stop-transfer signal zaustavlja transfer pre translukacije celokupnog polipeptida
  - Stop transfer signal pričvršćuje protein u membrani nakon što je signalna sekvenca oslobođena sa translokatora i isečena.
  - Stop transfer signal se prebacuje u membranski dvosloj preko lateralno otvora i tu ostaje kao jedan alfa heliks sa N- krajem u lumenu ER i C krajem u citosolu.



Pored signalne sekvence (N-kraj) postoji i stop transfer sekvence. Kada ona dođe u translokator i reaguje sa veznim mestom, translokator menja svoju konformaciju i pomera protein lateralno u lipidni dvosloj.

# Ugrađivanje proteina u membranu



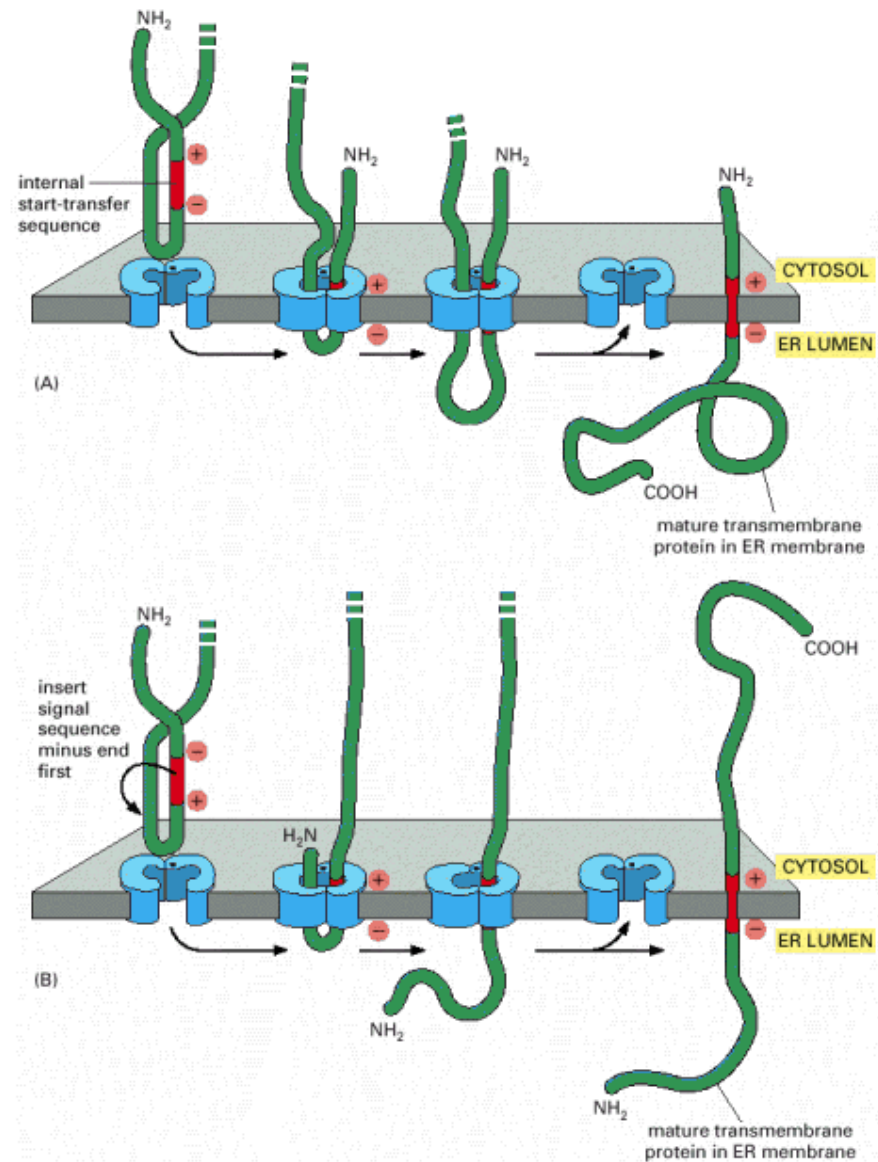
# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- U druga dva slučaja **signalna sekvenca je u unutrašnjosti**.
- Prepoznaje je **SRP**, dovodi ribozom koji stvara protein do ER i služi kao **start-transfer signal**.
- Posle oslobađanja sa translokatora **ostaje u membrani** kao jedan transmembranski alfa heliks.
- **Orijentacija signalne sekvence** određuje koji će se segment proteina prebaciti kroz poru u lumen ER.

**Integracija proteina koji jednom prolazi kroz membranu sa unutrašnjom signalnom sekvencom koja funkcioniše kao start-transfer signal koji se vezuje za translokator pri čemu pozitivniji kraj pp lanca ostaje u citosolu.**

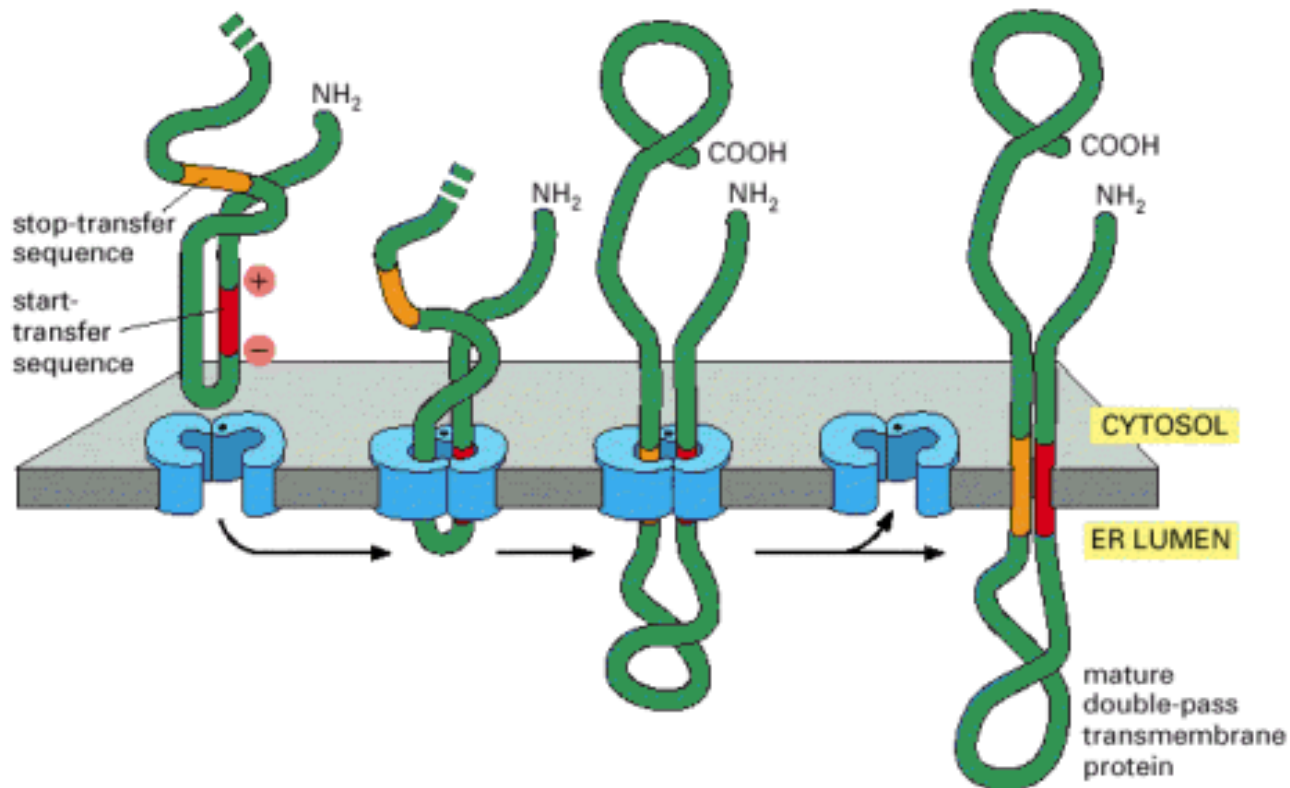
**(A) Ukoliko ima više pozitivno naelektrisanih AK oko hidrofobnog dela start-transfer sekvence, C-kraj biva unet kroz translokator u ER.**

**(B) Ako ima više pozitivno naelektrisanih AK neposredno iza hidrofobnog dela start transfer sekvence, start transfer sekvenca se unosi kroz translokator u odgovarajućoj orijentaciji. Samo se N kraj translocira i to tek pošto je potpuno sintetisan na robozomu.**



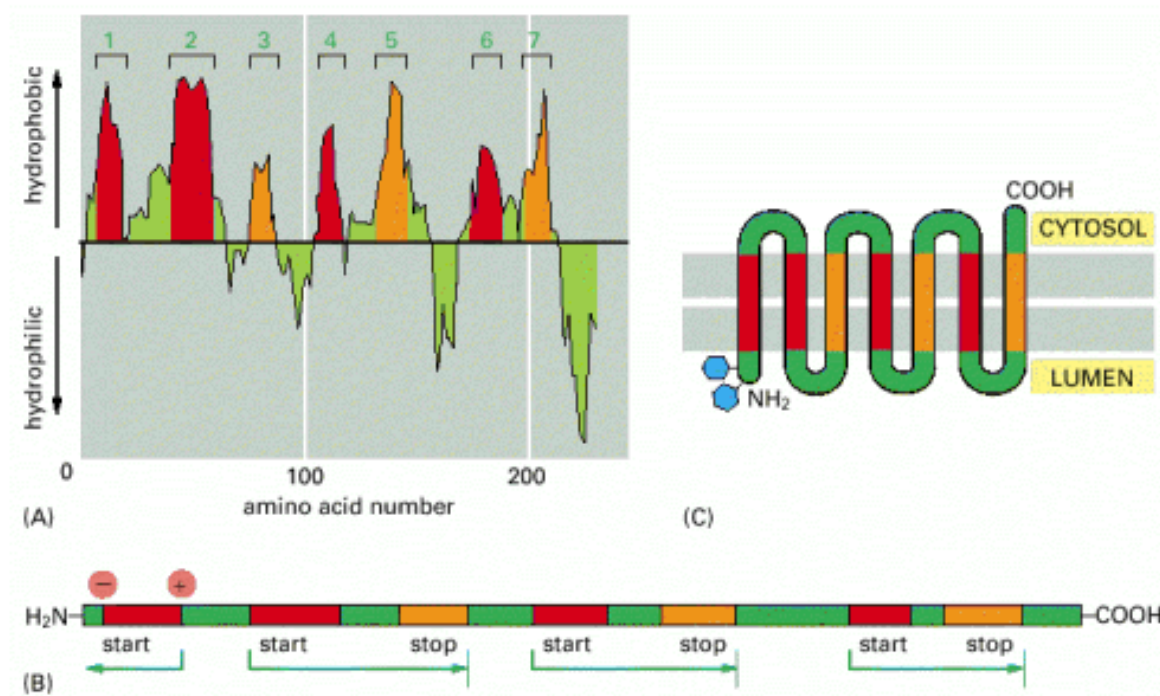
# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- Kombinacija Start-transfer signala i Stop-transfer signala određuje topologiju transmembranskih proteina sa dva prolaza kroz membranu
- Unutrašnja ER signalna sekvenca deluje i kao start transfer signal i inicira transfer C-kraja proteina. Pošto stop-transfer sekvenca uđe u translokator, translokator postavlja ovu sekvencu lateralno u membranu.



# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- Kombinacija Start-transfer signala i Stop transfer signala određuje topologiju transmembranskih proteina sa više prolaza kroz membranu



Obrada proteina obuhvata:

- (1) Dodavanje i obadu ugljenohidratnih komponenti (glikozilacija) u ER i Goldžiju
- (2) Formiranje disulfidnih mostova u ER
- (3) Adekvatno uvijanje proteina i organizaciju proteina sa većim brojem subjedinica u ER
- (4) Specifično proteolitičko cepanje u ER, Goldžiju u sekretornim vezikulama

**Glikozilacija:**

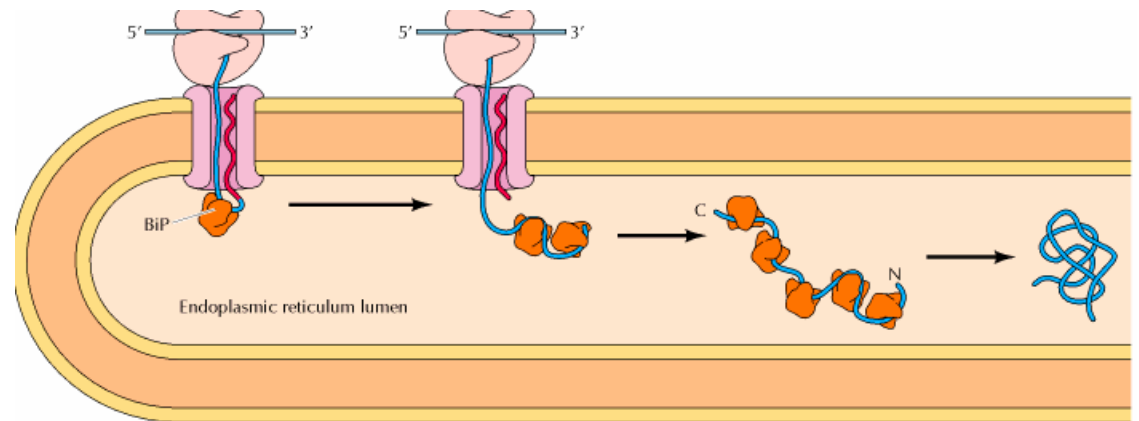
**O-glikozilacija** : preko OH grupe Serina i Treonina. Uglavnom prisutni u kolagenu i glikoforminu i uglavnom sadrže 1-4 UH jedinica

**N-glikozilacija** : preko NH<sub>2</sub> grupe Asparagina. Veći i kompleksniji oligosaharidi.

Posle inicijalne glikozilacije u ER, oligosaharidni lanac se modifikuje i u ER kao i u Goldžiju.

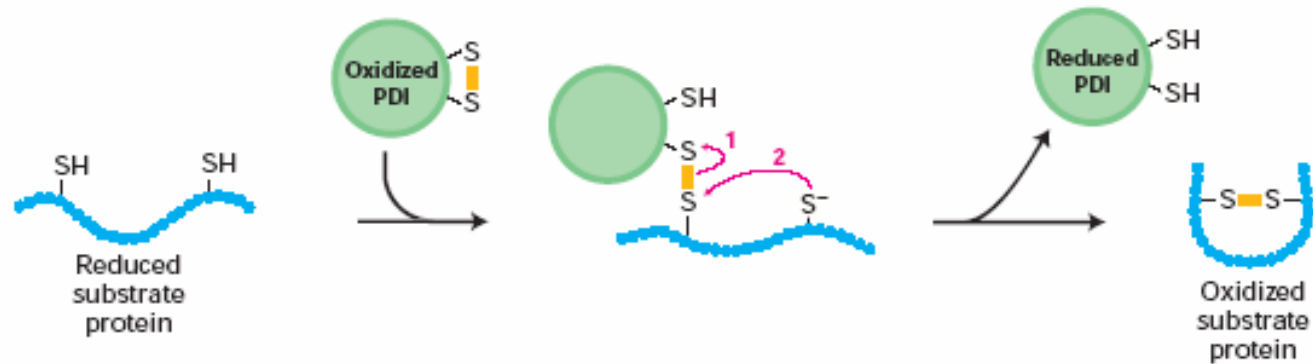
# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- Proteini koji će ostati u ER sadrže signal ER retencije (4 amino kiseline na C kraju)
- protein disulfid izomeraze (svi cisteini okrenuti ka EC prostoru ili lumenu organela su povezani disulfidnim vezama)
- šaperoni BiP (unutar ER)

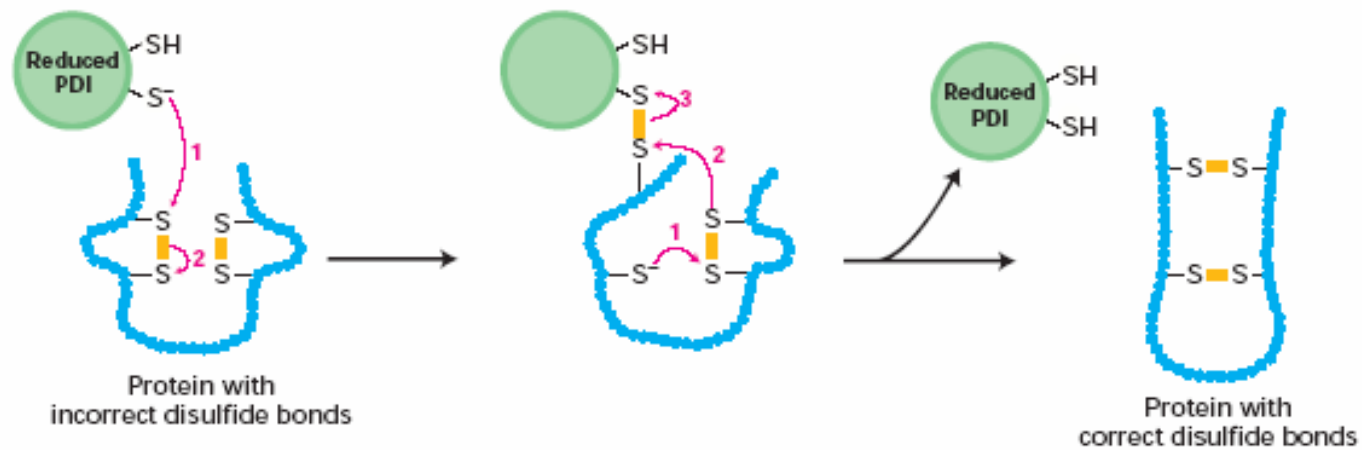


# Formiranje i rearanžiranje disulfidnih mostova - protein disulfid izomeraza

(a) Formation of a disulfide bond



(b) Rearrangement of disulfide bonds

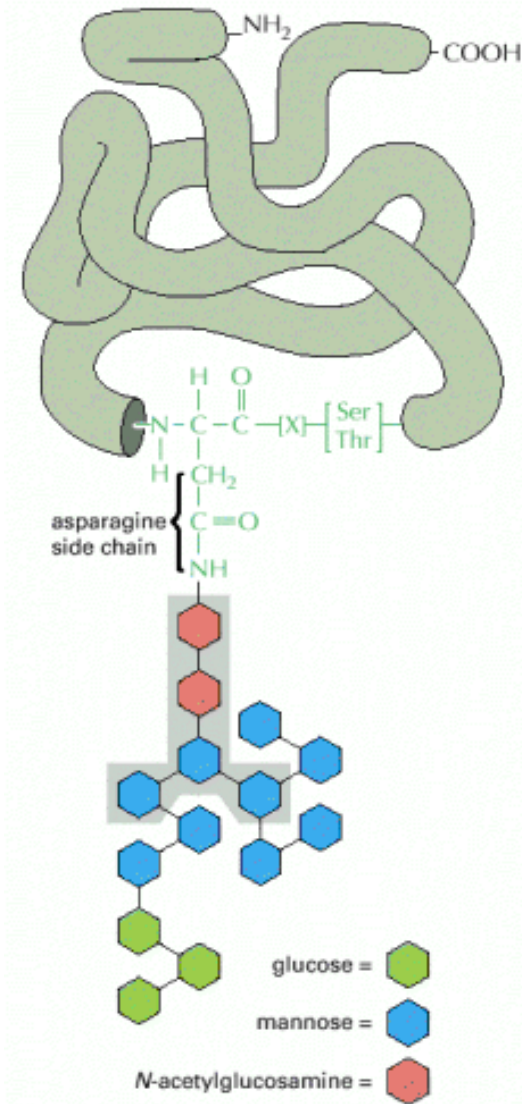




# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

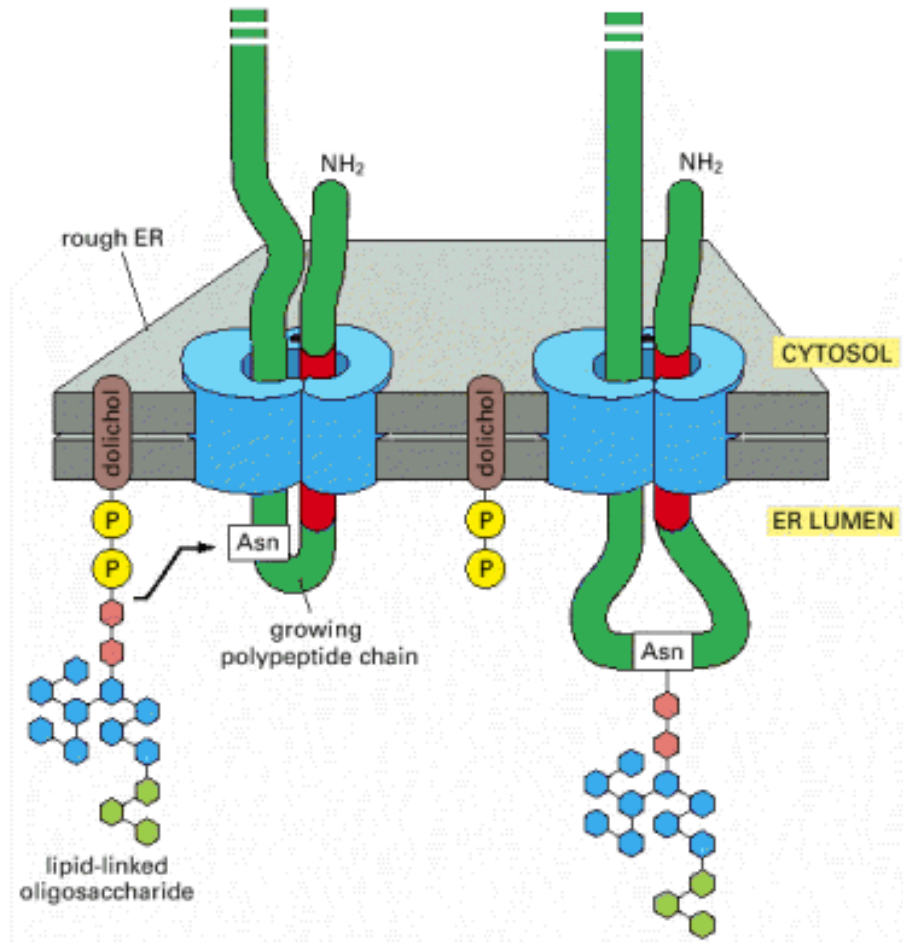
- Najveći broj proteina sintetisanih na granuliranom ER je **glikozilirano** dodavanjem zajedničkog **N-vezanog oligosaharida**

Pet šećera (sivo) predstavljaju osnovu ovog oligosaharida. Za mnoge glikoproteine, samo ovaj deo oligosaharida preživi dalju obradu koja se dešava u Goldži aparatu. Samo asparagini u sekvenci Asn-X-Ser i Asn-X-Thr ( X je bilo koja AK osim prolina) postaju glikozilirani. Ove dve sekvence se pojavljuju ređe u glikoproteinima nego u neglikoziliranim citosolnim proteinima; predpostavlja se da je to zbog činjenice da glikozilacija na većem broju mesta može da interferira sa zauzimanjem odgovarajuće konformacije proteina.

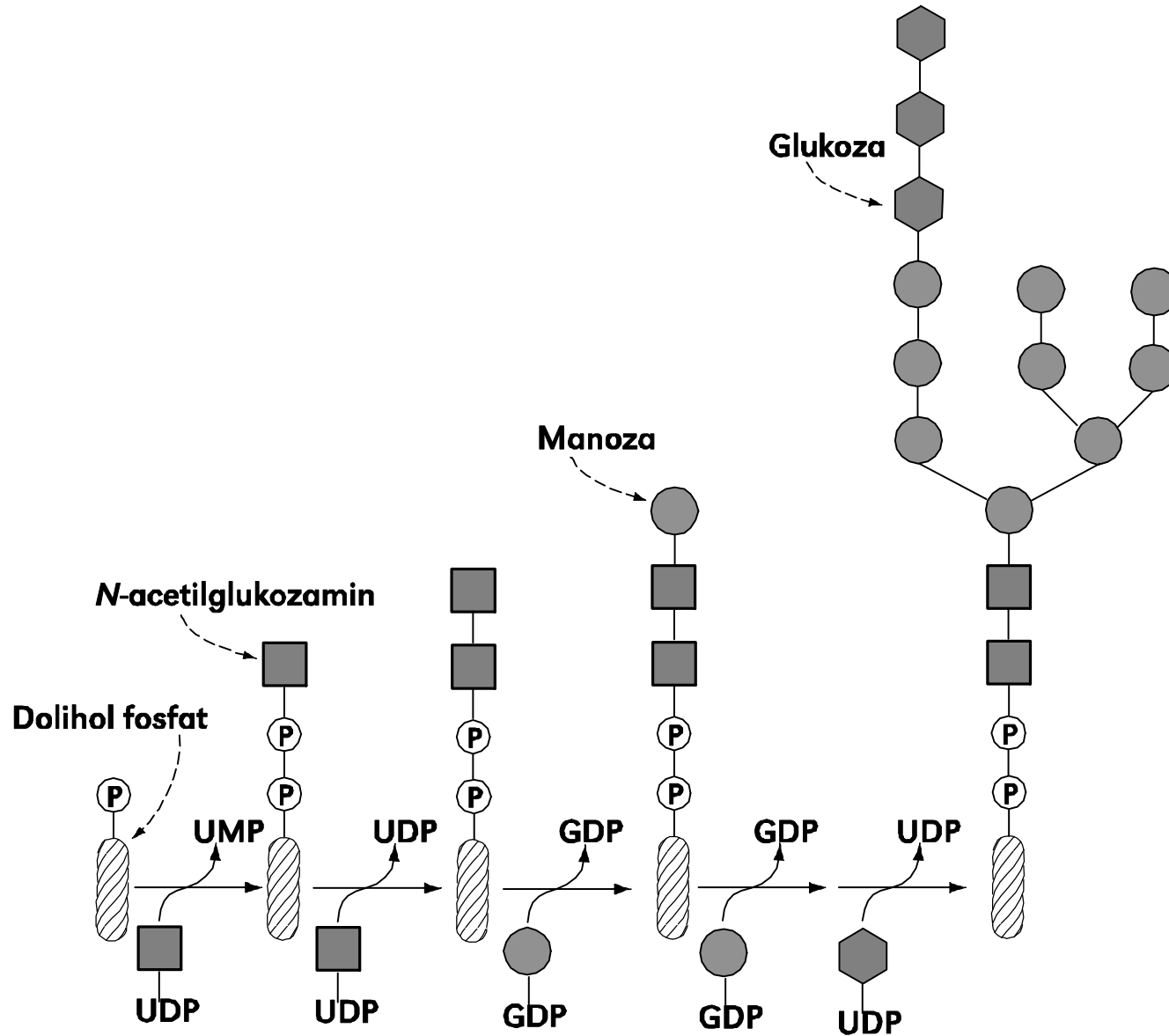


# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- Najveći broj proteina sintetisanih na granuliranom ER su **glikozilirani** dodavanjem zajedničkog N-vezanog oligosaharida
- Neposredno pošto se unese pp lanac, on se glikozilira na ciljnom Asparaginu. Prekursor oligosaharida se prenosi na Asn kao intaktna jedinica aktivnošću enzima, membranski vezanog *oligosaharid transferaze*. Kao i sa signalnom peptidazom, jedna kopija ovog enzima je vezana sa svakim proteinom translokatora u membrani ER.

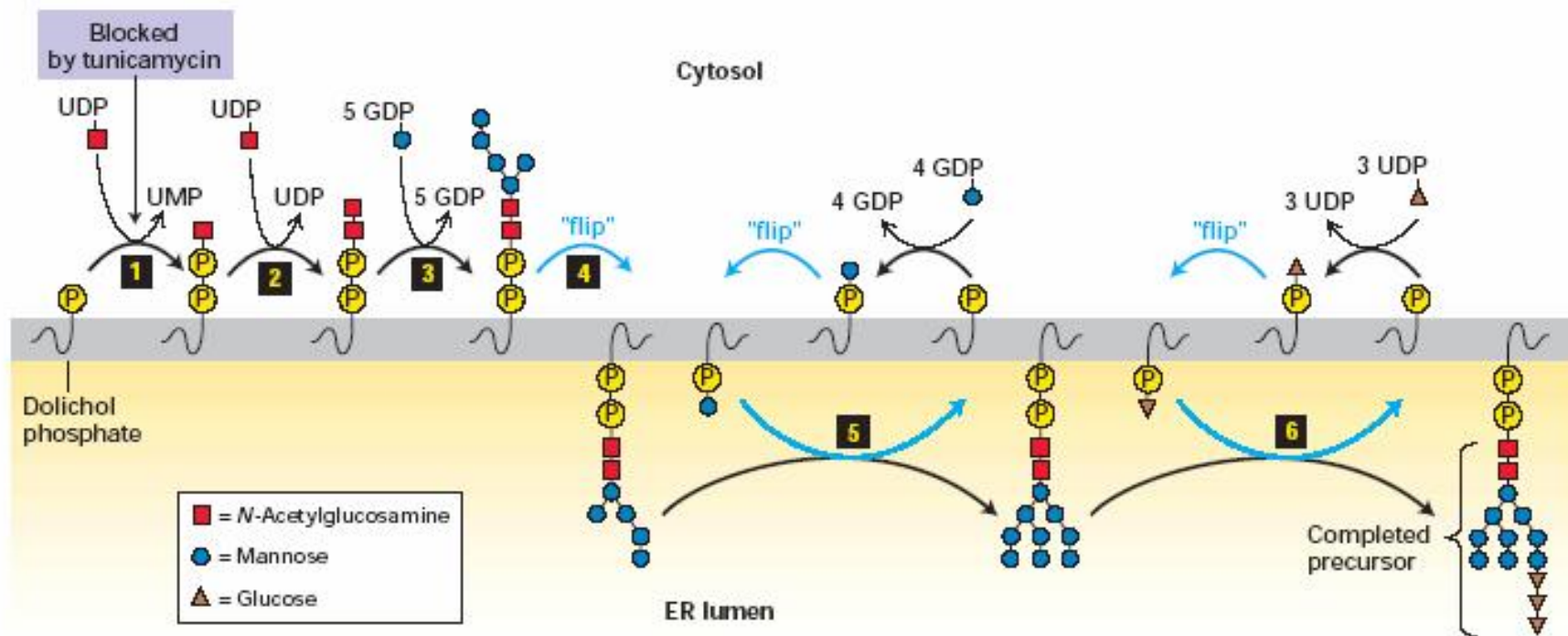


# Sinteza oligosaharidnih sekvenci na dolihol fosfatu

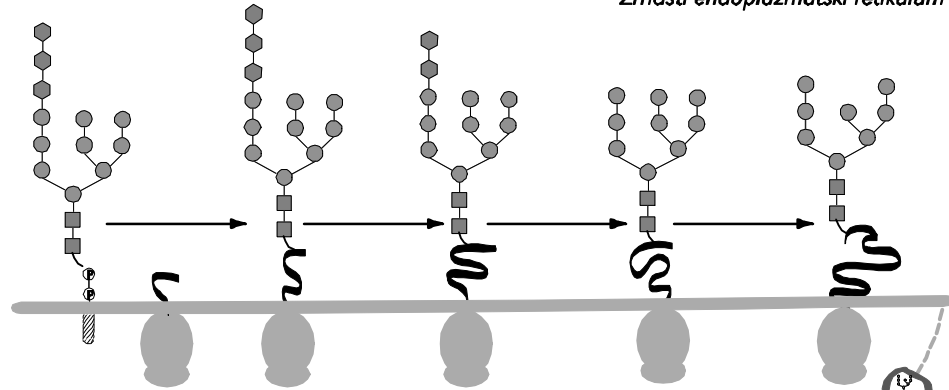


# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- Najveći broj proteina sintetisanih na granuliranom ER su **glikozilirani** dodavanjem zajedničkog N-vezanog oligosaharida



Zrnasti endoplazmatski retikulum



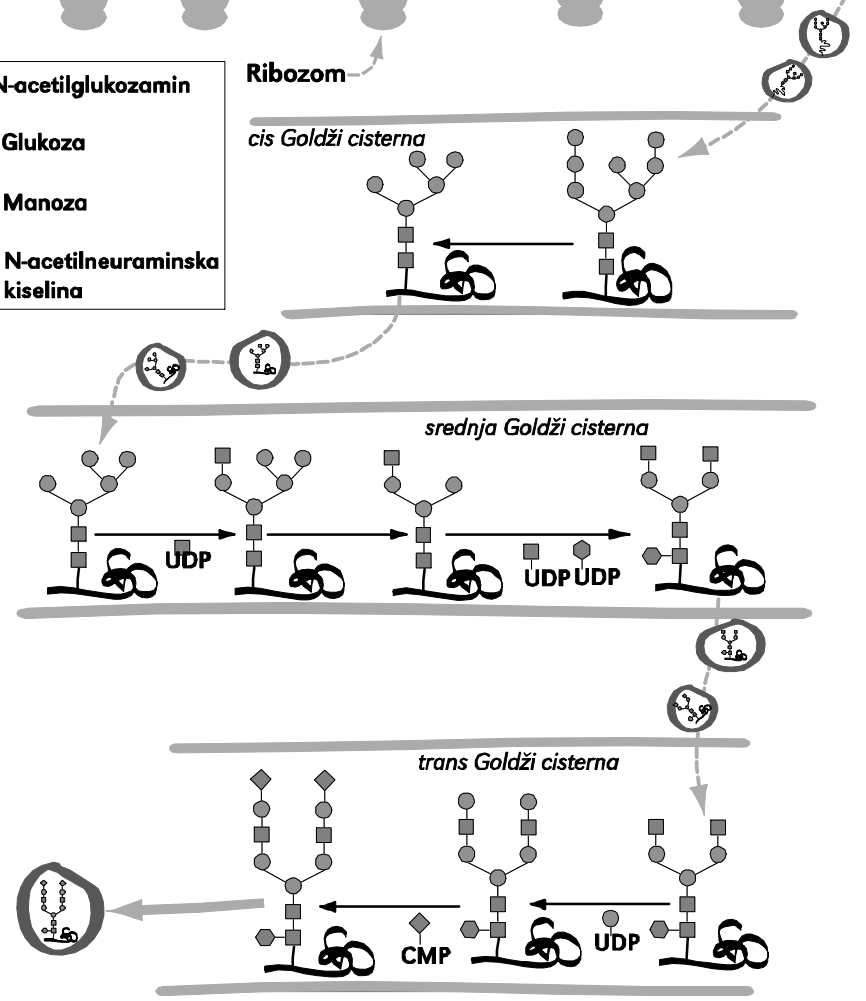
- N-acetilglukozamin
- UDP
- Glukoza
- UDP
- Manoja
- UDP
- ◆ N-acetilneuraminska
- CMP kiselina

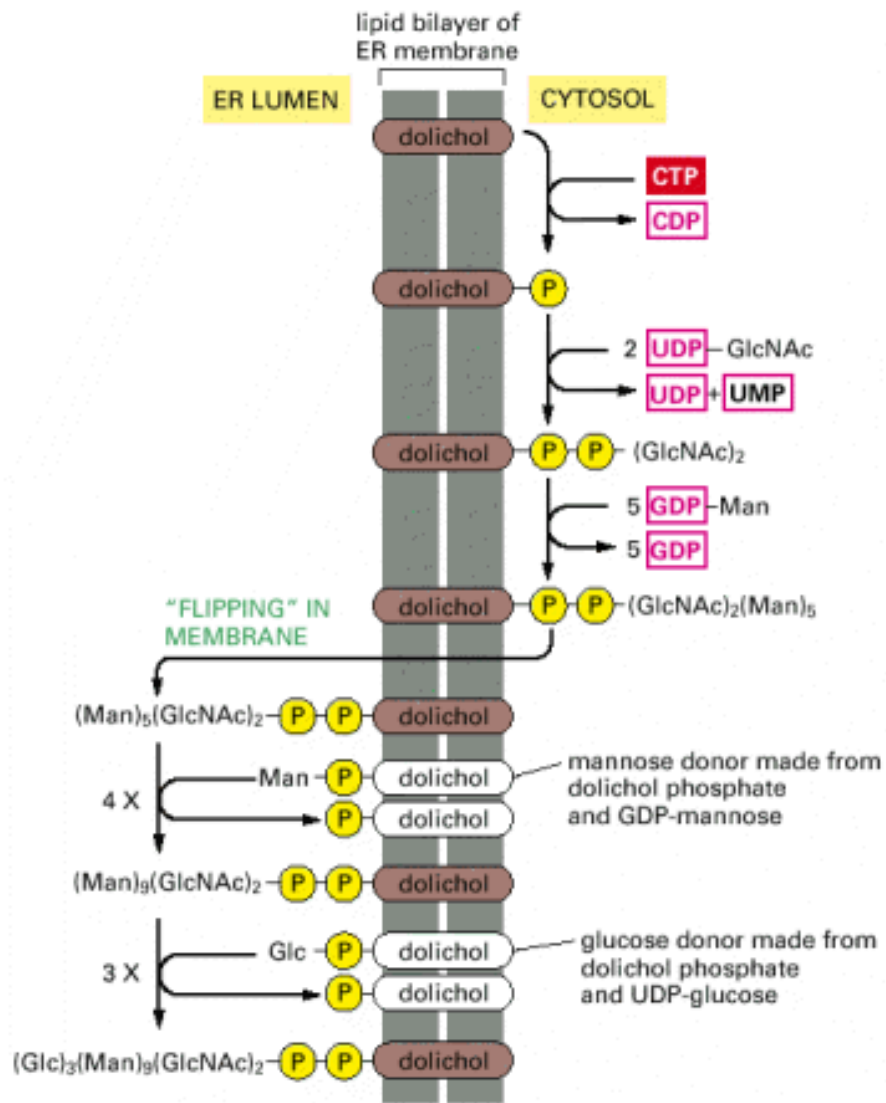
Ribozom

cis Goldži cisterna

srednja Goldži cisterna

trans Goldži cisterna





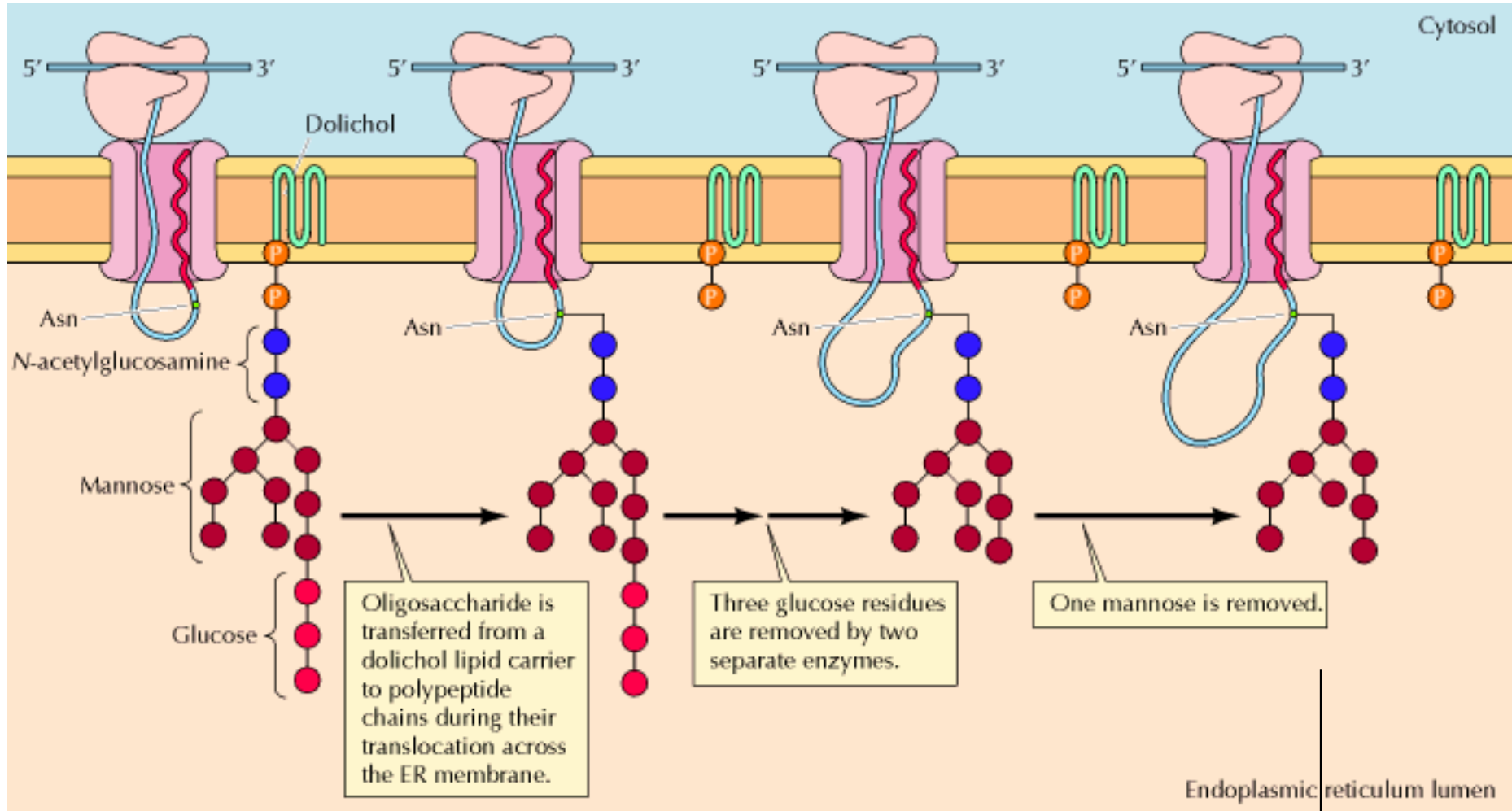
Sinteza prekursora oligosaharida vezanog za lipid, u membrani granuliranog ER. Oligosaharid se gradi dodavanjem jednog po jednog šećera na lipidni prenosilac DOLICHOL (poliizopren). On je dugačak i veoma hidrofoban. Sastoji se od 22 subjedinice od kojih svaka sadrži 5C atoma, i može da prođe najmanje 3 puta kroz lipidni dvosloj tako da je vezani oligosaharid usidren u membranu.

Prvi šećer je vezan za dolichol pomoću pirofosfatnog mosta. Ova visokoenergetska veza aktivira oligosaharid za njegov eventualni transfer iz lipidnog dvosloja na Asparagin u polipektinu u lumenu ER.

Sinteza oligosaharida počinje na citosolnoj strani ER i nastavlja se na luminalnoj strani pošto se (Man)<sub>5</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub> lipidni intermedijeri prenesu kroz dvosloj pomoću transportnog proteina.

Sve dalje reakcije glikozilacije na luminalnoj strani ER uključuju transfer sa dolichol-P-glukoze i dolichol-P-manoze; ovi aktivirani, u lipidni dvosloj uronjeni monosaharidi se sintetisaju iz dolichol fosfata i UDP-glukoze ili GDP-manoze na citosolnoj strani ER a potom se prenose kroz membranu ER.

# Glikozilacija proteina u ER



U cis-Goldži

## Uloga N-glikozilacije u oblikovanju proteina u lumenu ER

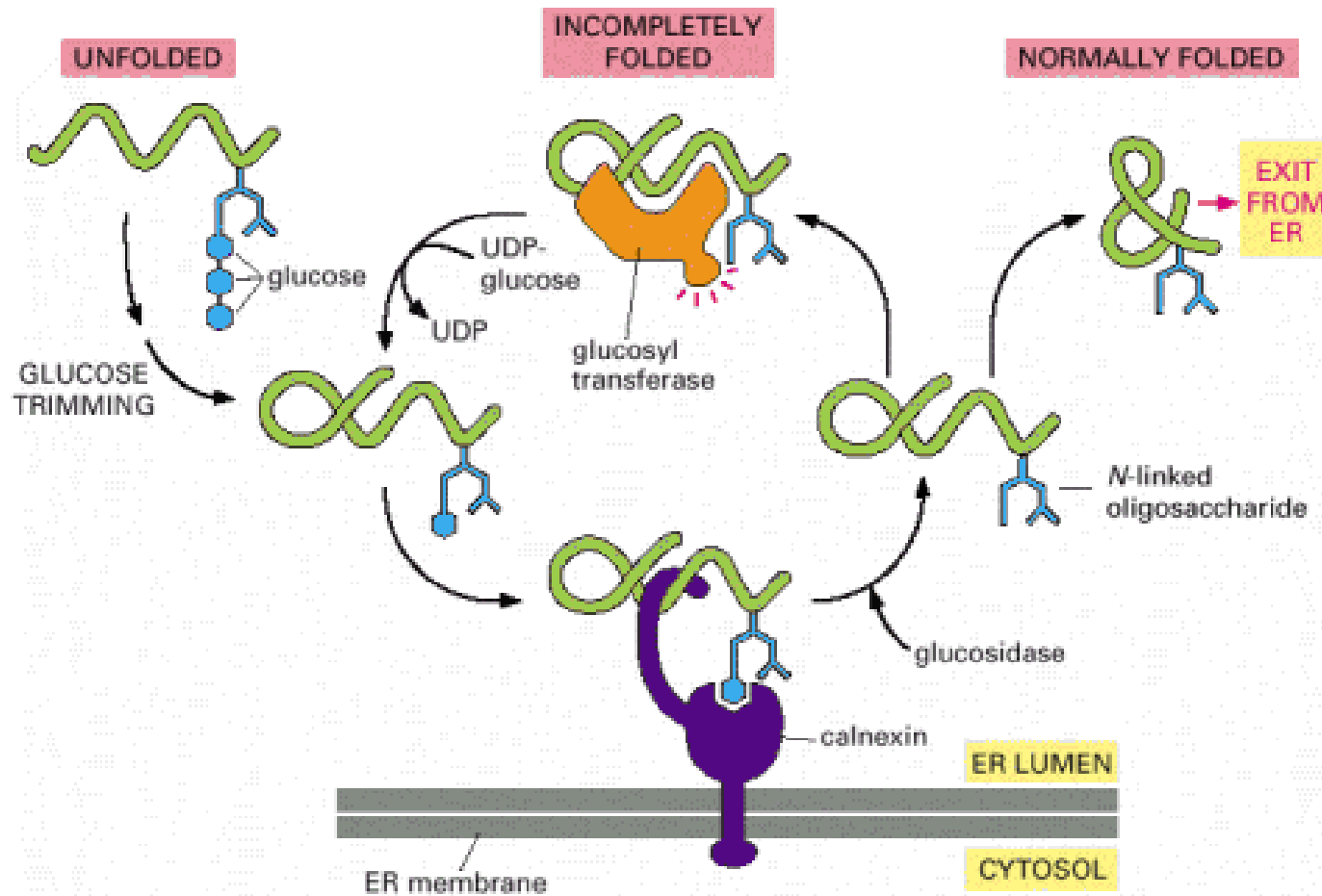
ER membranski vezan protein šaperon- kalneksin vezuje proteine koji nisu zauzeli definitivnu konformaciju a sadrže terminalno vezanu glukozu na N-vezanom oligosaharidu, koji zadržava protein u ER. Uklanjanje terminalne glukoze glukozidazom, oslobađa protein od kalneksina.

Glikozil transferaza je ključni enzim koji određuje da li protein zauzima odgovarajuću konformaciju ili ne. Ukoliko ne, enzim vrši transfer nove glukoze sa UDP-glukoze na N-vezani oligosaharid, tako da protein obnavlja svoj afinitet prema kalneksinu i zadržava se u ER. Ovakav ciklus se ponavlja dok protein ne zauzme odgovarajuću konformaciju.



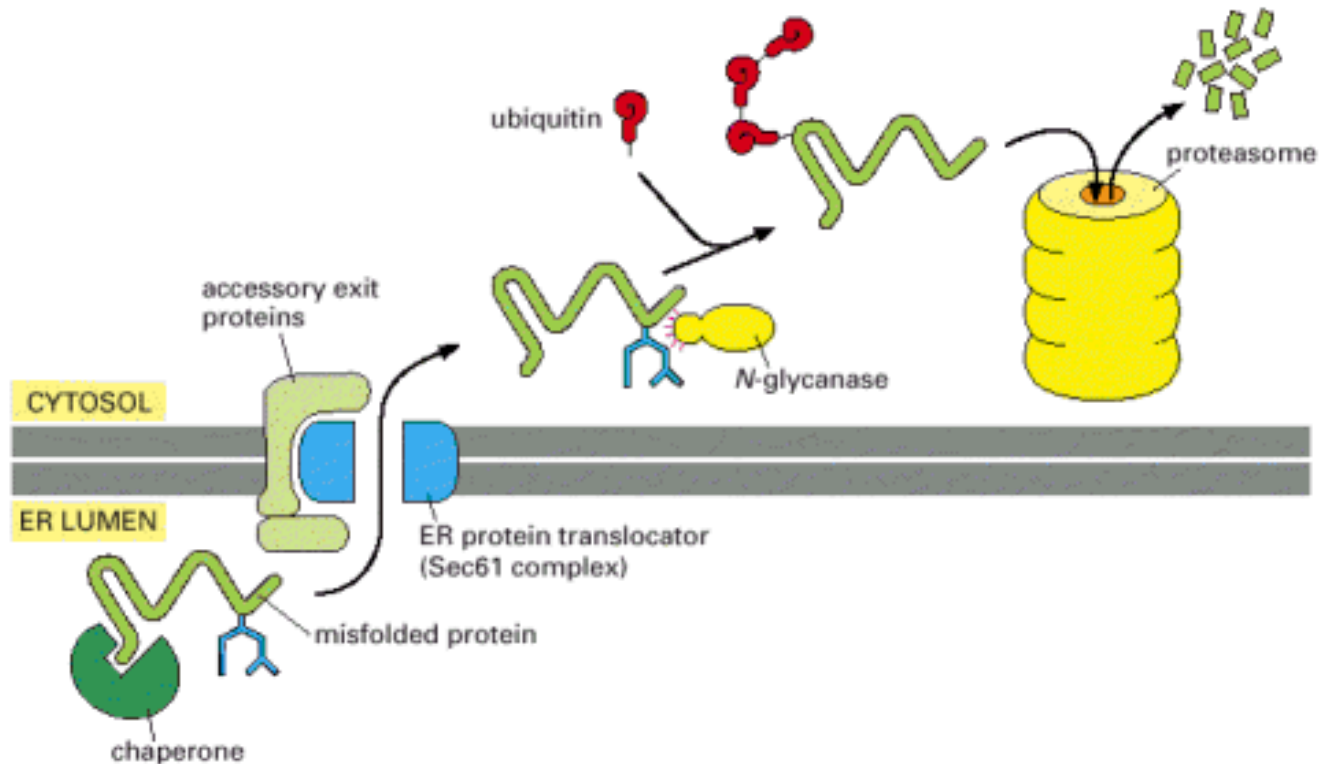
# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- Oligosaharidi se koriste kao markeri stanja uvijanja proteina



# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

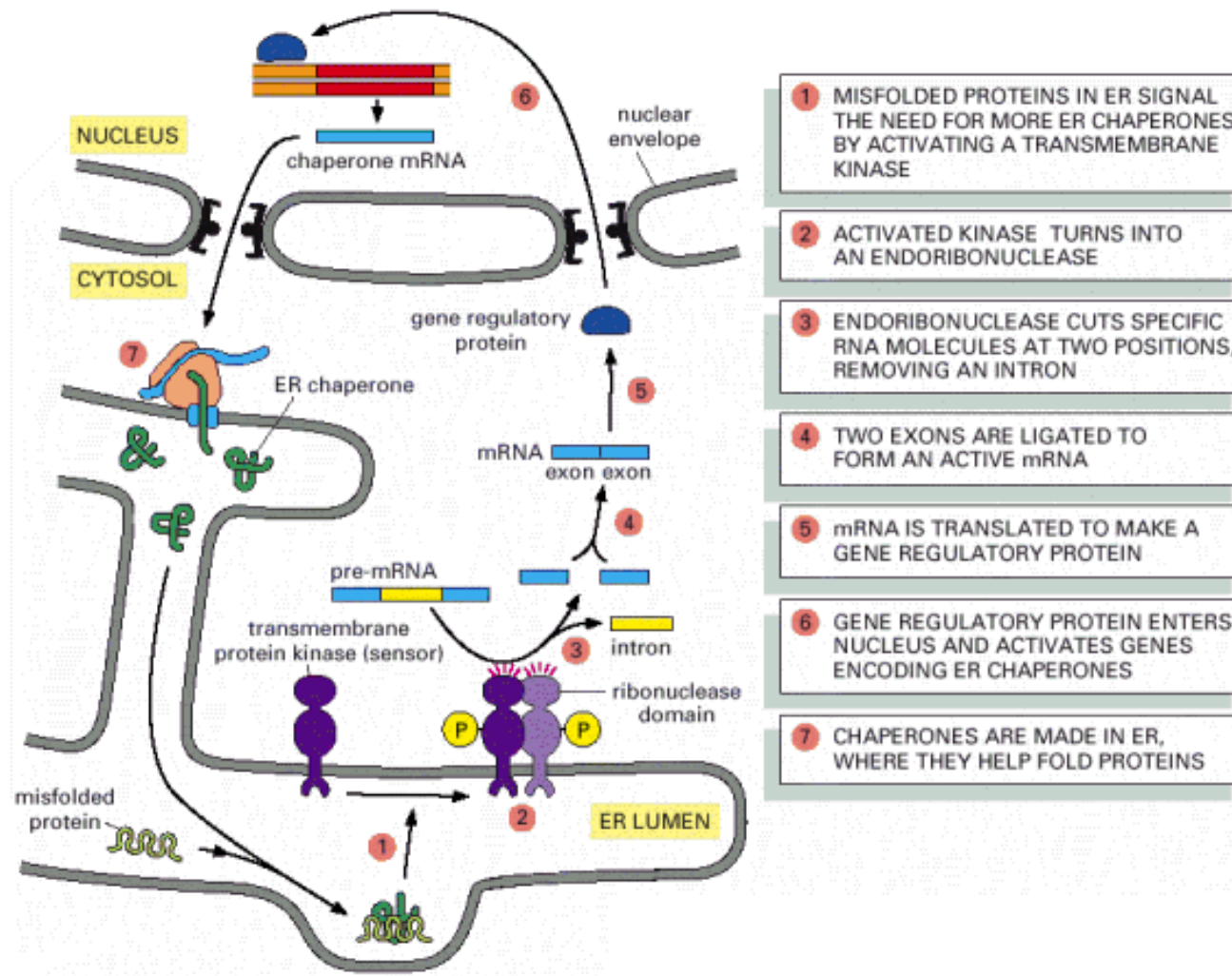
- Neadekvatno uvijeni proteini se eksportuju iz ER i razgrađuju u citosolu



Pogrešno oblikovani solubilni proteini ER, membranski proteini- transportuju se kroz iste translokatore u citosol (pomoćni proteini) gde podležu procesima deglikozilacije, ubikvitinacije i proteolizi u proteozomima.

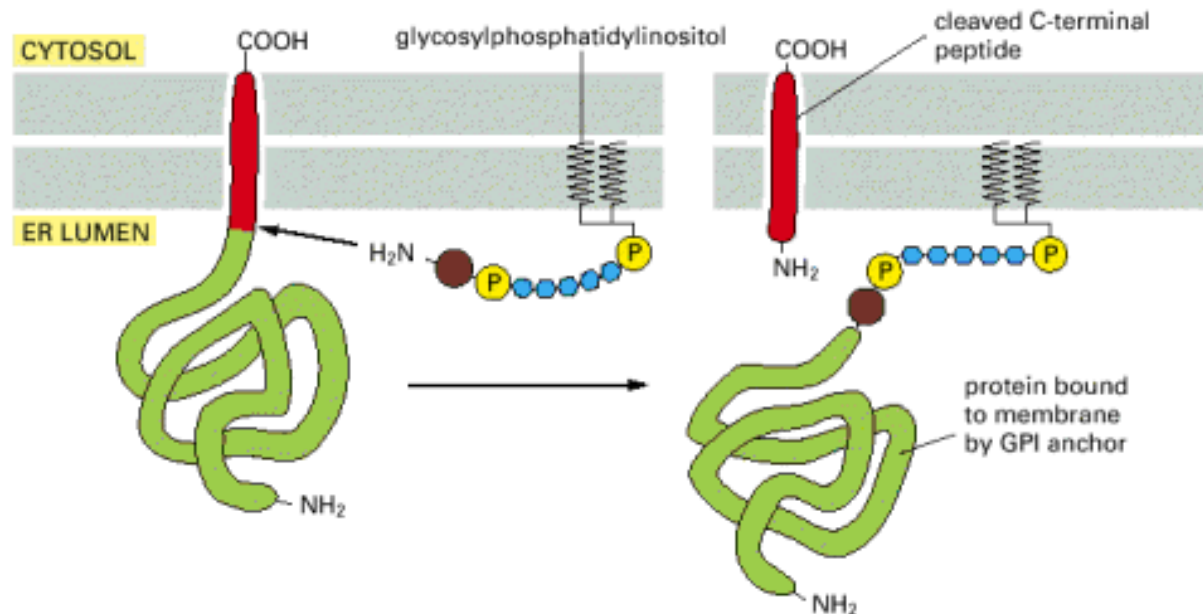
# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- Neadekvatno uvijeni proteini stimulišu transkripciju gena za citosolne šaperone

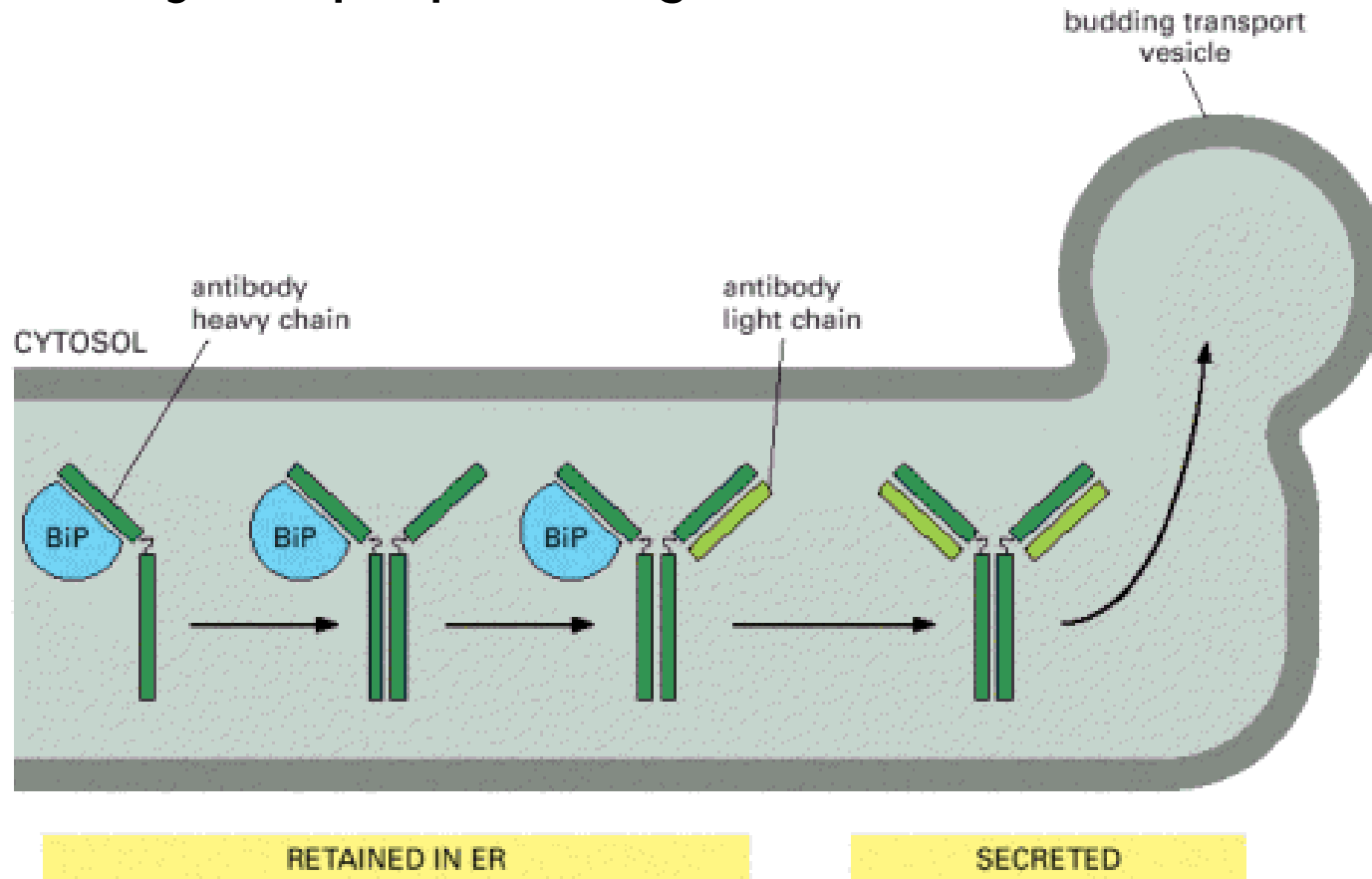


# Uloga ER u sintezi i modifikaciji proteina

- Neki proteini plazma membrane dobijaju **glikozilfosfoinozitolno sidro na C kraju** proteina
- Neposredno po završenoj sintezi proteina, prekursor proteina ostaje usidren u membranu ER preko C-terminalne hidrofobne sekvence od 15-20 AK. Ostatak pp lanca je u lumenu ER. Za manje od 1. minuta enzim u ER seče protein i oslobađa ga od C-terminalnog dela i simultano ga vezuje za C-terminalnu amino grupu GPI intermedijera. Signal koji diktira ovu modifikaciju se nalazi unutar C-terminalne hidrofobne sekvence na nekoliko AK od luminalne strane membrane ER. Kako je nova veza kovalentna, protein ostaje usidren u membrani.



# Zadržavanje nepotpuno organizovanih molekula At u ER

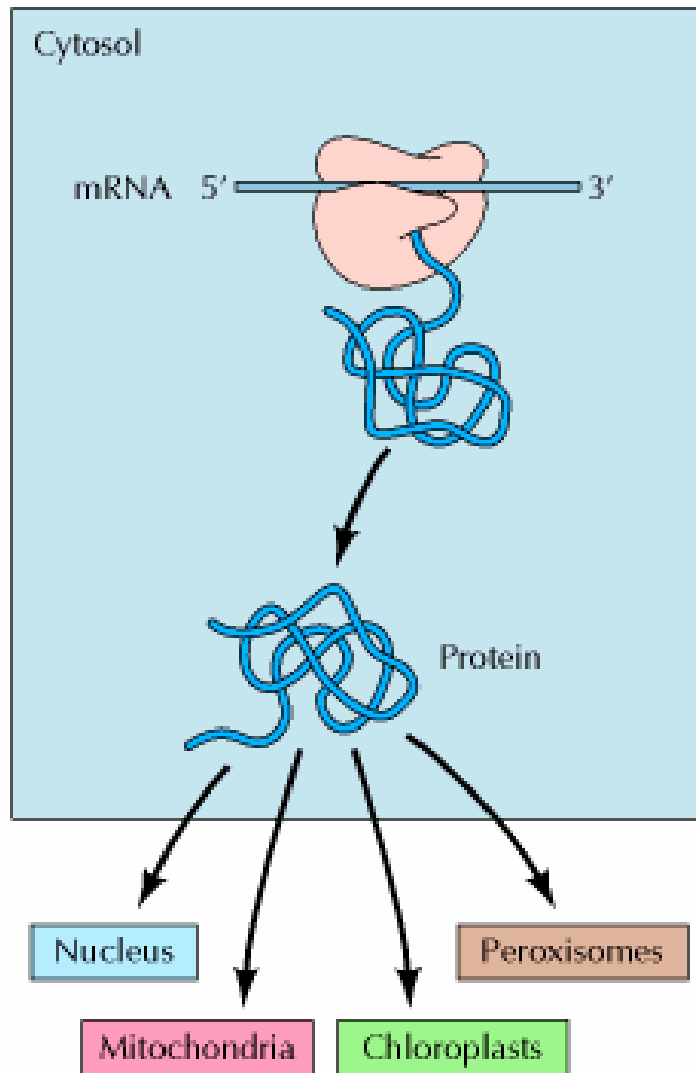


Dva laka i dva teška lanca At se povezuju u ER.

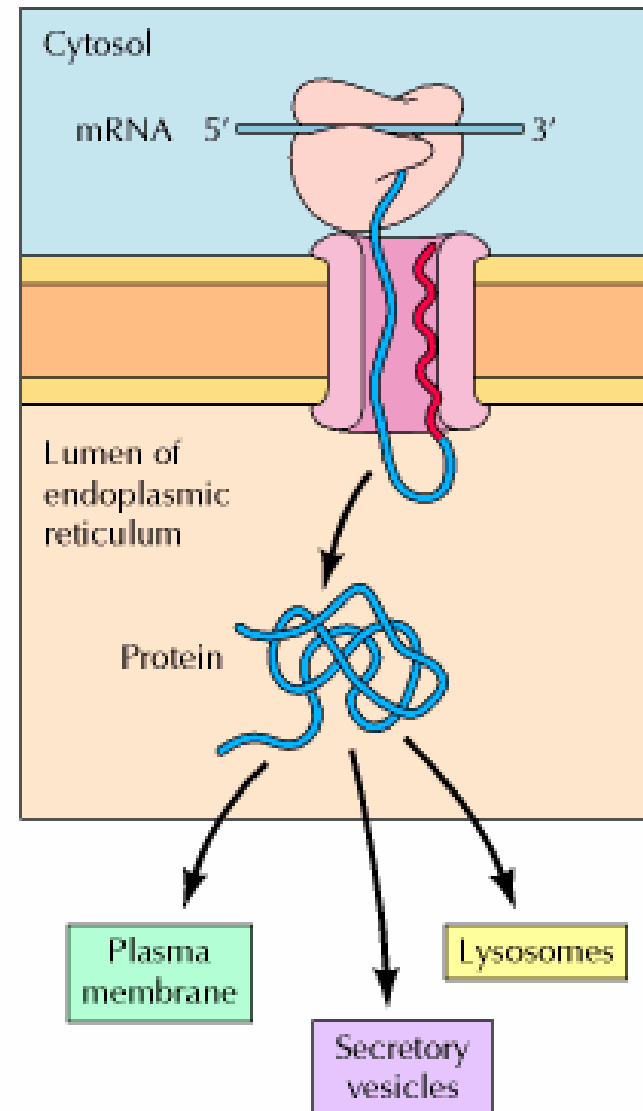
Šaperon BiP vezuje sve nepotpuno sastavljena At. Tako samo adekvatno organizovana At mogu da se sekretuju iz ER.

# Sortiranje proteina

Free ribosomes in cytosol

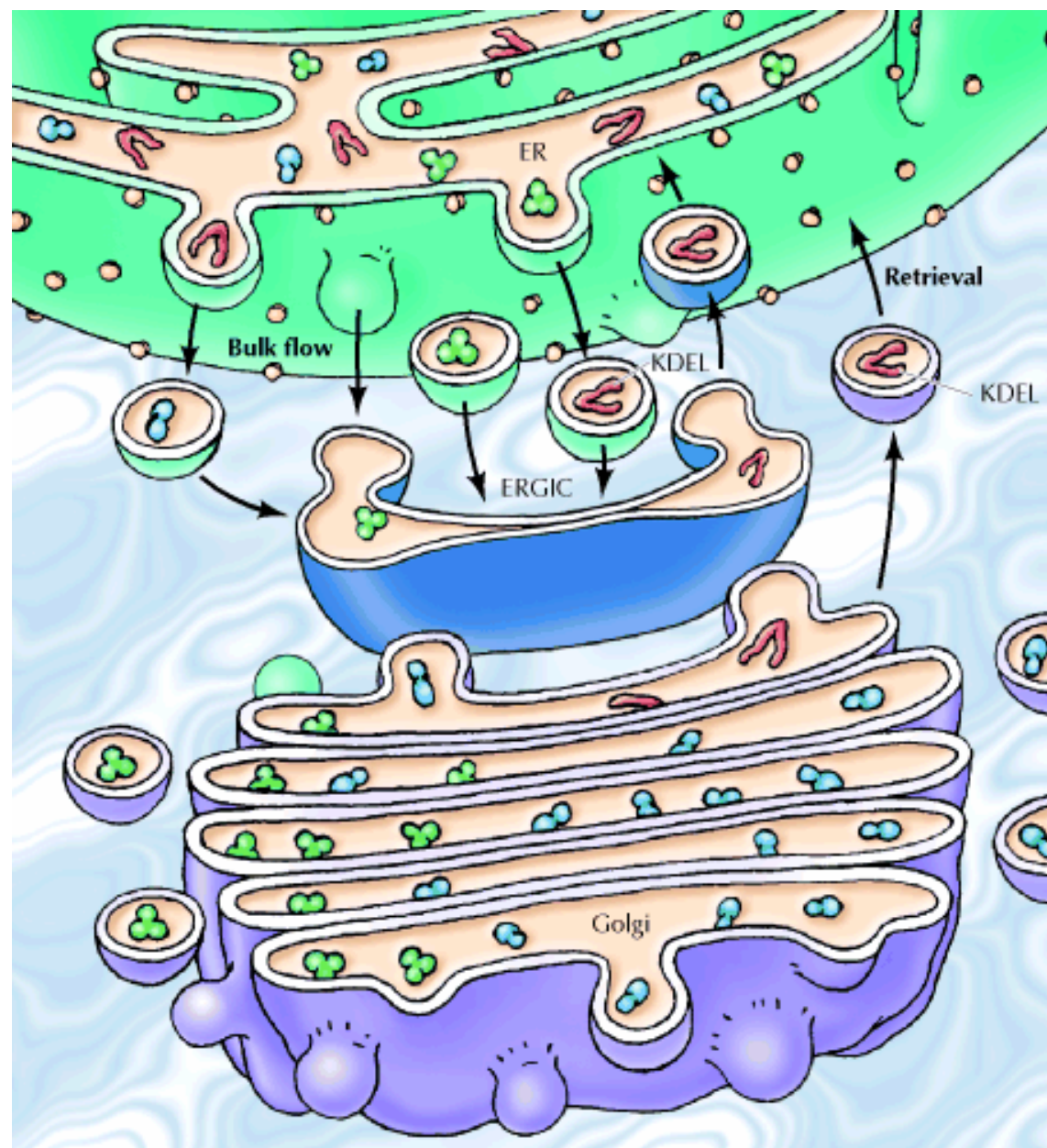


Membrane-bound ribosomes



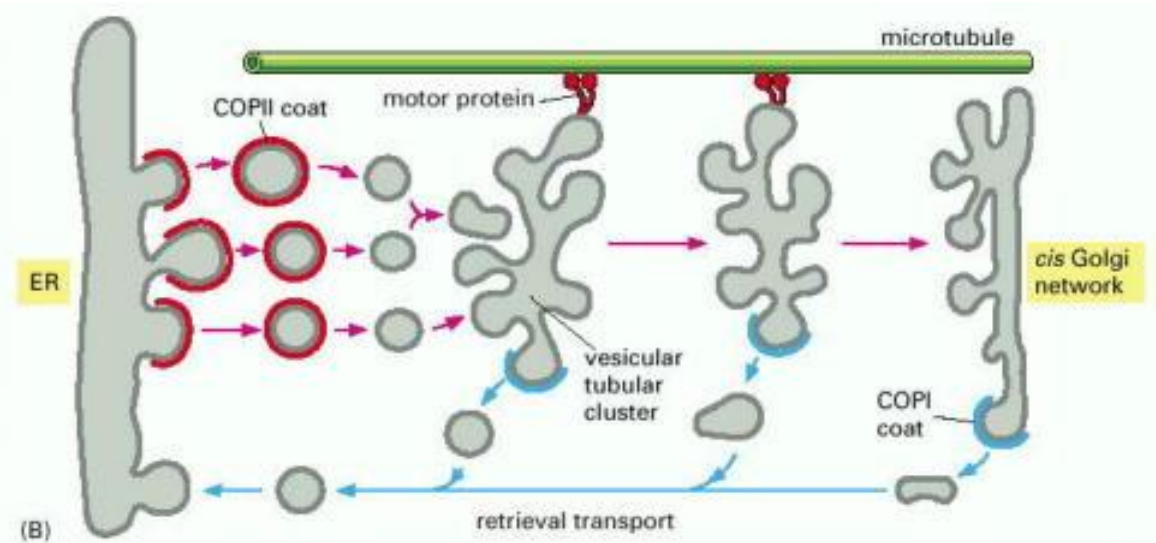
Ukoliko je sudbina proteina da **ostane u lumenu ER**, onda je on na svom C-terminalnom kraju obeležen sekvencom **Lys-Asp-Glu-Leu** (KDEL receptor). Ovi proteini kreću da se vezikulama transportuju ka Goldžiju (sekretorna aktivnost ER), ali se odgovarajućim receptorima na graničnoj površini ER i Golžija (**region ERGIC**) ili na samom Goldžiju oni prepoznaju i selektivno vraćaju nazad u ER.

# Selekcija proteina koji ostaju u lumenu EPR

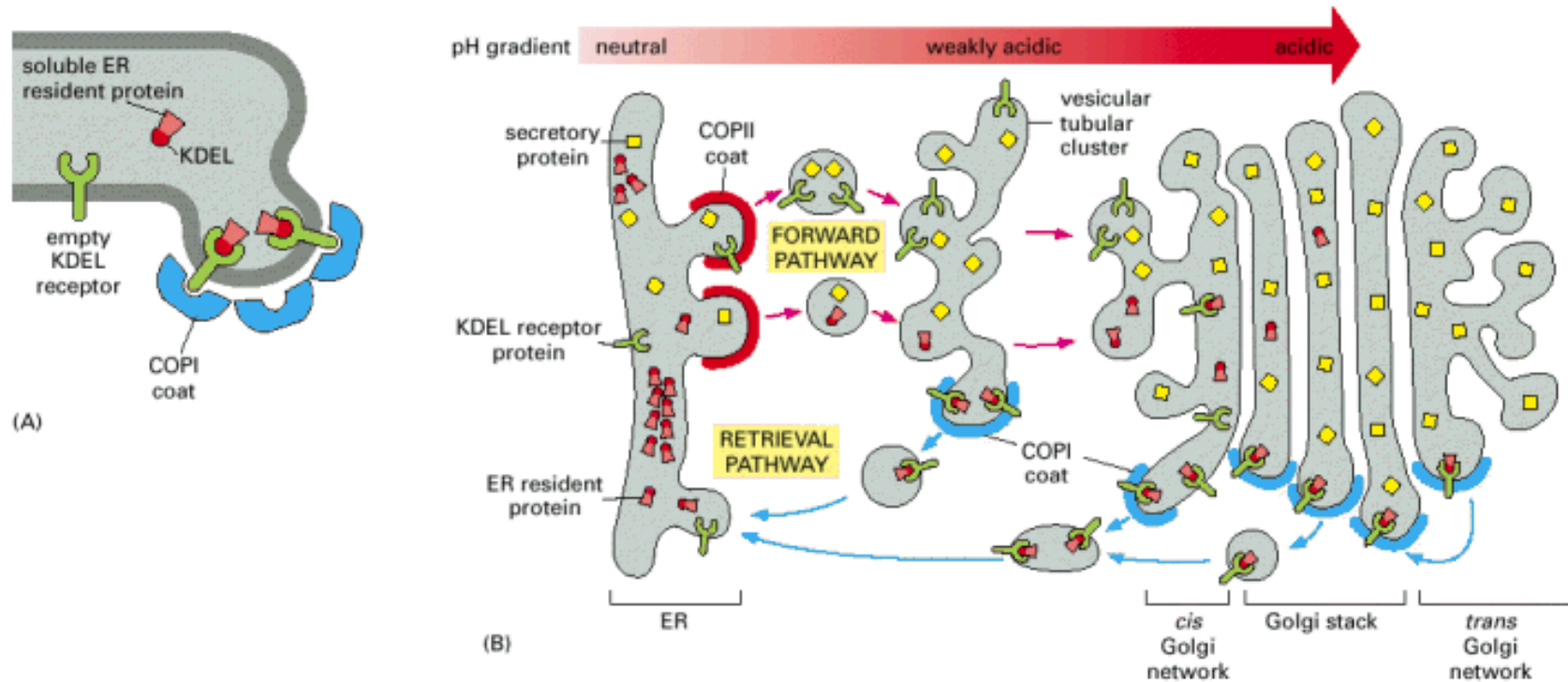




# Vezikularni transfer iz ER u Goldži



# Model vraćanja ER proteina



Ovi proteini koji "beže" iz ER se vezikularnim transportom vraćaju u ER.

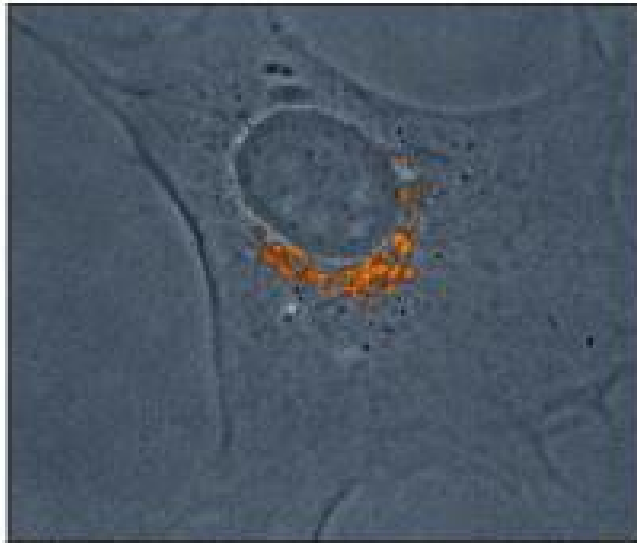
KDEL receptor se nalazi na vezikulama Goldži aparata, prihvata salubilne ER proteine i prenosi ih u COPI -obložene transportne vezikule kojim se vraćaju nazad u ER. U kiselom pH, KDEL može da menja konformaciju pa time povećava afinitet prema COPI vezikulama.

U neutralnom pH ER, ER proteini disosuju sa KDEL receptora, koji se tada vraća u Goldži gde se dalje koristi.

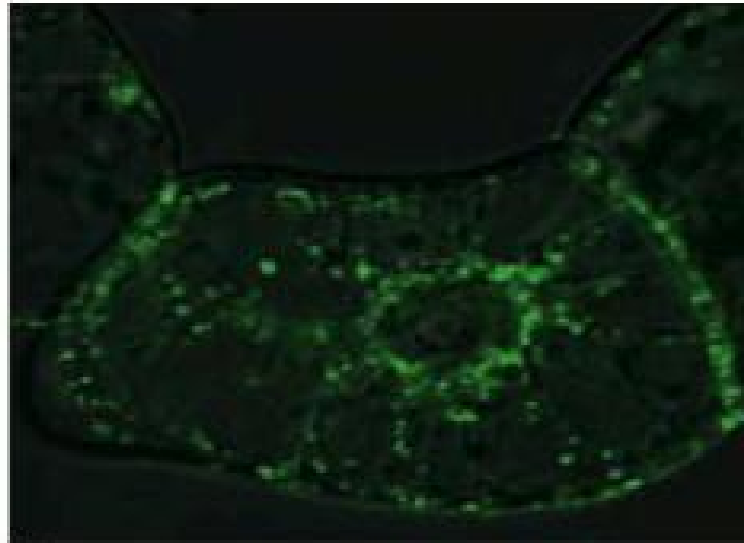
# Obrada proteina u Goldži aparatu



# Goldži kompleks



(A)



(B)

Goldži kompleks učestvuje u modifikaciji proteina nastalih u GER i u sortiranju i raspoređivanju ovih proteina u lizosome, sekretorne vezikule, ili plazma membranu.

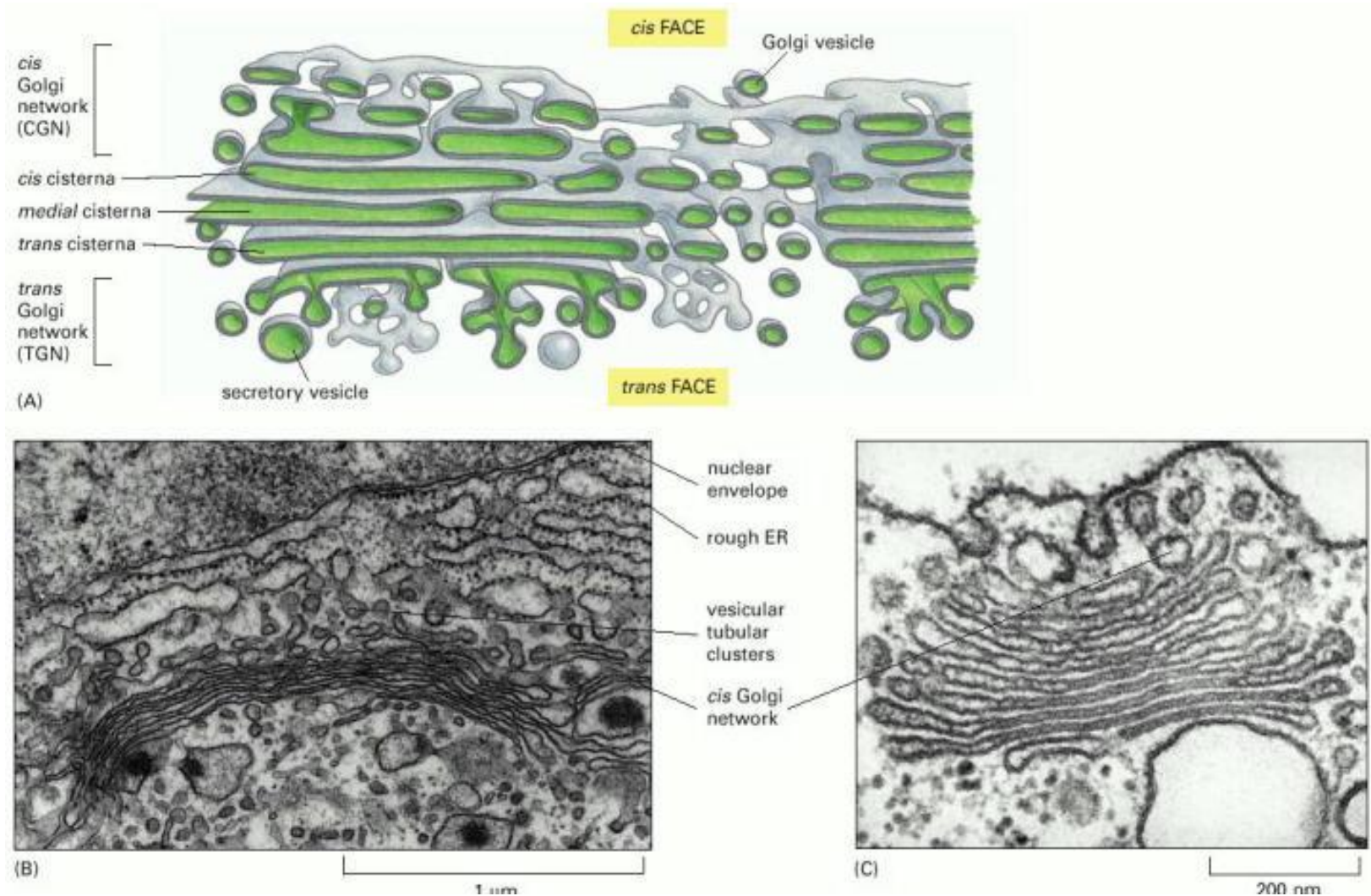
Naročito je zastupljen u ćelijama koje su specijalizovane za sekreciju

Sastoji se od izvijenih naslaganih spljoštenih vezikula (cisterni) u citoplazmi koji se, uopšteno, deli u tri odeljka :

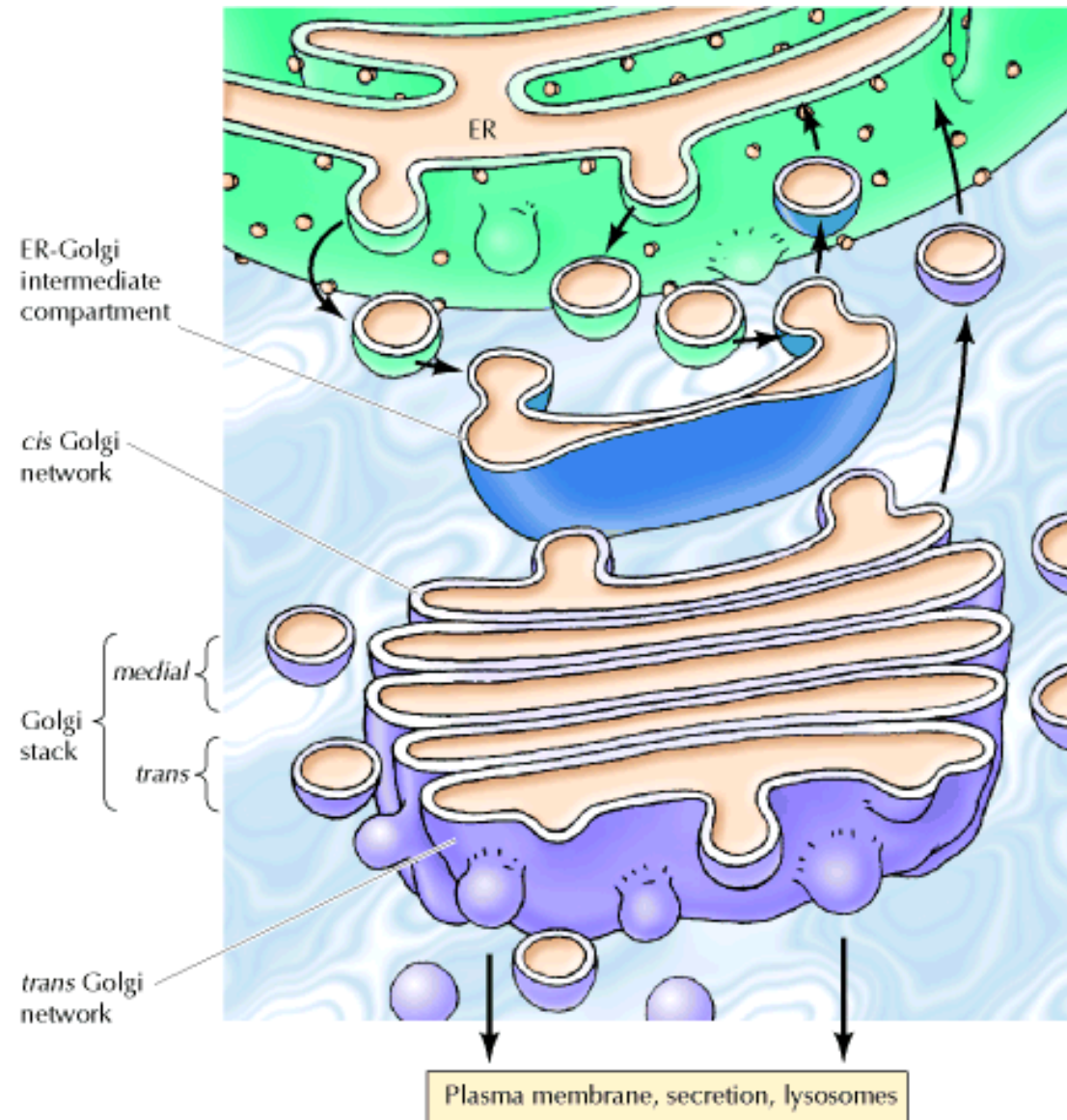
*cis-Goldži mreža*, često konveksna i okrenuta ka jedru;

*medijalni Goldži slog*; i

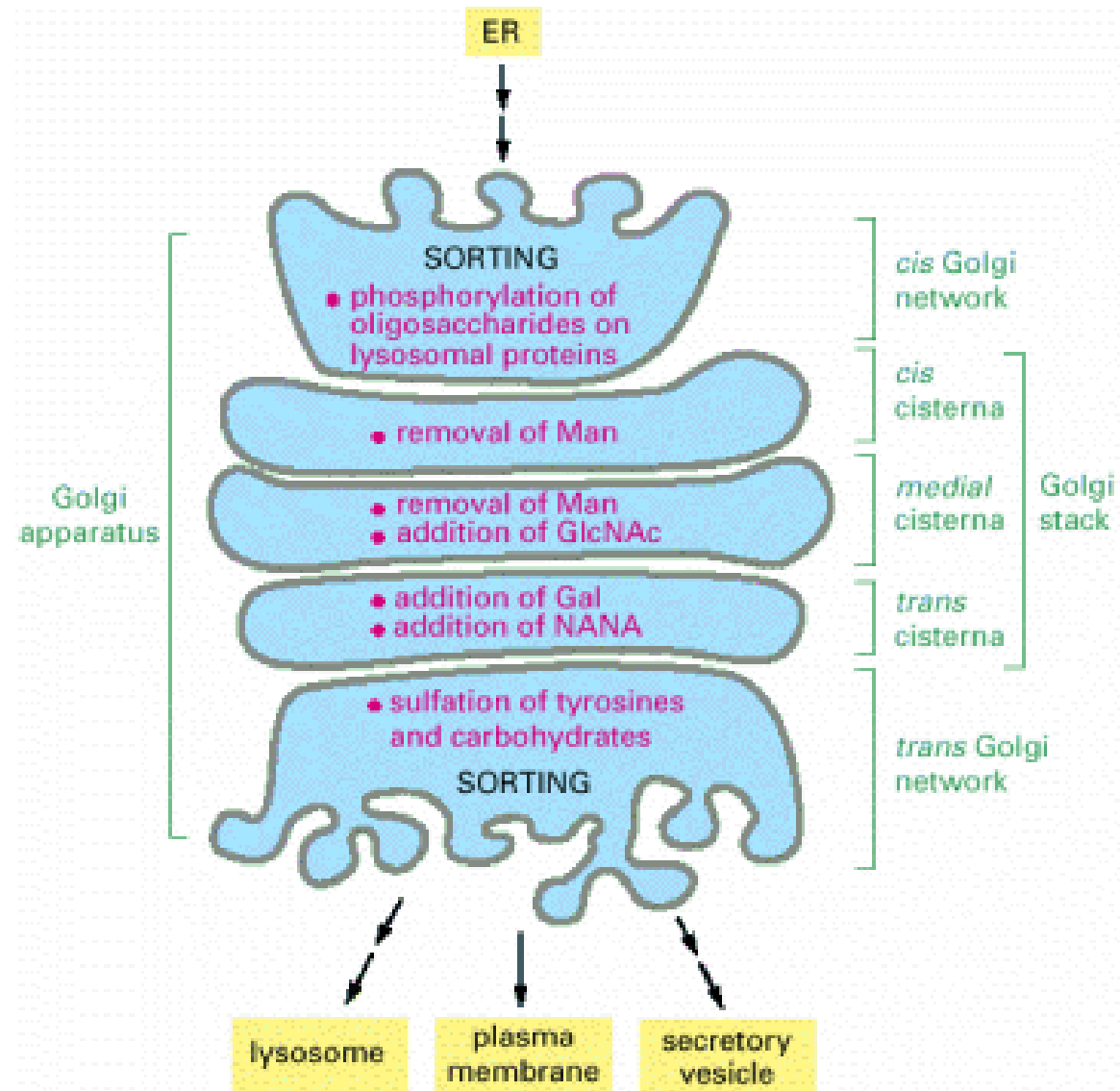
*trans Goldži mreža*, koja je okrenuta ka plazma membrani.



Goldži aparat (Goldži kompleks) – prihvata proteine iz ER koji se dalje obrađuju i sortiraju radi usmeravanja ka njihovom krajnjem odredištu u ćeliji - lizozomima, plazma membrani, ili se sekretuju iz ćelije. U Goldži aparatu se sintetišu, glikolipidi i sfingomijelin.



# Funkcionalna kompartmentalizacija Goldži aparata

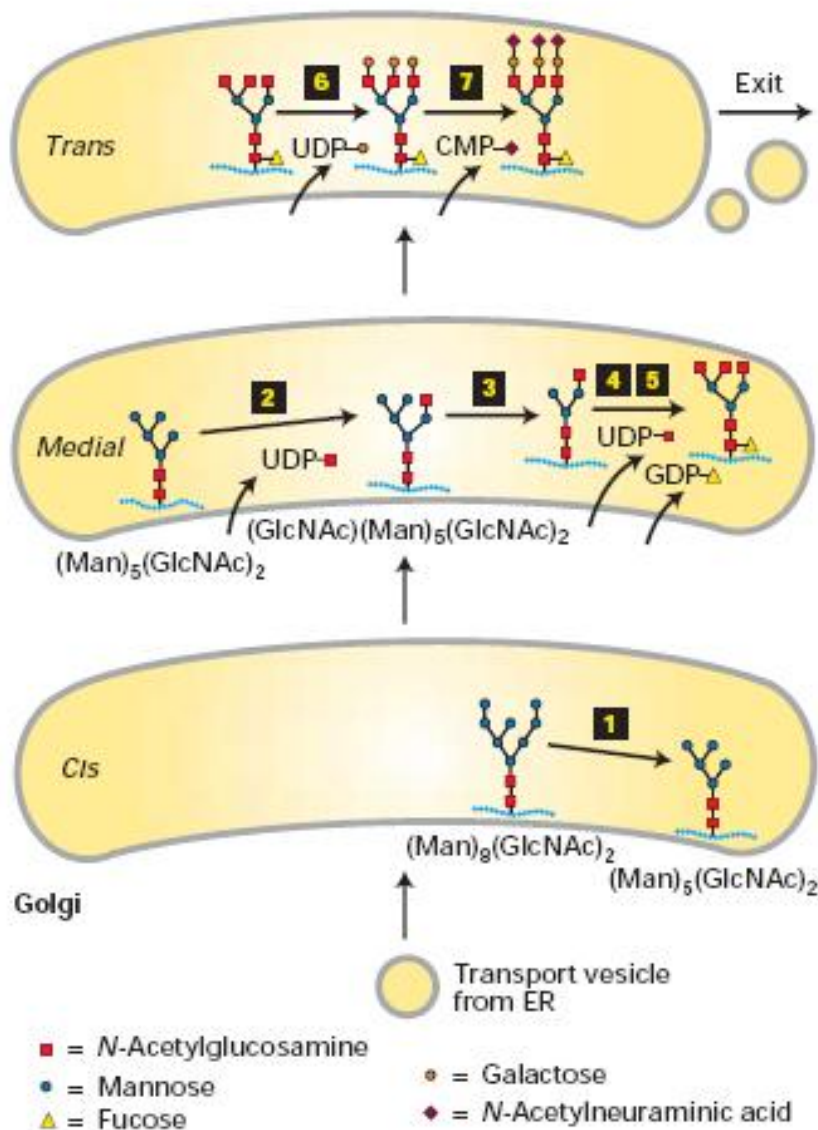


- **Obrada proteina u Goldži kompleksu podrazumeva modifikaciju i sintezu UH grupa glikoproteina.**
  - modifikacija *N*-vezanih oligosaharida koji su dodati proteinima u ER (u ER proteinima se dodaje oligosaharid od 14 jedinica. Uklanjaju se 3 glukoza i jedan manozni ostatak dok je polipeptid još u ER.
- *N*-vezani oligosaharidi se obrađuju u Goldži aparatu preko reakcija koje se odvijaju određenim redosledom
  - Proteinima namenjenin sekreciji ili plazma membrani uklanjanju se 3 dodatna manozna ostatka. Sledi dodavanje *N*-acetilglukozamina, uklanjanje još dve manoze, dodavanje fukoze i još dva *N*-acetilglukozamina. Konačno, dodaju se 3 galaktoze i 3 ostatka sijalinske kiseline acid residues are added.

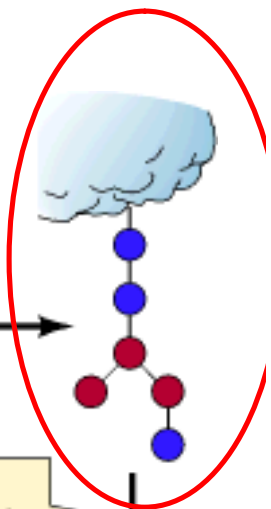
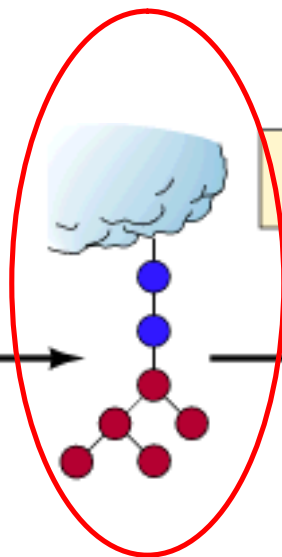
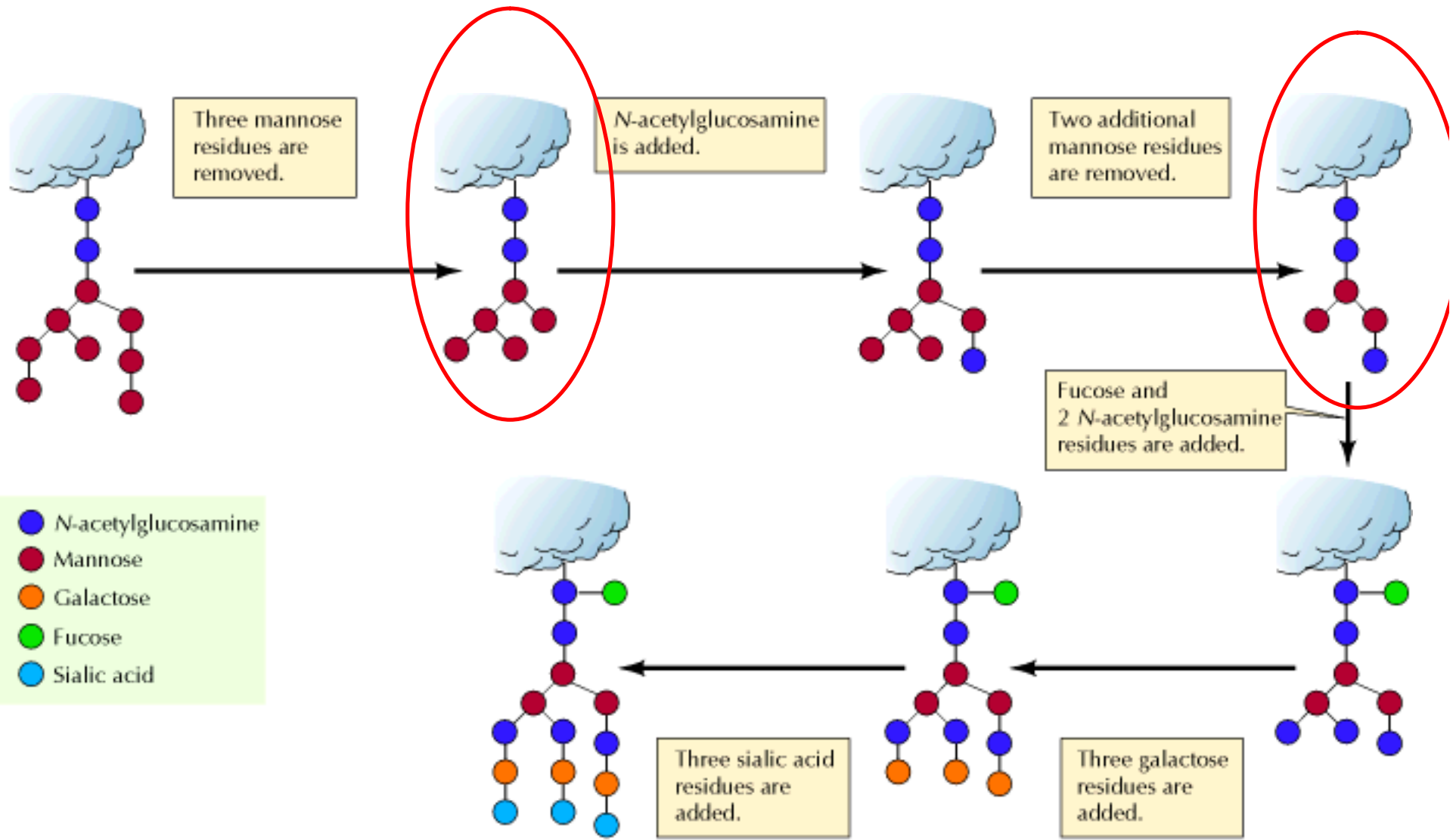
Različiti glikoproteini se modifikuju u različitoj meri tokom prolaska kroz Goldži kompleks, što zavisi od strukture proteina i broja enzima u Goldži aparatu koji učestvuju u njegovoj obradi, što zavisi od tipa ćelije



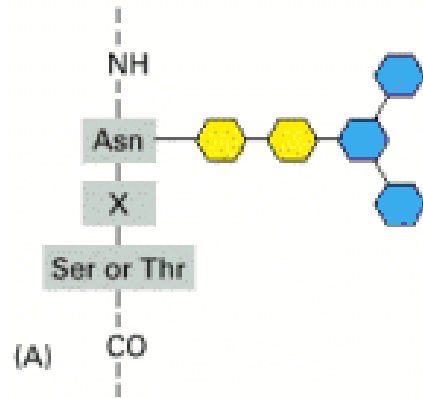
# Obrada *N*-vezanih oligosaharidnih lanaca na glikoproteinima u Goldži aparatu







- Nakon uklanjanja 3 Man ostatka u *cis*-Goldži cisterni (korak 1),
- protein prelazi u *medial*-Goldži, gde se dodaju 3 GlcNAc ostatka (koraci 2 i 4),
- uklanjaju se još 2 Man ostatka (korak 3), i
- dodaje fukozni ostatak (korak 5).
- Obrada se završava u *trans*-Goldži cisterni dodavanjem 3 Galakt ostatka (korak 6) i
- dodavanjem ostatka *N*-acetilneuraminske kiseline acid na svaki od Gal ostataka (korak 7).
- Specifične transferaze dodaju šećere na oligosaharide, jedan po jedan, od nukleotidnih prekursora šećera koji su uzeti iz citosola.



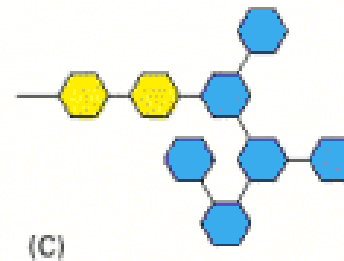
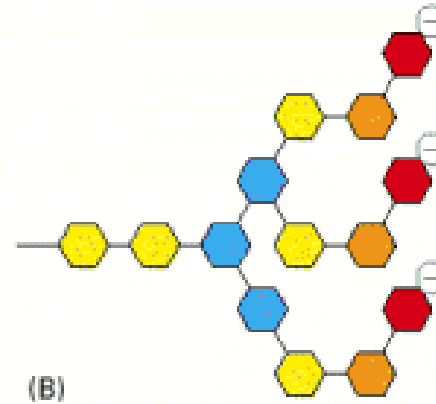
Zajednički početni deo i kompleksnih oligosaharida i manozom bogatih oligosaharida (nastao u ER)



KEY

-  = *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)
-  = mannose (Man)
-  = galactose (Gal)
-  = *N*-acetylneuraminic acid (sialic acid, or NANA)

Kompleksni oligosaharid sadrži početni deo i terminalni deo koji se sastoji iz ponavljajućih trisaharidnih jedinica



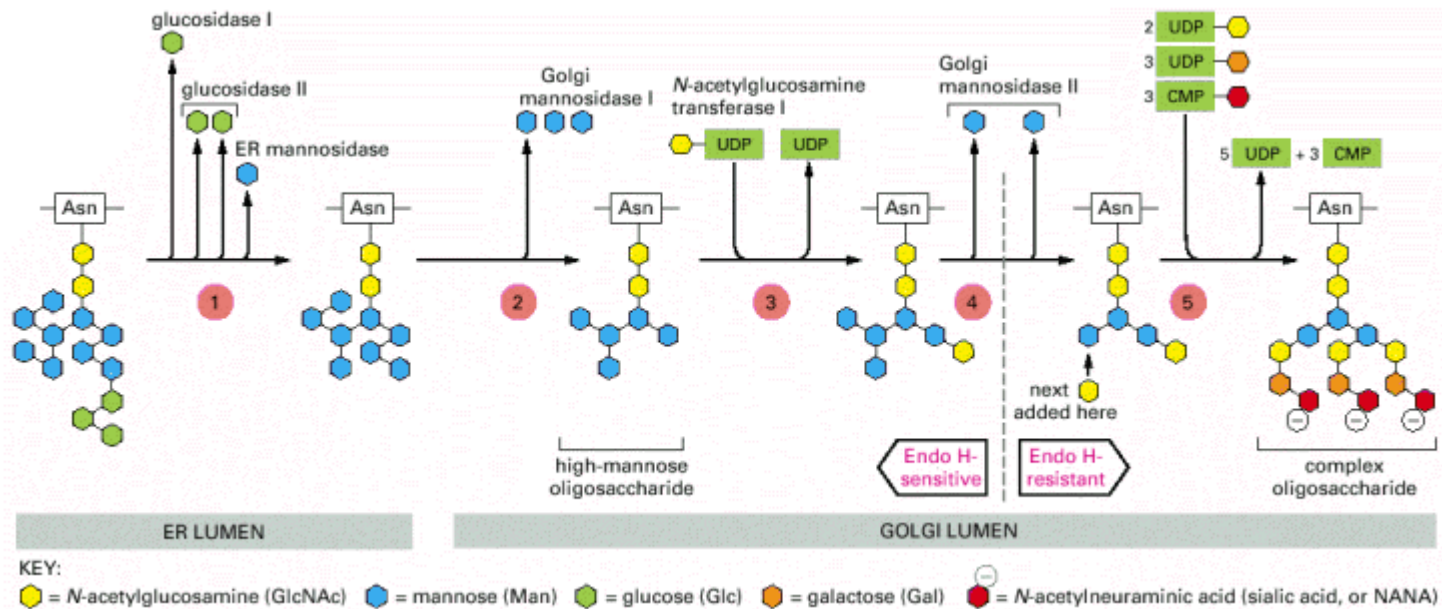
Manozom bogati oligosaharid pored početnog dela sadrži dodatne manoze

Obrada je jasno usmerena.

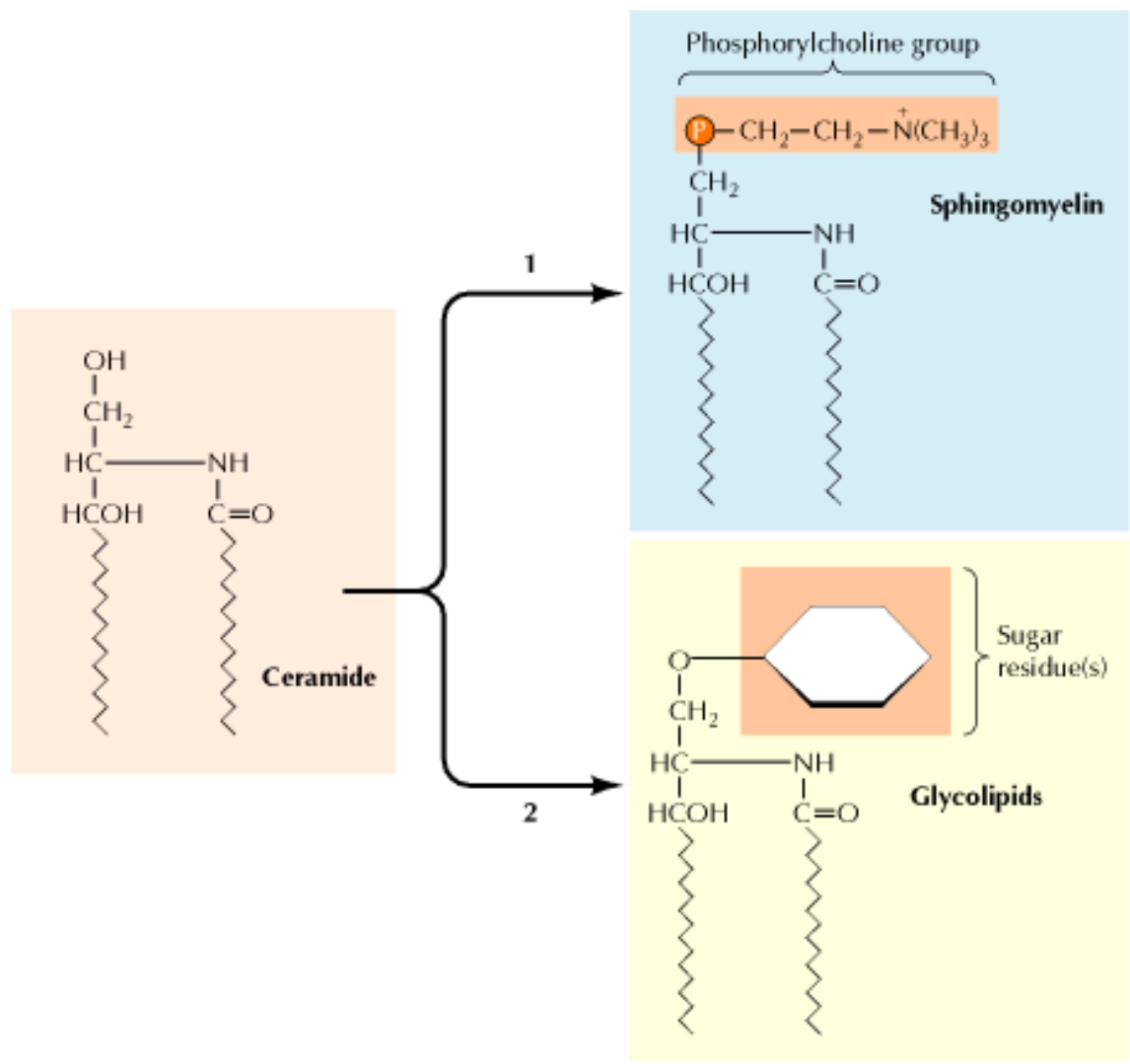
Započinje u ER uklanjanjem glu

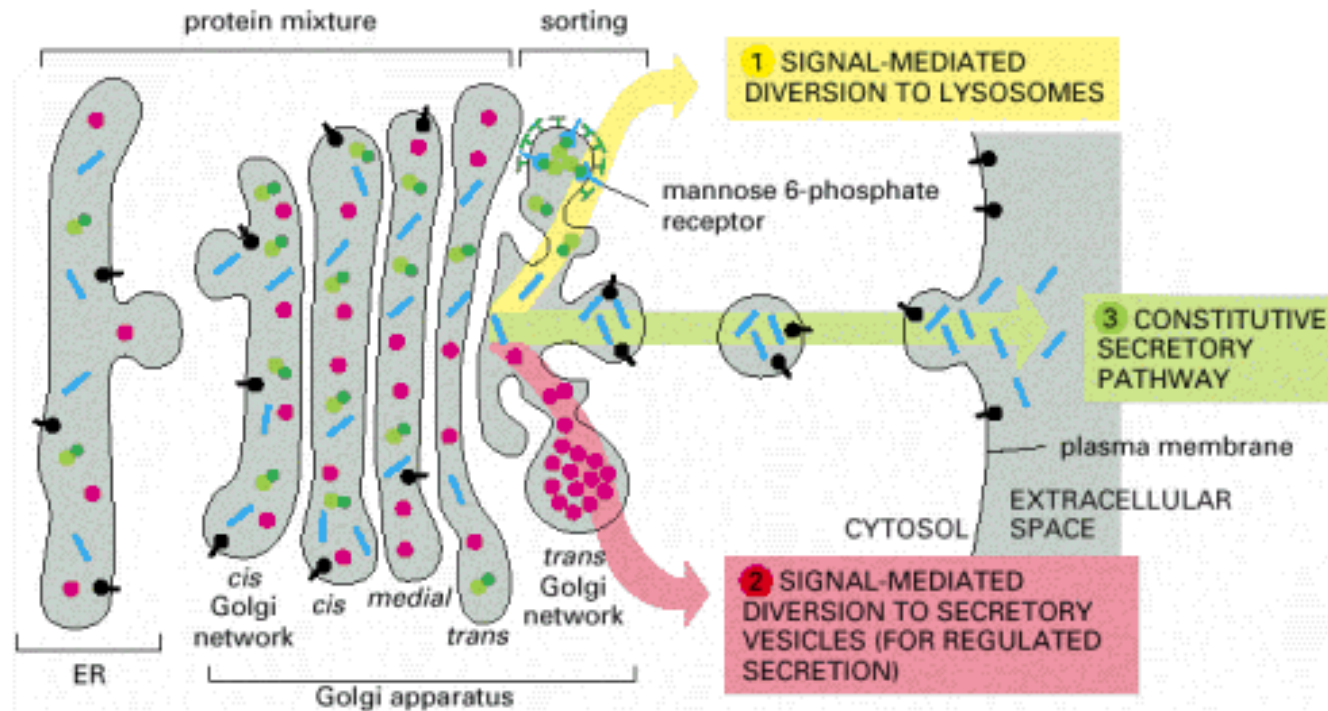
Manozidaza u ER uklanja mano

Početni deo sa 3 manoze je rezistentan na dalje razlaganje



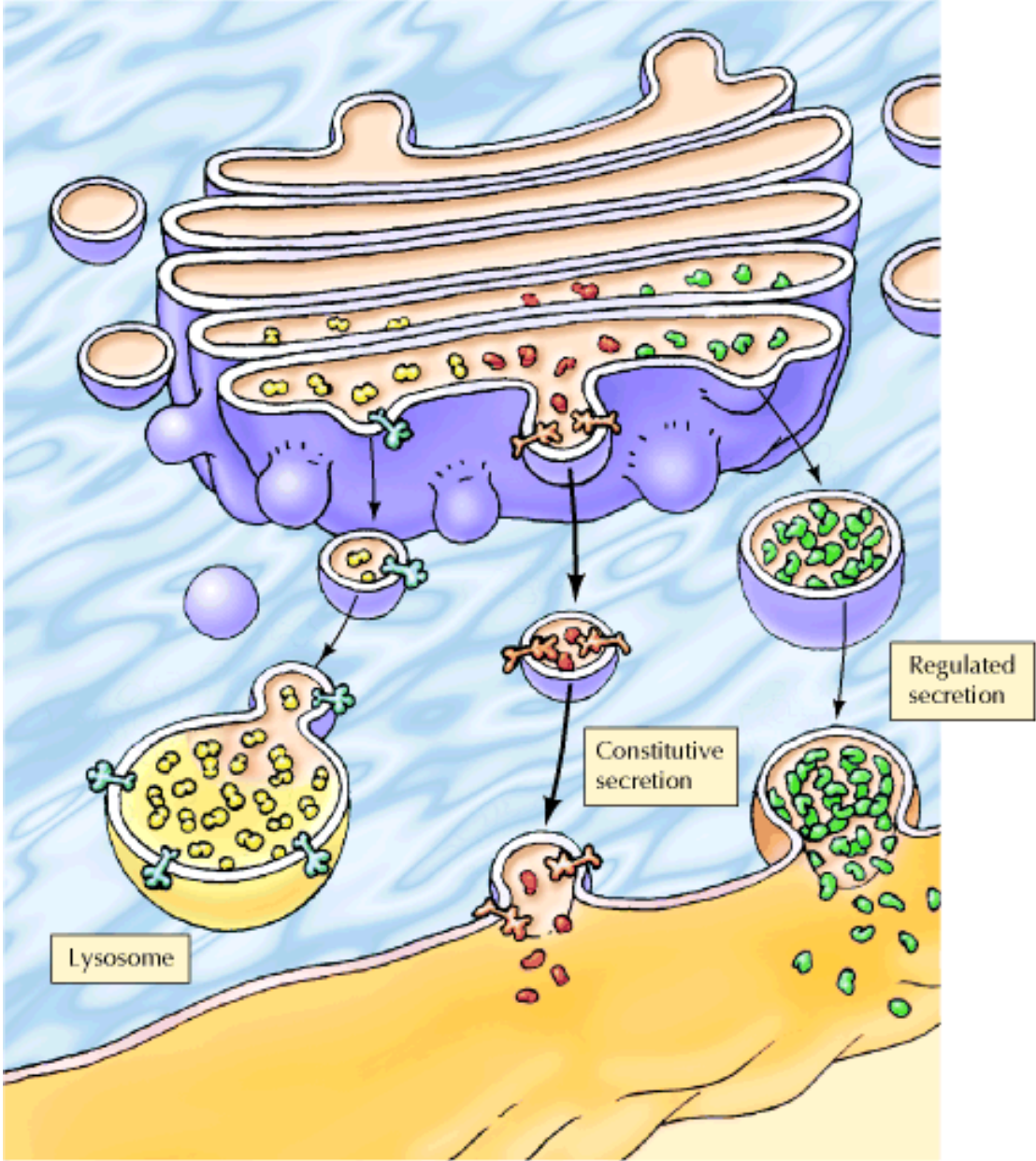
Sinteza složenih oligosaharida se dešava u lumenu Goldži aparata



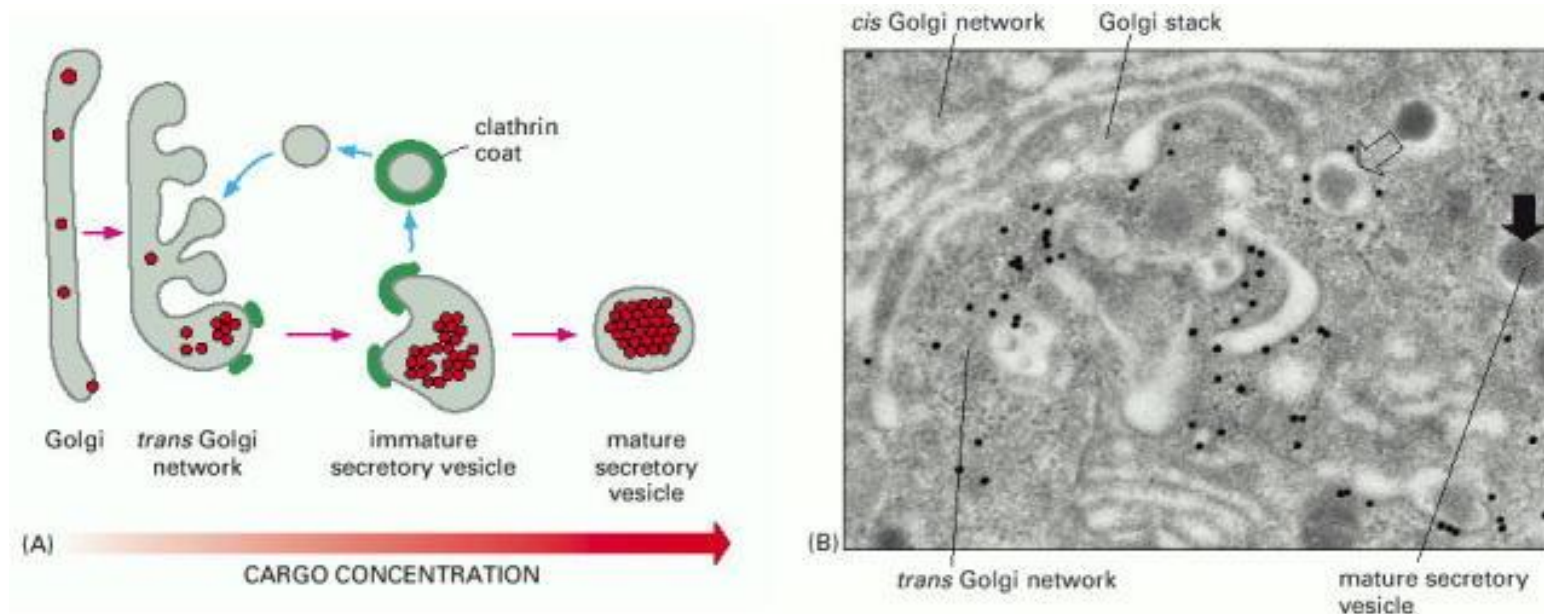


Tri dobro poznata načina sortiranja proteina u trans Goldži mrežu

- (1) Proteini sa manozo 6-fosfatnim (M6P) markerom se predaju lizozomima u klatrinskim transportnim vezikulama
- (2) Proteini sa signalom koji ih usmerava u sekretorne vezikule se koncentrišu u vezikulama (specijalizovane sekretorne ćelije)
- (3) U nepolarizovanim ćelijama, proteini koji nemaju posebnu namenu se prenose na površinu ćelije konstitutivnim sekretornim putem. U polarizovanim ćelijama, proteini koji se sekretuju ili ulaze u sastav plazma membrane se selektivno usmeravaju na apikalnu /bazolateralnu membranu tako da je ovaj transfer usmeren posebnim signalima.



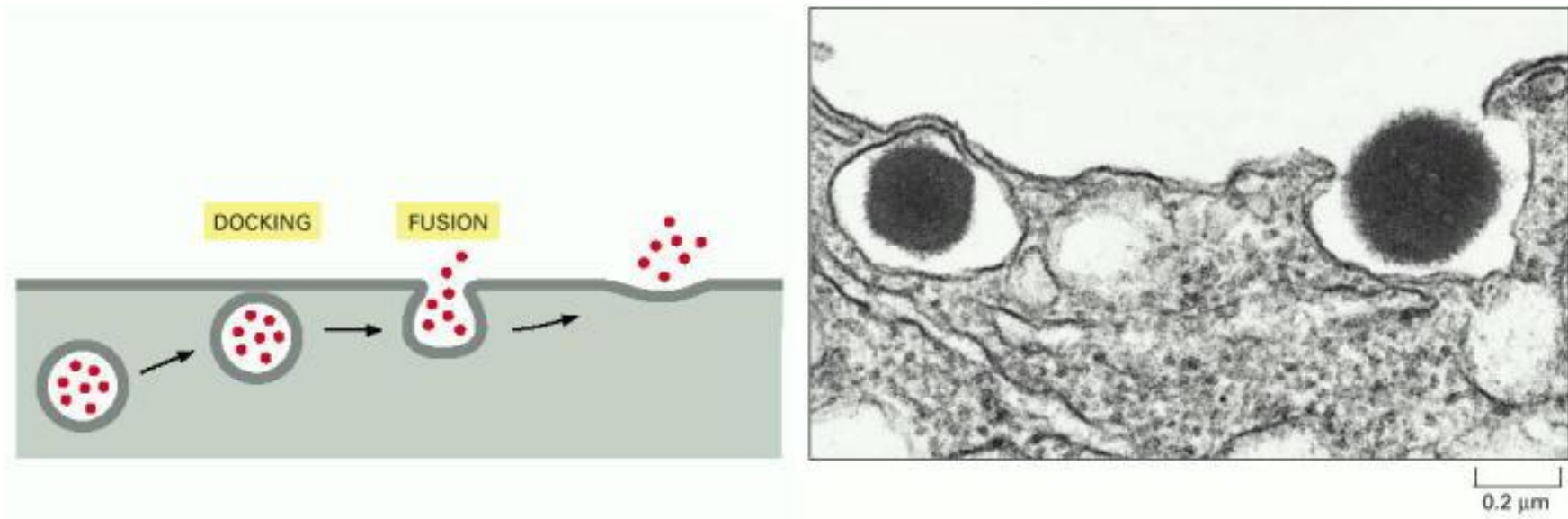
# Formiranje sekretornih vezikula



- (A) Sekretorni proteini se skupljaju i koncentruju u sekretornim vezikulama pomoću dva mehanizma. Prvo, oni se agregiraju u sredini povećane koncentracije jona (trans Golgi), lumen postaje kiseli i vezikule se kondenzuju tokom procesa sazrevanja. Drugo, višak membranskog ili luminalnog sadržaja koji se nalazi u nezrelim sekretornim vezikulama se vraća u klatrinskim vezikulama
- (B) Elektronska mikrofografija – sekretorne vezikule koje formiraju trans mrežu Golgi aparata u  $\beta$  ćelijama pankreasa.



# Egzocitoza sekretornih vezikula



Elektronska mikrografija oslobađanja insulina iz  $\beta$  ćelija pankreasa