

MODIFICACIÓN POST- TRADUCCIONAL

Probablemente todas las proteínas maduras deben ser modificadas de esta manera, a todas debe removerse su metionina líder (o ^fMet), después de que emergen del ribosoma

Muchas proteínas involucradas en una gama de procesos biológicos son sintetizadas como precursores inactivos, que son activados en condiciones adecuadas por proteólisis limitada

Precursores inactivos → Proteólisis limitada → Proteína funcional

Por ejemplo:

Tripsinógeno

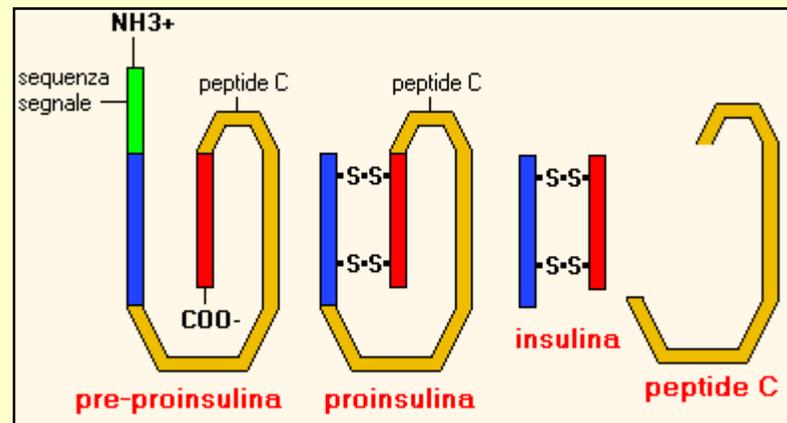
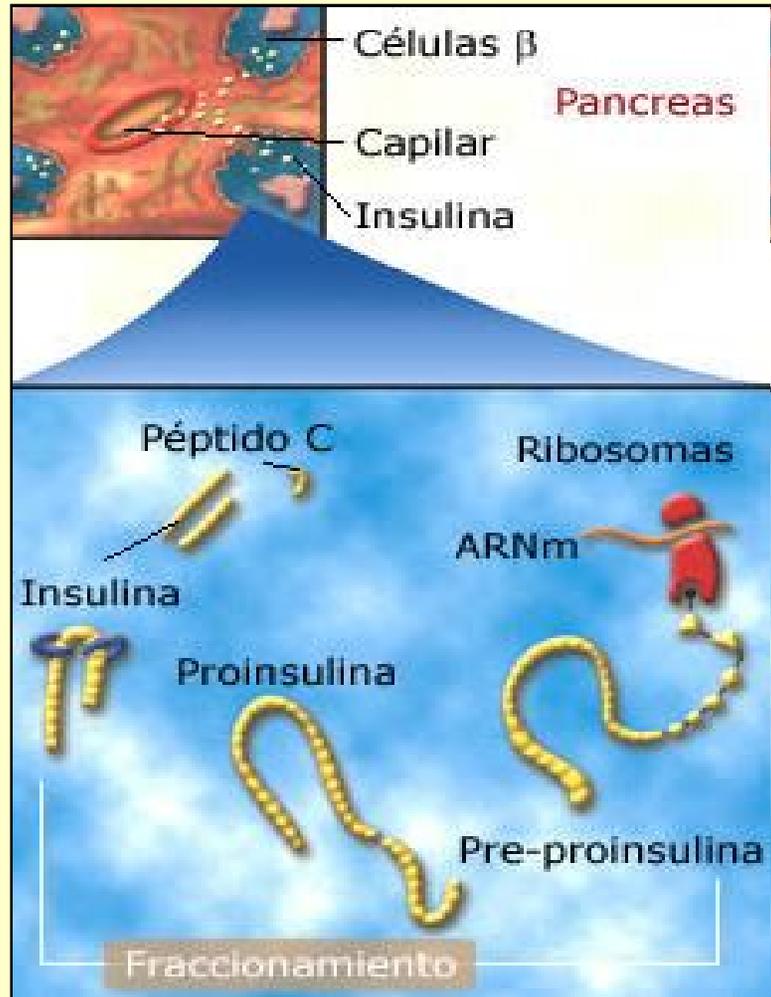
→ Tripsina

Quimiotripsinógeno

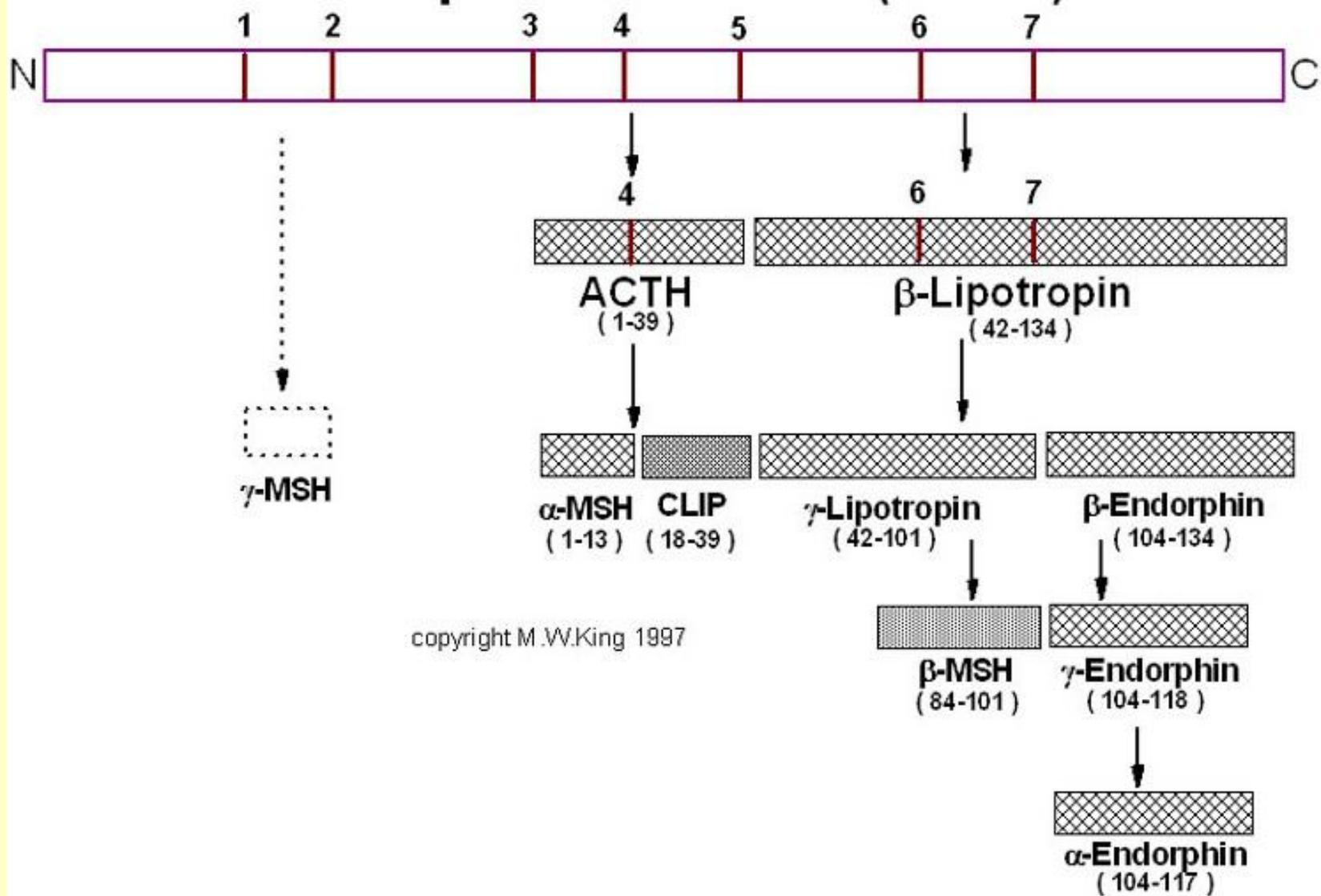
→ Quimiotripsina

Proinsulina(84 residuos) → propéptido(corte de 33

residuos de la cadena C) → Insulina



Pro-Opiomelanocortin (POMC)



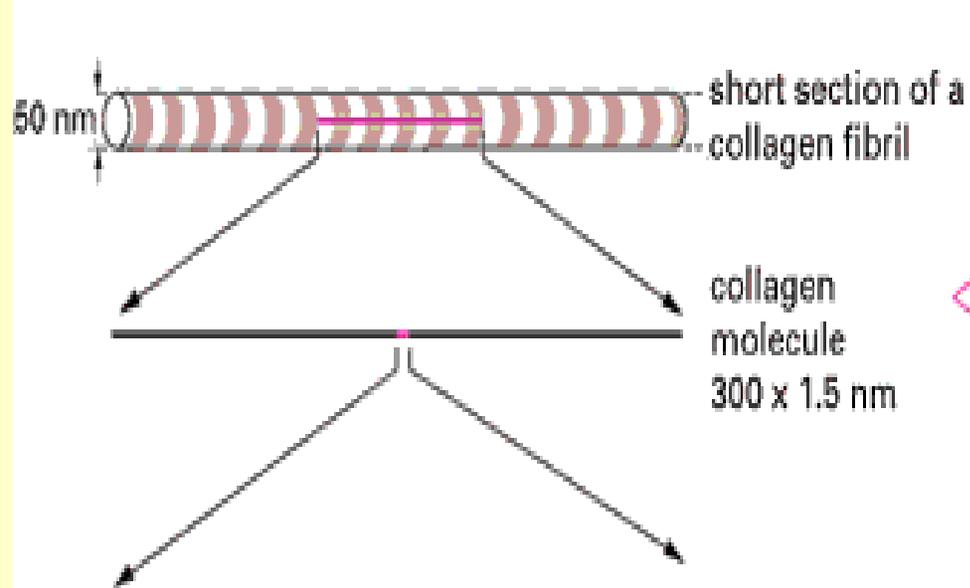
copyright M.W.King 1997

✓ A las proteínas inactivas que son activadas al removerles segmentos de la cadena se les denomina **proproteínas** y a los segmentos removidos **propéptidos**.

✓ La biosíntesis del colágeno ilustra muchas facetas de las modificaciones postraduccionales. El colágeno es el componente extracelular mayoritario del tejido conectivo, es una proteína fibrosa, formada por una triple α - hélice. El arreglo de cada uno de sus polipéptidos es:

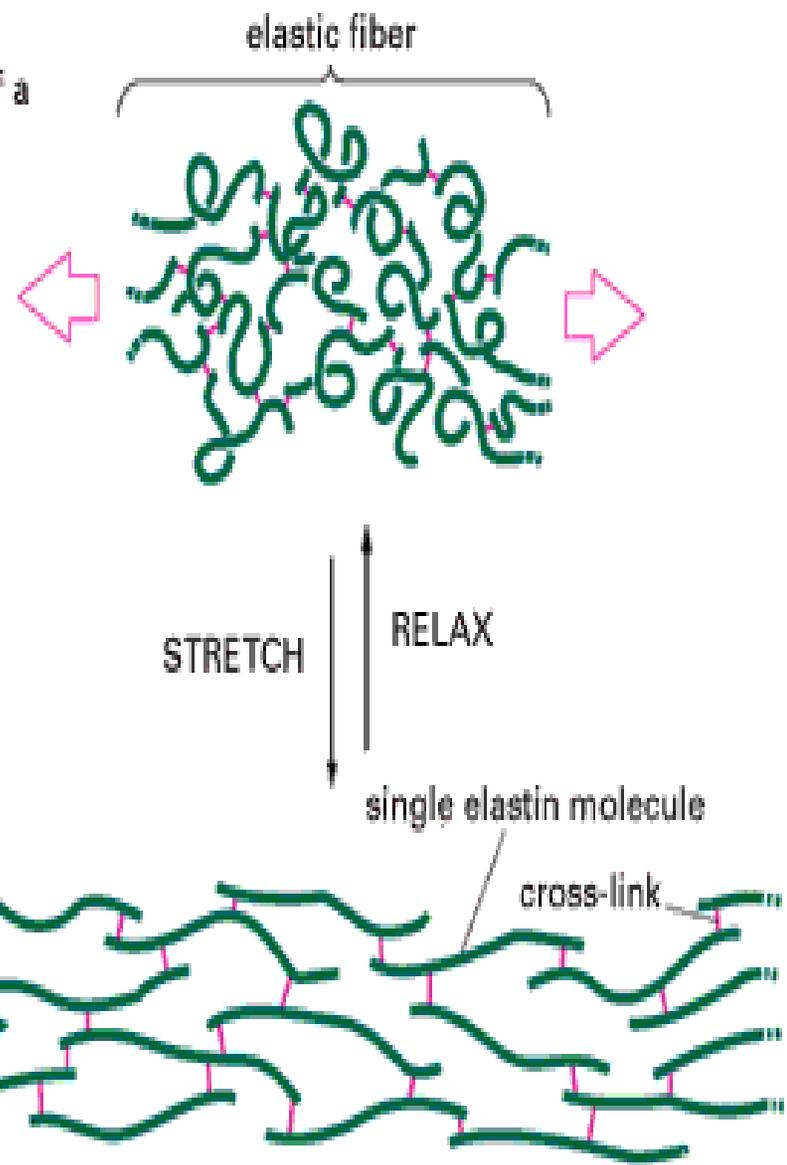


✓ Donde X casi siempre es Pro, Y casi siempre es 4-hidroxiprolina (Hyp); **n** es aproximadamente 340 veces.



1.5 nm

(A)

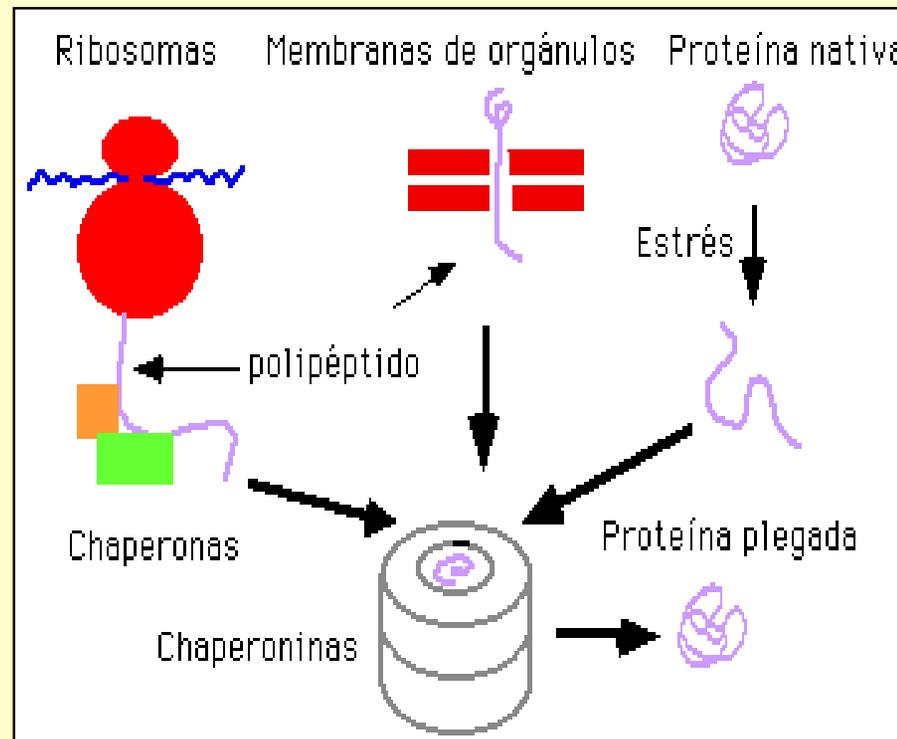


STRETCH
RELAX

(B)

- ✓ Muchas proteínas transmembranales o proteínas que son secretadas poseen una señal en el extremo *N*-terminal de 13-36 residuos predominantemente hidrofóbicos que es reconocida por una proteína denominada **SRP** (partícula de reconocimiento de señal).
- ✓ Esta proteína se une a una señal en el polipéptido para un receptor en la membrana (en el retículo endoplásmico rugoso en los eucariontes o en la membrana plasmática en procariontes).
- ✓ Las proteínas que poseen este péptido señal se denominan preproteínas o si también contienen propéptidos: preproproteínas. (como la papaina: proteasa de la semilla de la papaya que se utiliza como ablandador de carnes) a las cuales para ser activas hay que removerles el péptido señal y el propéptido





El papel de las chaperoninas en el plegamiento de proteínas es múltiple. Hay chaperonas de diversos tipos se unen a los polipéptidos recién sintetizados en los ribosomas (arriba a la izquierda), a proteínas que atraviesan las membranas de diversos orgánulos (arriba en el centro) o a proteínas que se han desnaturizado debido a cualquier tipo de estrés (arriba a la derecha).

Dentro de las modificaciones covalentes que se conocen se encuentran las siguientes:

- ✓ Acetilación
- ✓ Glucosilación
- ✓ Hidroxilación
- ✓ Metilación
- ✓ Nucleotidilación
- ✓ Fosforilación (por ejemplo en la glucógeno fosforilasa)
- ✓ ADP-ribosilación (por ejemplo en la proteína eEF-2 en la síntesis de proteínas)
- ✓ Miselanea, contienen múltiples tipos de modificaciones covalentes diferentes a las mencionadas arriba.

1) Modificaciones amino- y carboxilo terminales.

Inicialmente todos los polipéptidos empiezan con un residuo N-formilmetionina (en procariotas) o metionina (en eucariotas), pero en la mayoría de los casos son eliminados por reacciones post-traduccion, por lo que no aparecen en proteina final. Un 50% de las proteinas eucarioticas tienen el extremo N-terminal acetilado. Los residuos C-terminales son tambien a menudo modificados.

2) Pérdida de secuencias señal. Son péptidos cortos de 15 a 30 aminoácidos que dirigen a la proteina hacia su destino final. Son eliminados por proteasas durante la síntesis.

3) Modificación de aminoácidos. Los grupos hidroxilo de serina, treonina y tirosina pueden ser fosforilados (la caseina de la leche contiene muchos grupos fosfoserina, que fijan calcio). Los grupos aspártico y glutámico pueden recibir grupos amino extras y la lisina es frecuentemente metilada o hidroxilada, al igual que la prolina, como ocurre en la formación del colágeno.

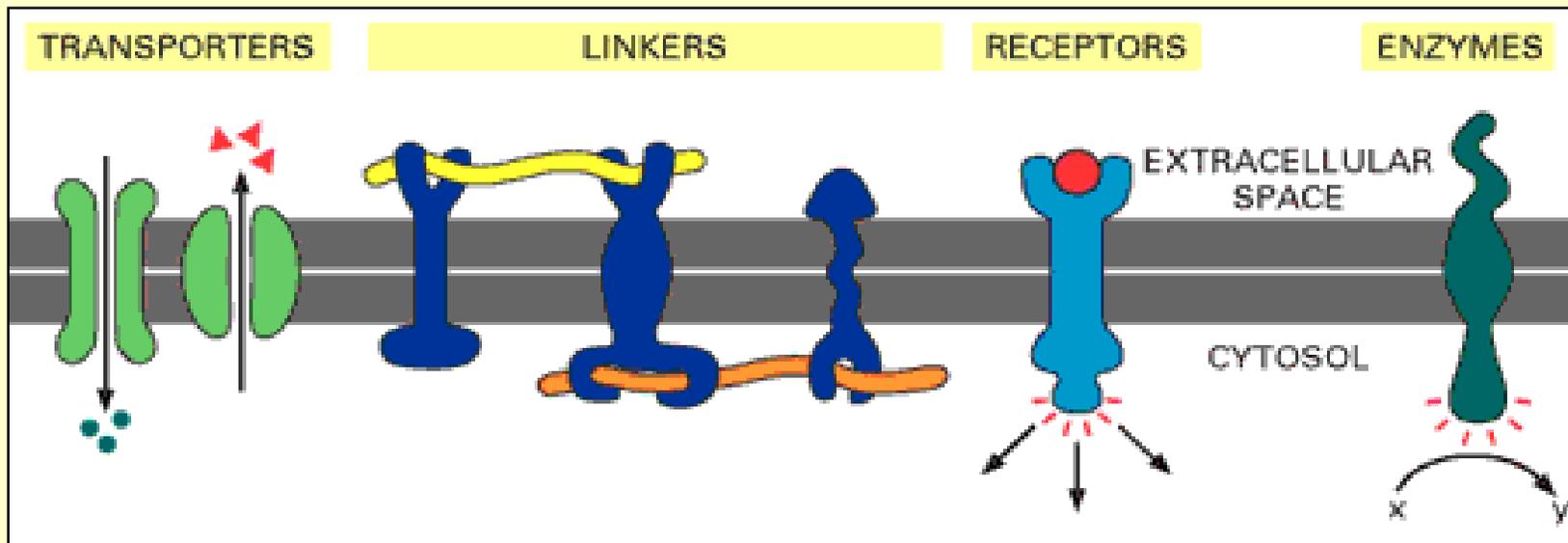
- 4) **Unión de cadenas laterales glucídicas.** Se unen covalentemente durante o después de la síntesis a residuos asparagina (oligosacáridos unidos por enlaces *N*) o a residuos de treonina o serina (oligosacáridos unidos por enlaces *O*). Es frecuente en proteínas extracelulares.

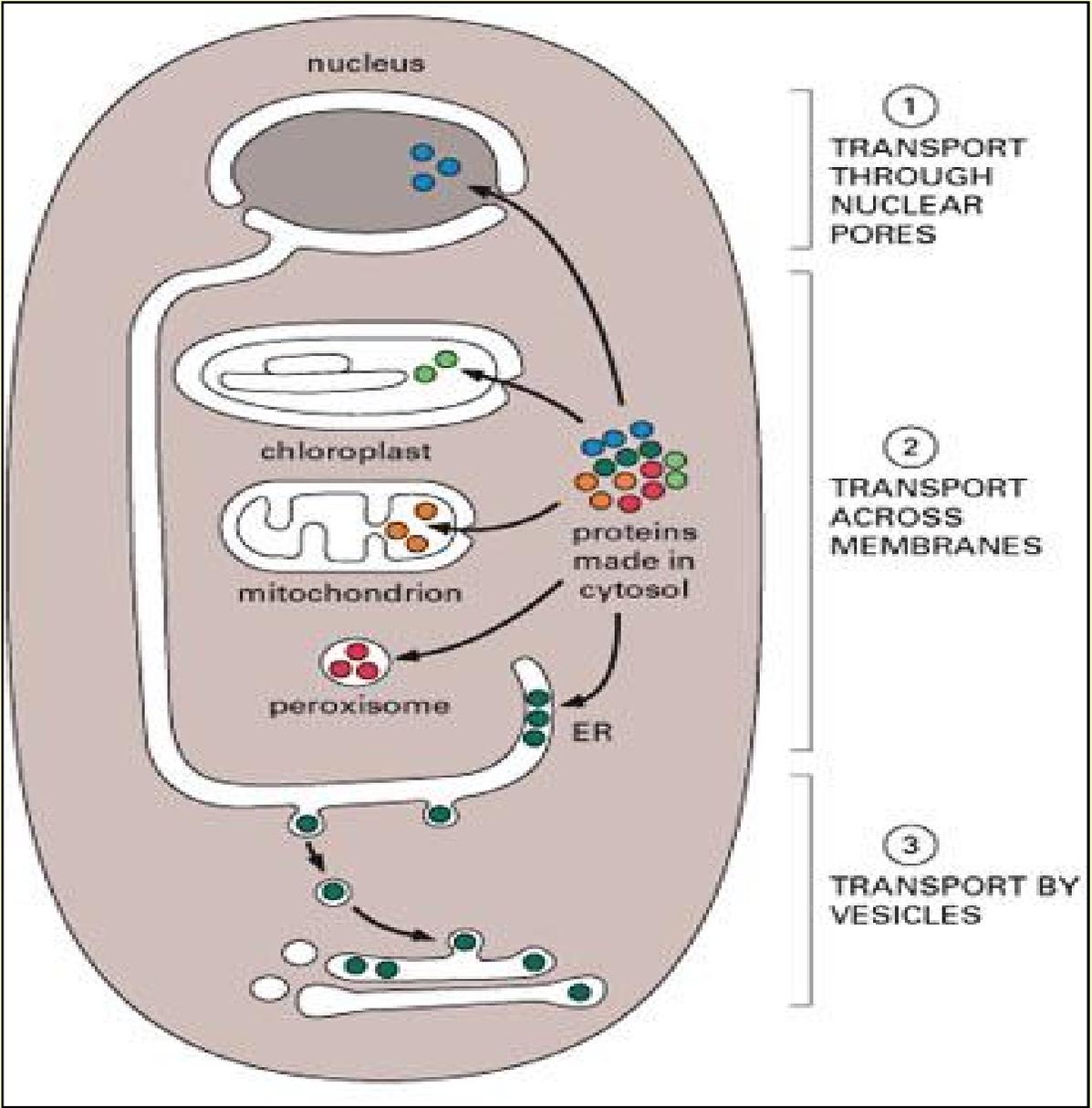
- 5) **Adición de grupos isoprenilo.** Los grupos isoprenilo provienen de la biosíntesis del colesterol. Las laminas (proteínas de la lámina nuclear) están modificadas de esta manera.

- (6) **Adición de grupos prostéticos.** Un ejemplo de la adición covalente de un grupo prostético luego de la síntesis es el grupo hemo del citocromo *c* y de la hemoglobina.

7) Modificación proteolítica. La insulina, las proteasas tripsina y quimotripsina y el colágeno, entre otros ejemplos, se sintetizan como precursores inactivos (proinsulina, tripsinógeno, quimotripsinógeno y protocolágeno, respectivamente) que luego deben ser hidrolizados parcialmente para convertirse en productos biológicamente activos.

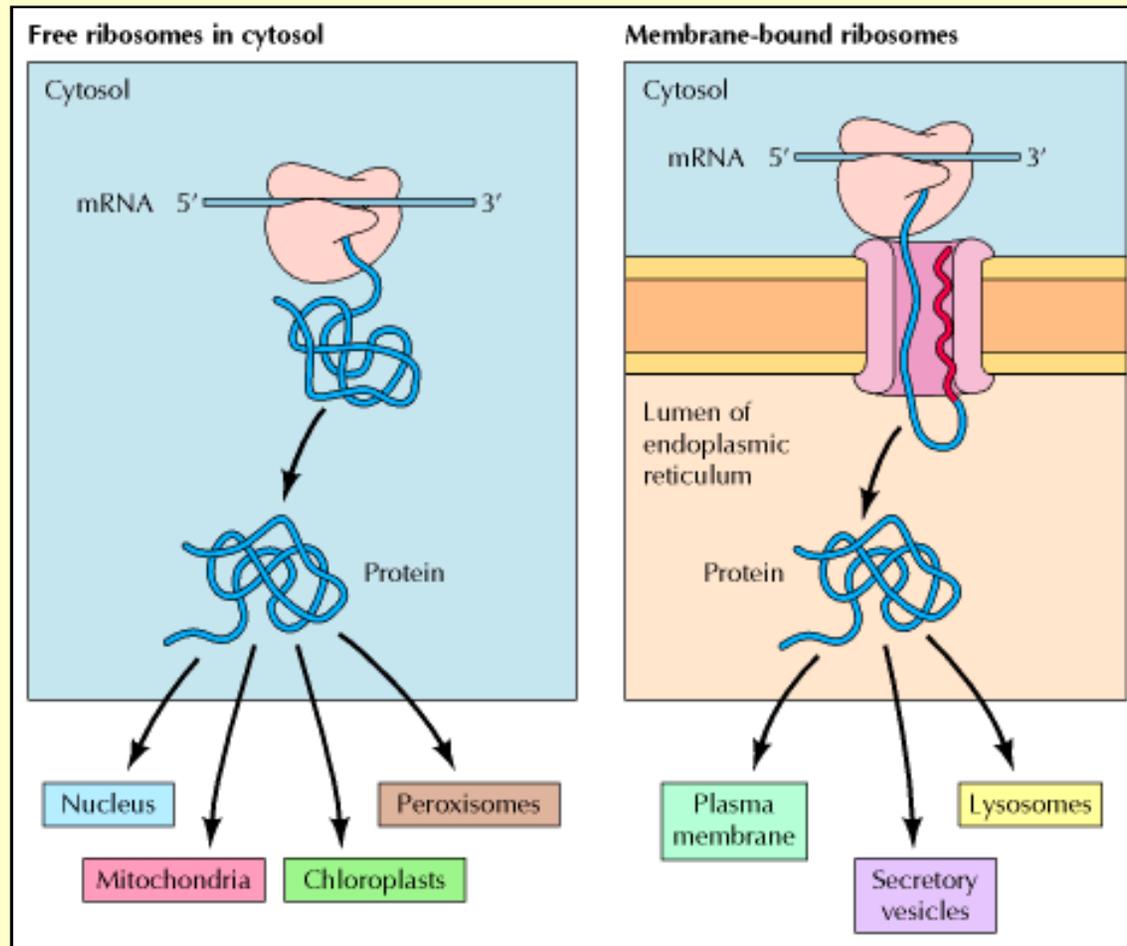
8) Formación de puentes disulfuro. Pueden ser intra- o intercatenarias y se supone que ayudan a las proteínas que deben ser exportadas a mantener su estructura nativa.





Características de las células eucarióticas

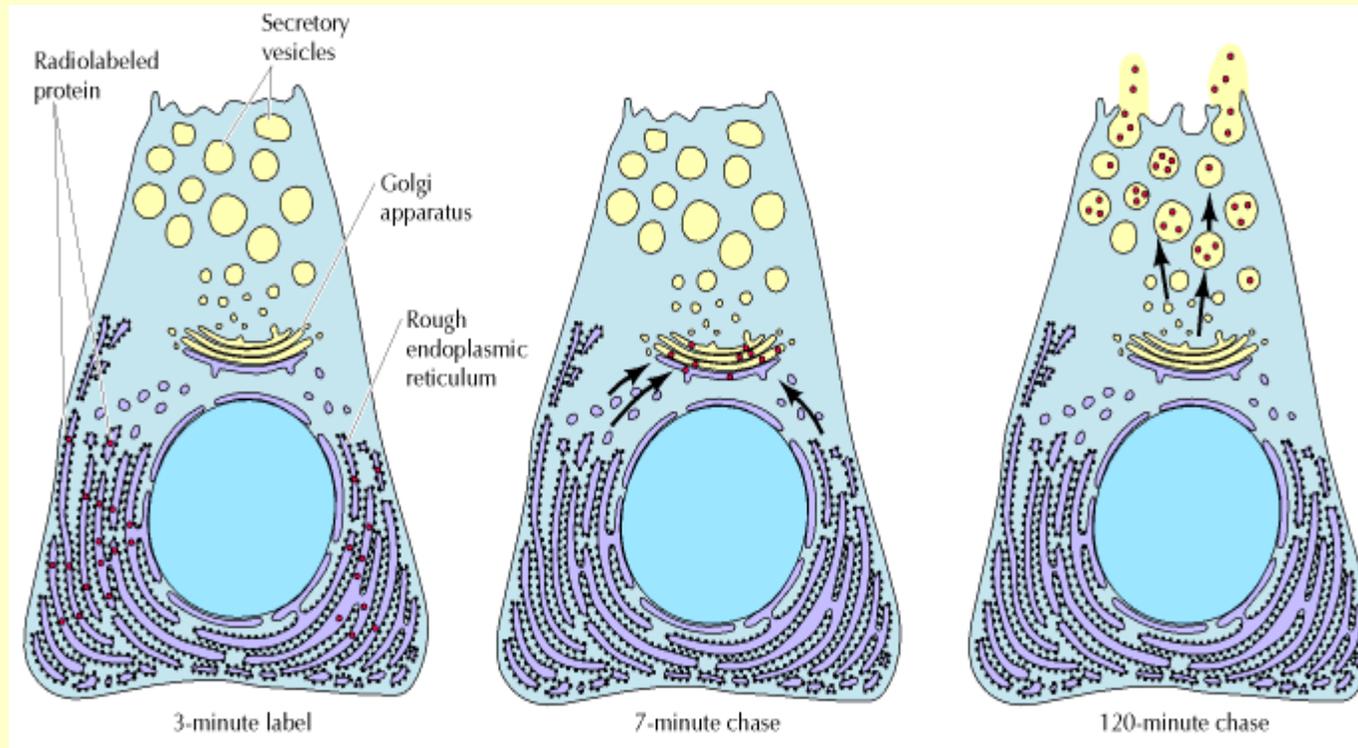
- Presencia núcleo: Regulación de la expresión génica.
- Presencia de organelas rodeadas de membranas: compartimientos discretos con funciones celulares específicas.
- Los procesos de clasificación o "SORTING" y la llegada a destino o "TARGETING" son bastante complejos



Los procesos de clasificación o "SORTING" y la llegada a destino o "TARGETING" resultan complejos. El primer punto de sorting ocurre cuando las proteínas están aún siendo sintetizadas.

- Las proteínas que se sintetizan en ribosomas unidos a la membrana son introducidas en el RE donde son procesadas, sufren modificaciones post-traduccionales y adquieren su conformación nativa (plegamiento)
- Una vez que alcanzan su conformación correcta son transportadas al Aparato de Golgi donde continúan su procesamiento y son seleccionadas para su transporte a su destino final (lisosomas, membrana plasmática o son secretadas)
- El RE, el AG y los lisosomas están relacionados por su participación en el procesamiento de las proteínas y físicamente conectados por el transporte vesicular

Papel del ER en el procesamiento y sorting de proteínas



Vía secretoria

RE rugoso

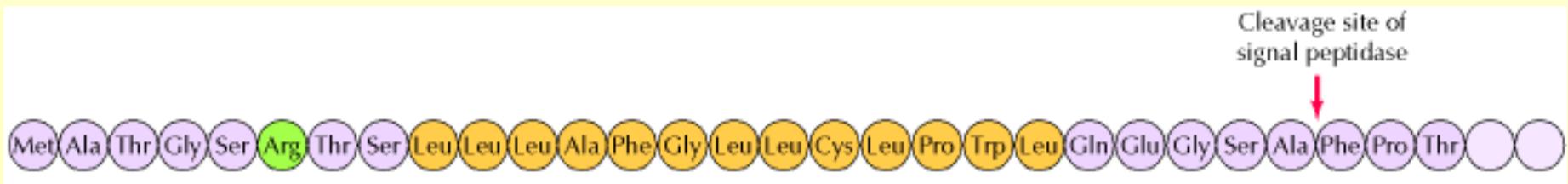
AG →

Vesículas secretorias

Exterior celular

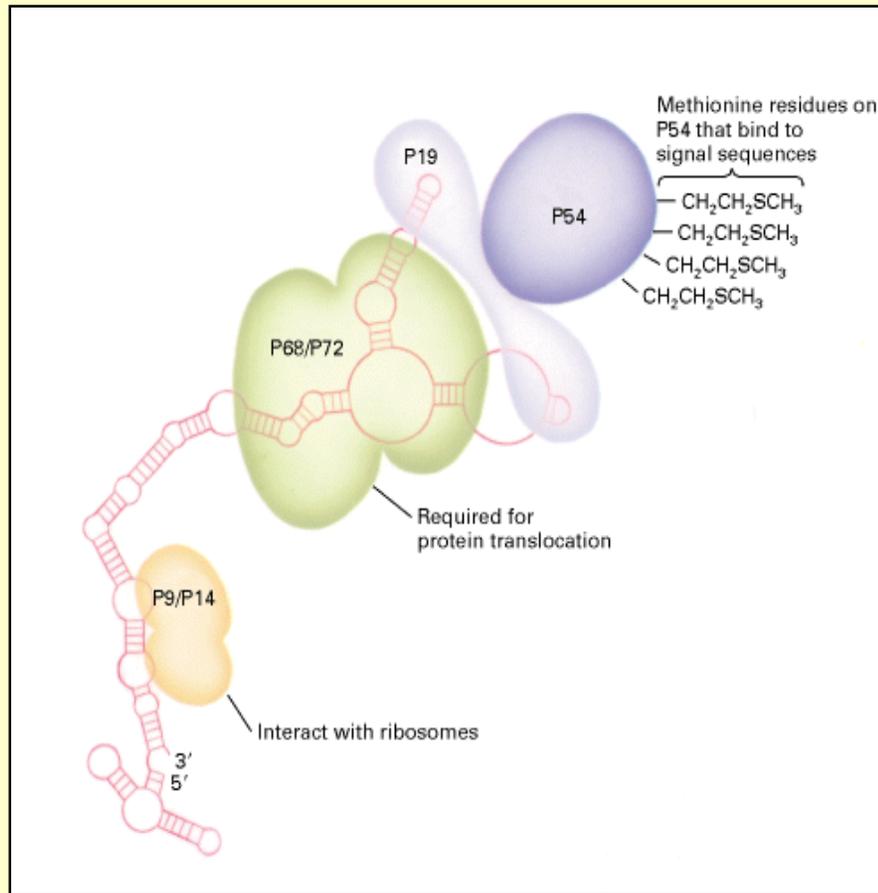
Como son dirigidas las proteínas al ER?

Los ribosomas son dirigidos a la membrana del ER por una secuencia de aminoácidos presente en el extremo amino-terminal de la proteína (PEPTIDO SEÑAL) que está siendo sintetizada y no por características propias de los mismos.

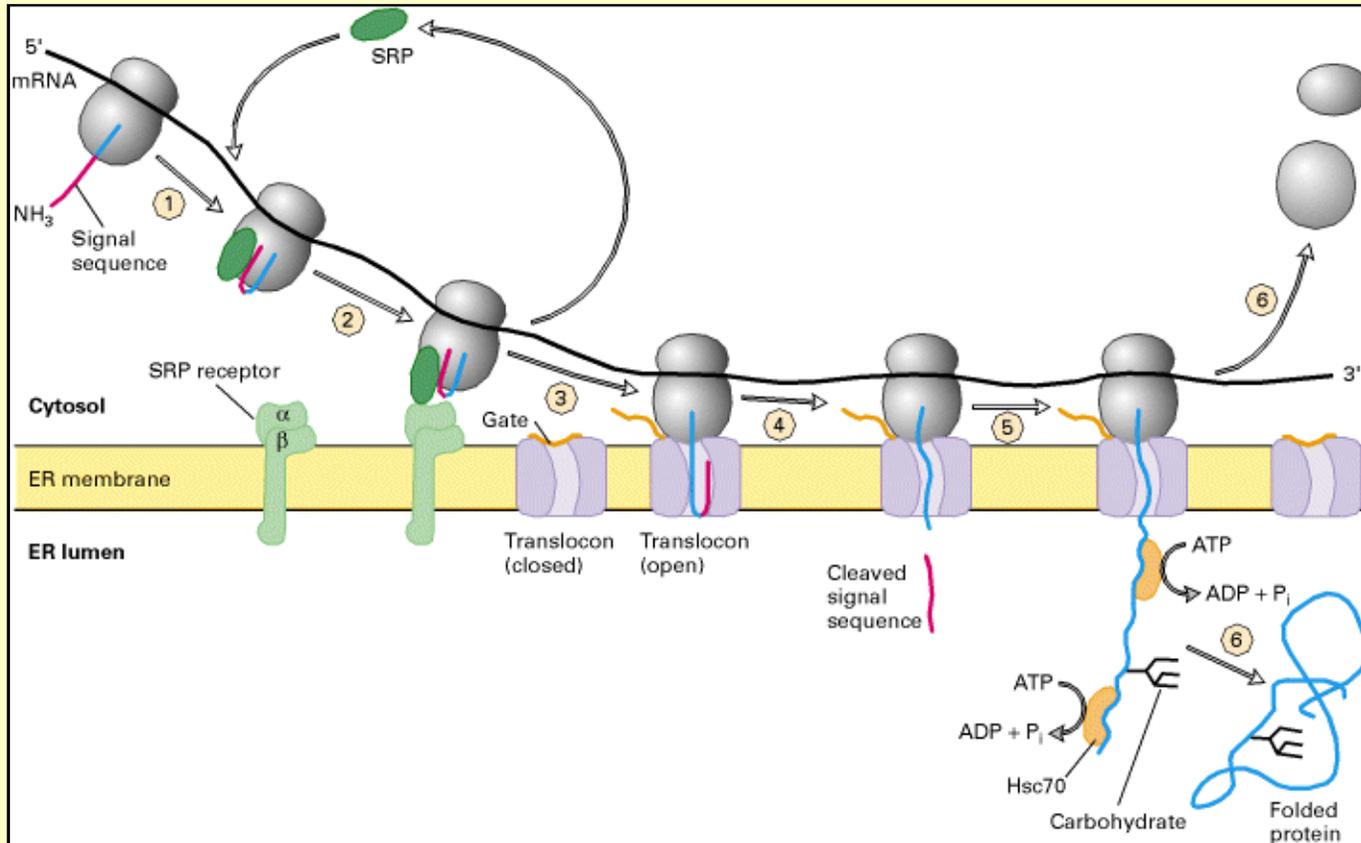


Los péptidos señales son secuencias cortas(16-30 aa) que contienen un aa cargado seguido por un grupo de 6-12 aa hidrofóbicos. Estos aa hidrofóbicos son esenciales para la unión a un receptor presente en la membrana del ER .

Mecanismo de targeting formado por dos componentes (SRP y el receptor en la membrana)

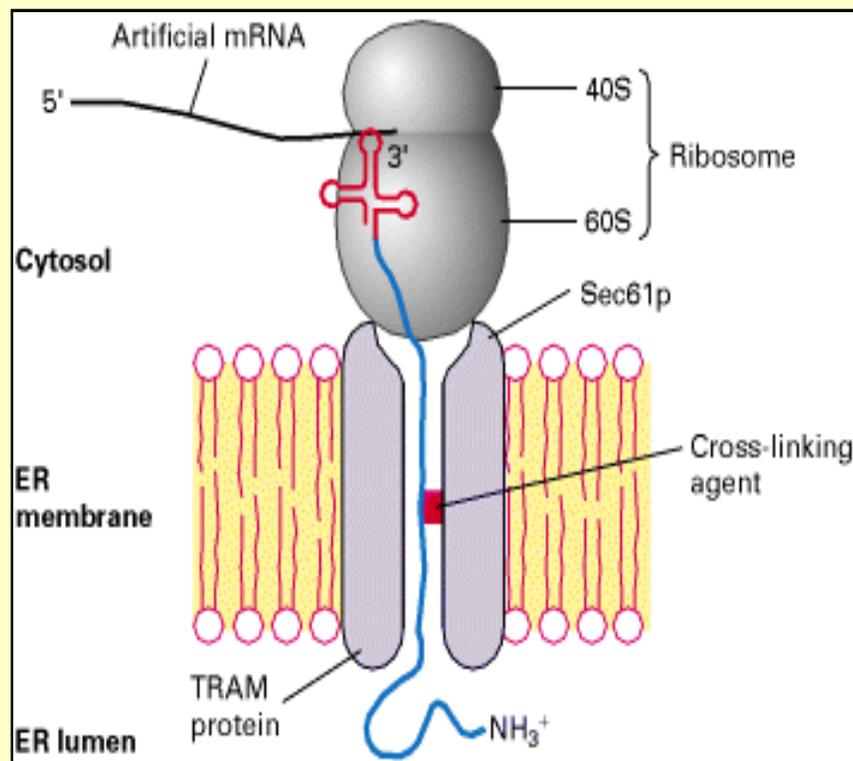


- El SRP es una RNP citosólica (6 Proteínas y un RNA) que une simultáneamente al péptido señal: al ribosoma y al receptor en la membrana del ER.
- La P54 une al péptido señal
- P9 y P14 interaccionan con el ribosoma.
- P68 y P72 son requeridas para la traslocación



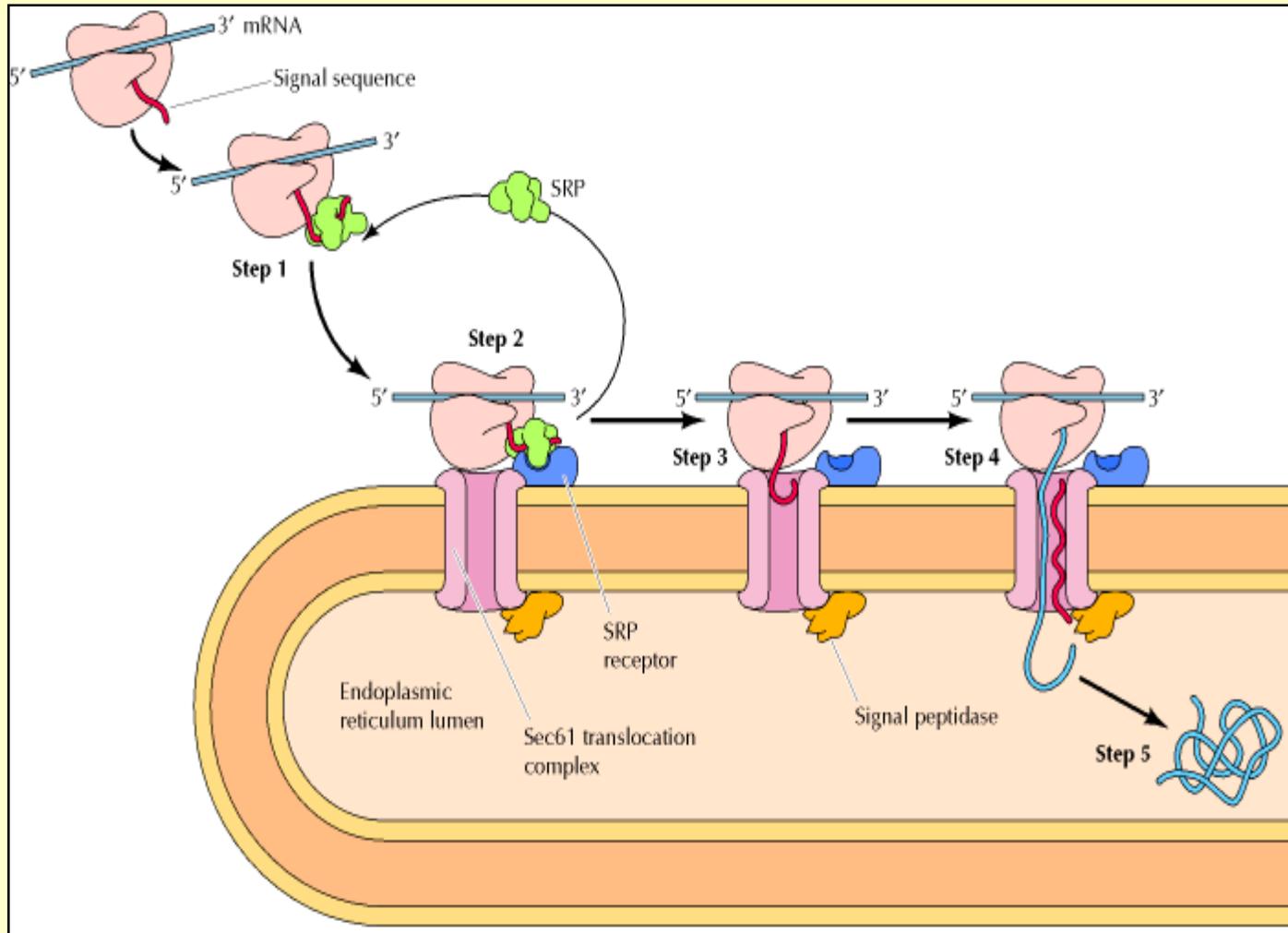
El SRP se une al péptido señal y dirige la unión del complejo ribosoma-péptido señal con el SRPR. La transferencia del ribosoma al translocón produce la apertura del canal y la ubicación del péptido señal en el poro central. Una vez que se disocian SRP y SRPR del traslocón, hidrolizan el GTP y están nuevamente disponibles.

Pasaje de las proteínas por el translocón.

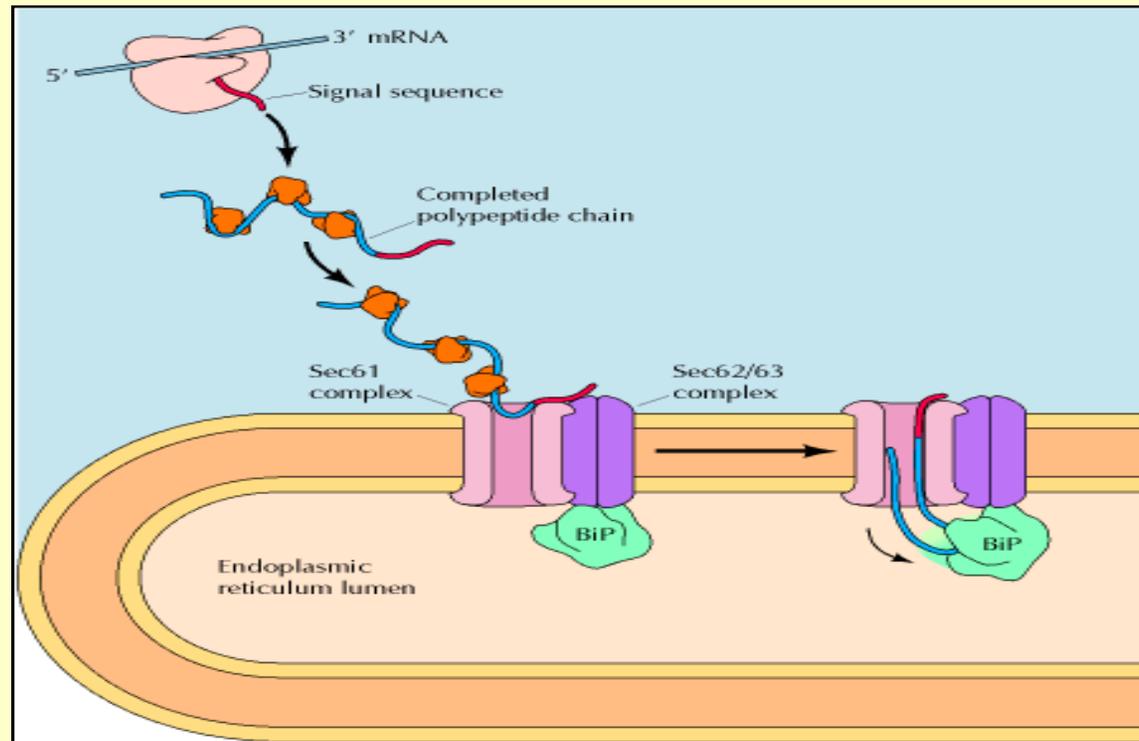


- Dirigido por la liberación de energía asociada a la síntesis de proteínas
- El complejo del translocón está formado por trímeros
- El péptido señal es clivado por la Peptidasa de la señal que está asociada al translocón

La translocación es co-traducciona en la mayoría de los eucariotas.



Translocación post-traducciona



En las levaduras, algunas proteínas son translocadas una vez concluida la síntesis. Ingresan por el mismo translocón pero no participan ni el SRP ni el SRPR

La energía es provista por una proteína adicional Sec62 y por la Bip

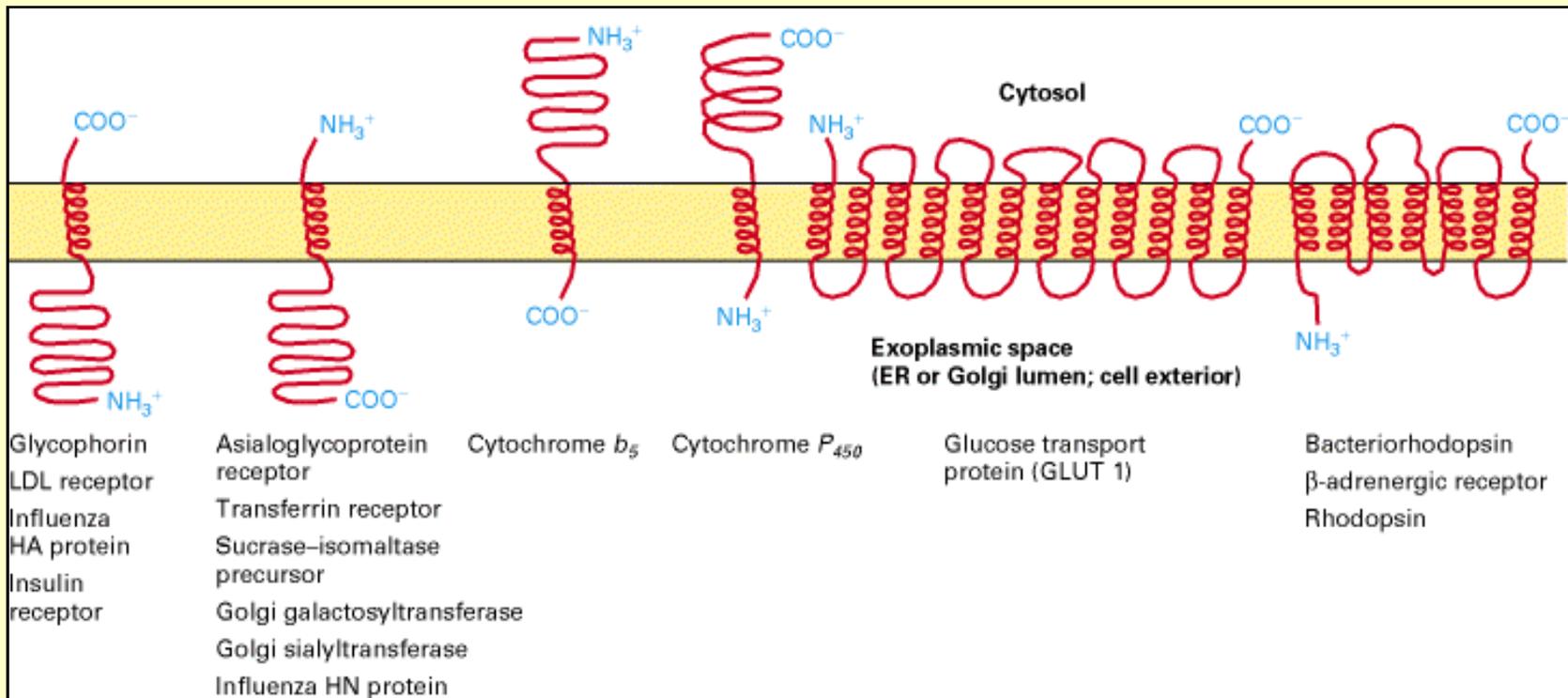
Inserción de las proteínas en la membrana del ER

Las proteínas destinadas a la Membrana Plasmática o membrana de ER, Golgi o lisosomas son incorporadas inicialmente a la membrana del ER y transportadas a los diferentes compartimientos como componentes de membrana

La orientación de los diferentes fragmentos es conservada durante todo el proceso, por lo tanto la topología es determinada en el momento en que se insertan a la membrana del ER

(Segundo punto de sorting)

Los elementos que determinan su topología son los segmentos transmembrana (formados por segmentos de 20-25 aa hidrofóbicos) se denominan "secuencias topogénicas"



Clasificación de las proteínas según su topología en IV clases:

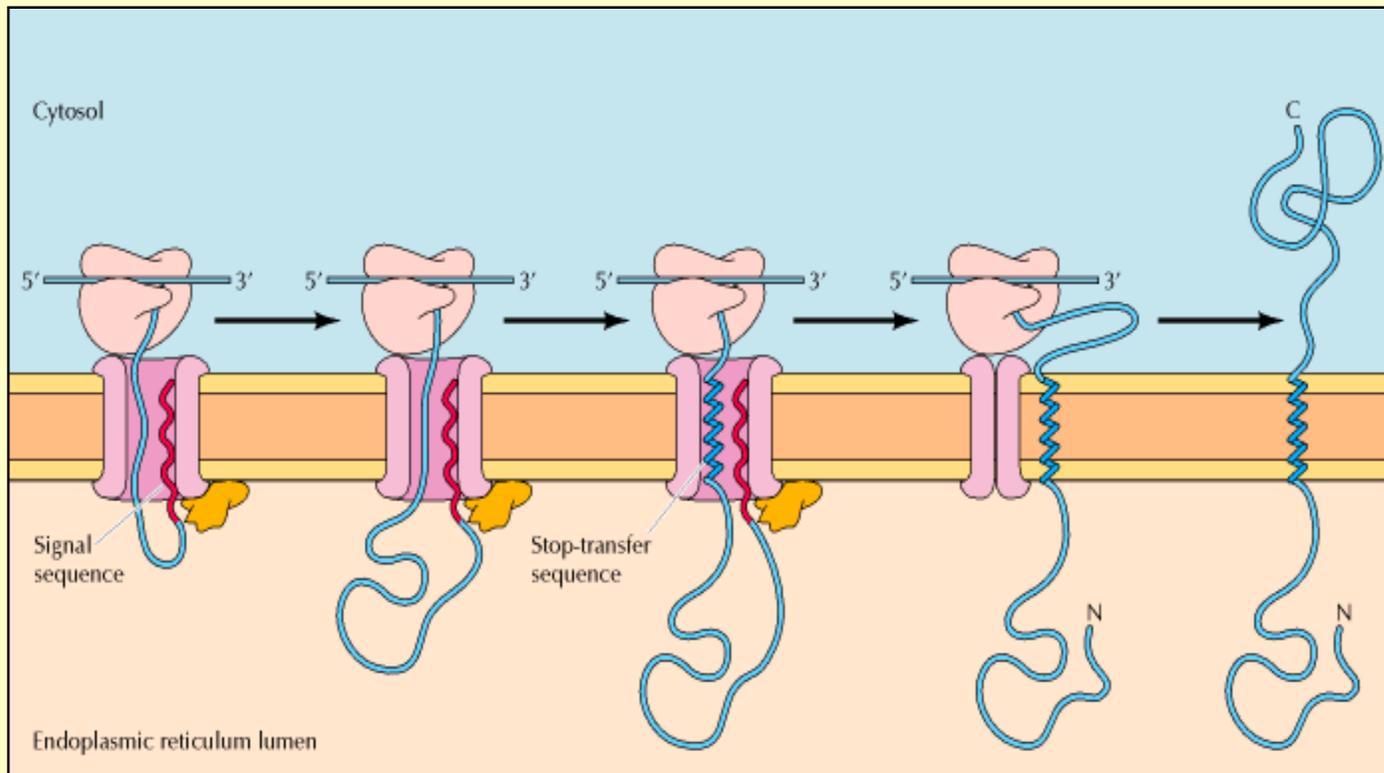
I, II y III comprende las proteínas de un único paso

Tipo I: Polipéptido se cliva, N-term en el lumen, el C-term en citosol

Tipo II: El polipéptido no se cliva, N-term en citosol, C-term en el lumen

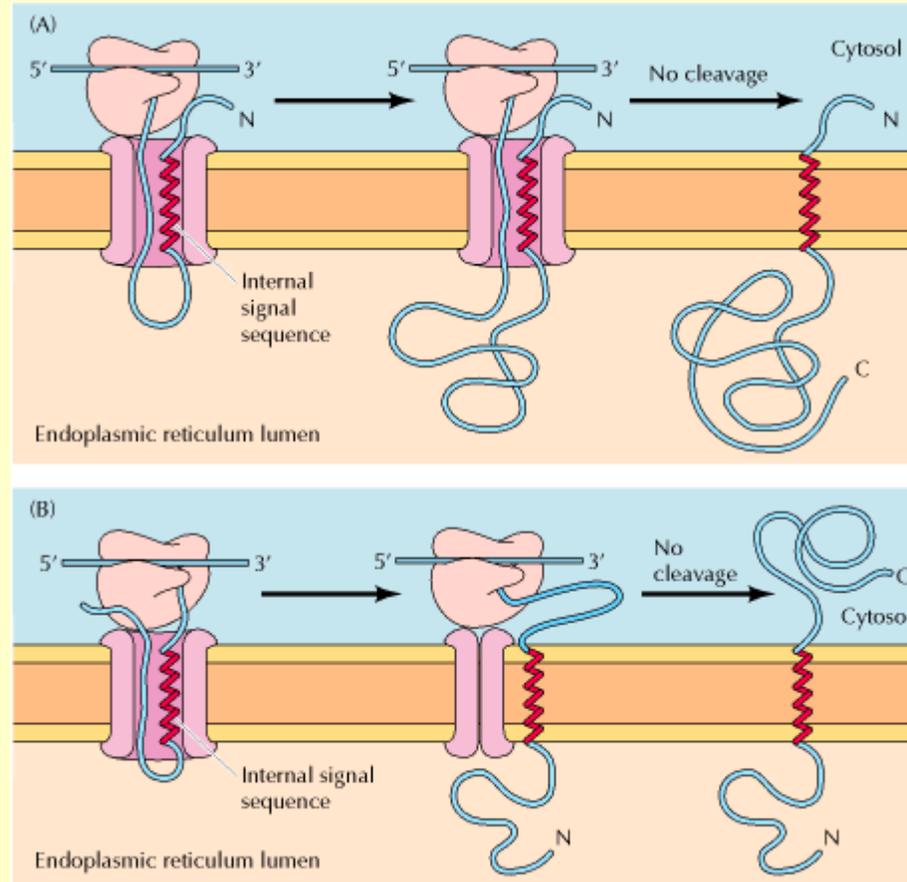
Tipo III: Misma orientación que I, pero sin clivaje del polipéptido

Tipo IV: Proteínas multipaso numerosos segmentos transmembrana



Síntesis e inserción de proteínas del Tipo I (poseen un polipéptido que se cliva y una secuencia interna stop-transfer que la ancla a la membrana).

Inserción de proteínas del tipo II y III

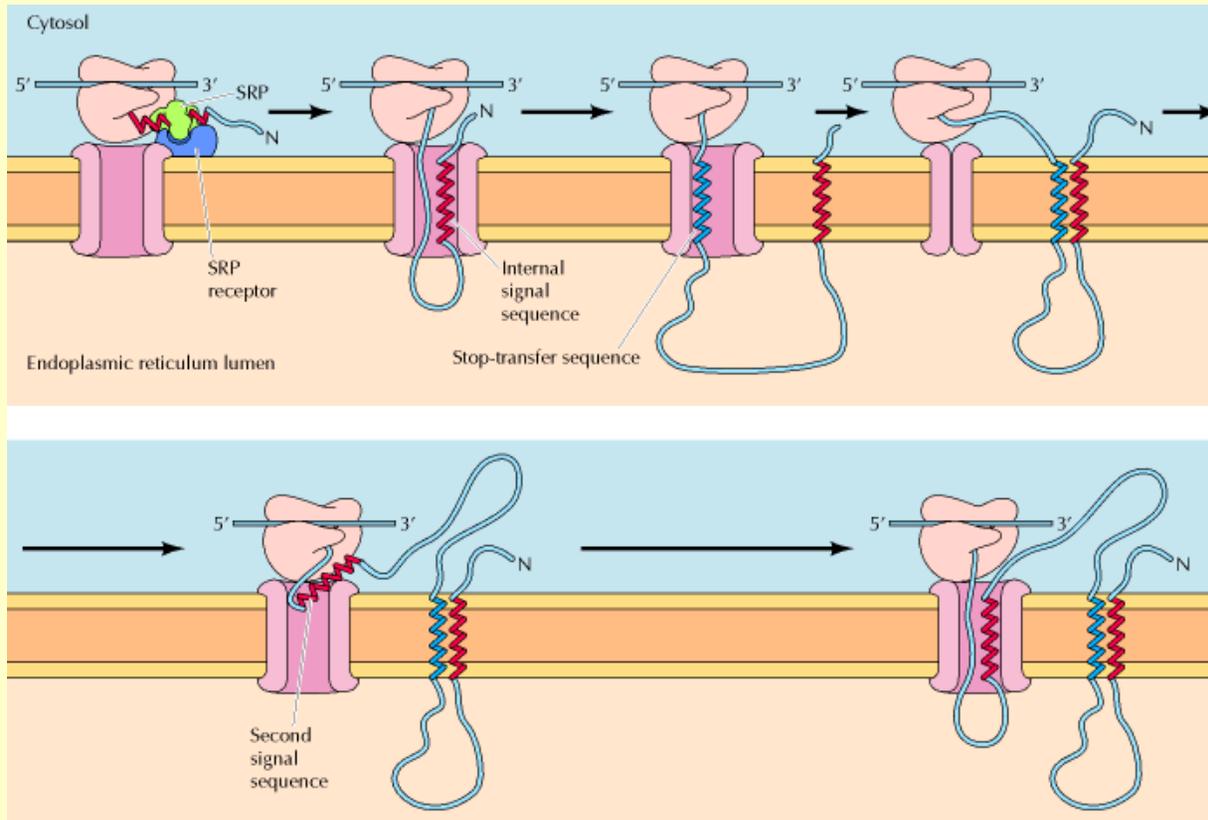


No poseen Péptido Señal en el extremo N-term.

**Poseen un único segmento hidrofóbico interno
(funciona como señal de ER y como stop-transfer)**

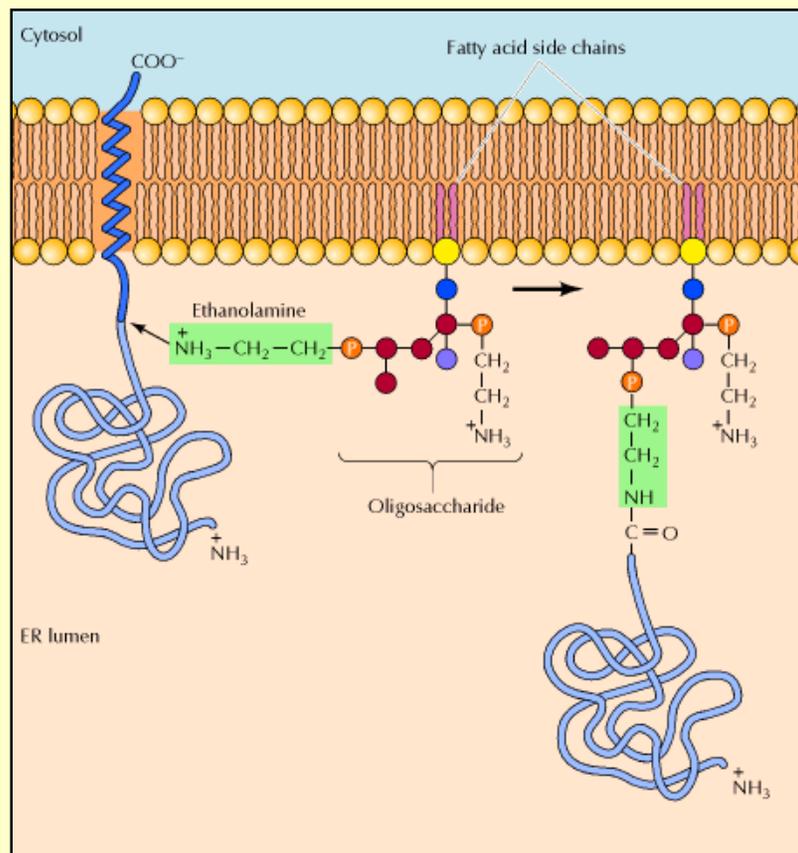
Presentan orientaciones opuestas determinadas por la orientación que toma el Péptido Señal en el translocón.

Inserción de proteínas tipo IV



IVa N-term en citoplasma (parecido a tipo II, transportadores de glucosa y canales iónicos) y IVb C-term en citoplasma (parecido a tipo I, receptores acoplados a prot G).

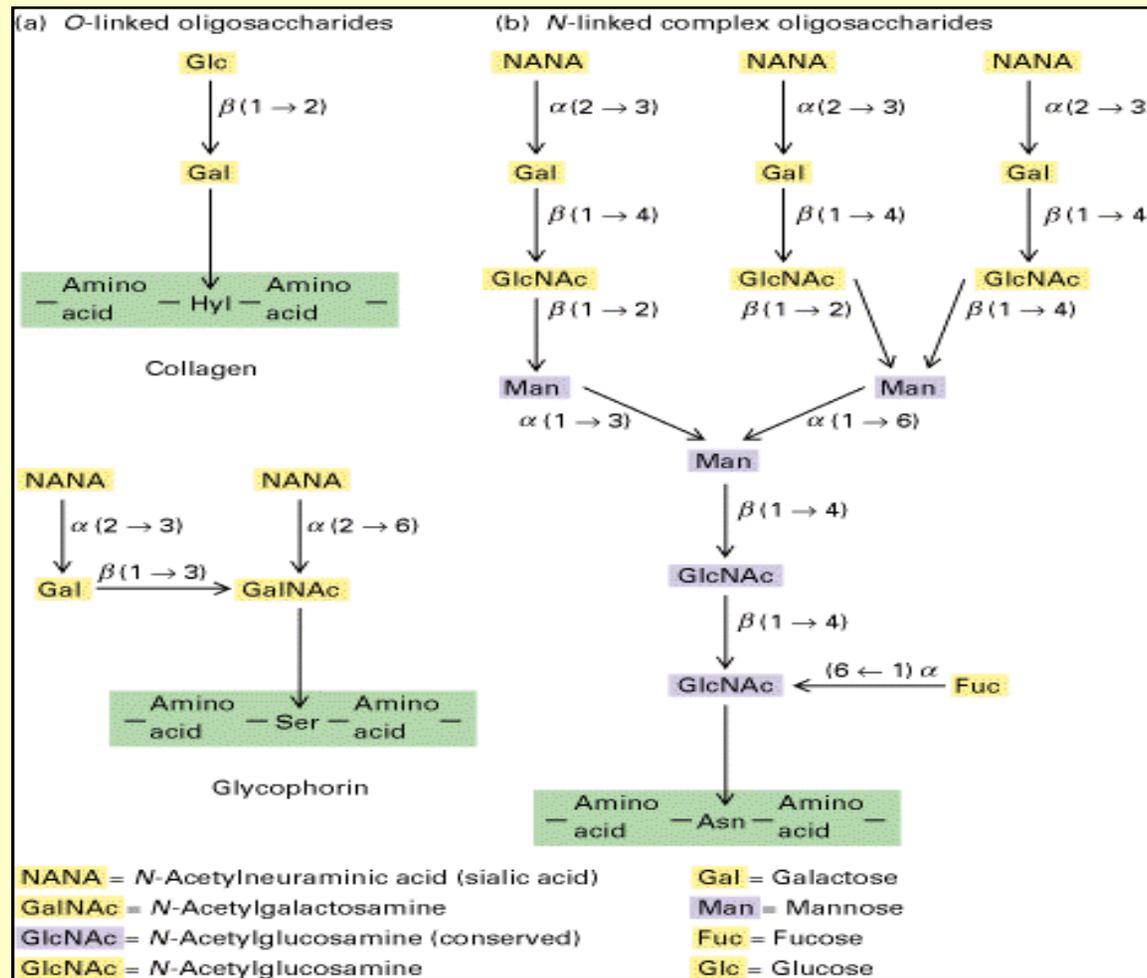
Algunas proteínas se unen a la membrana por un ancla GPI



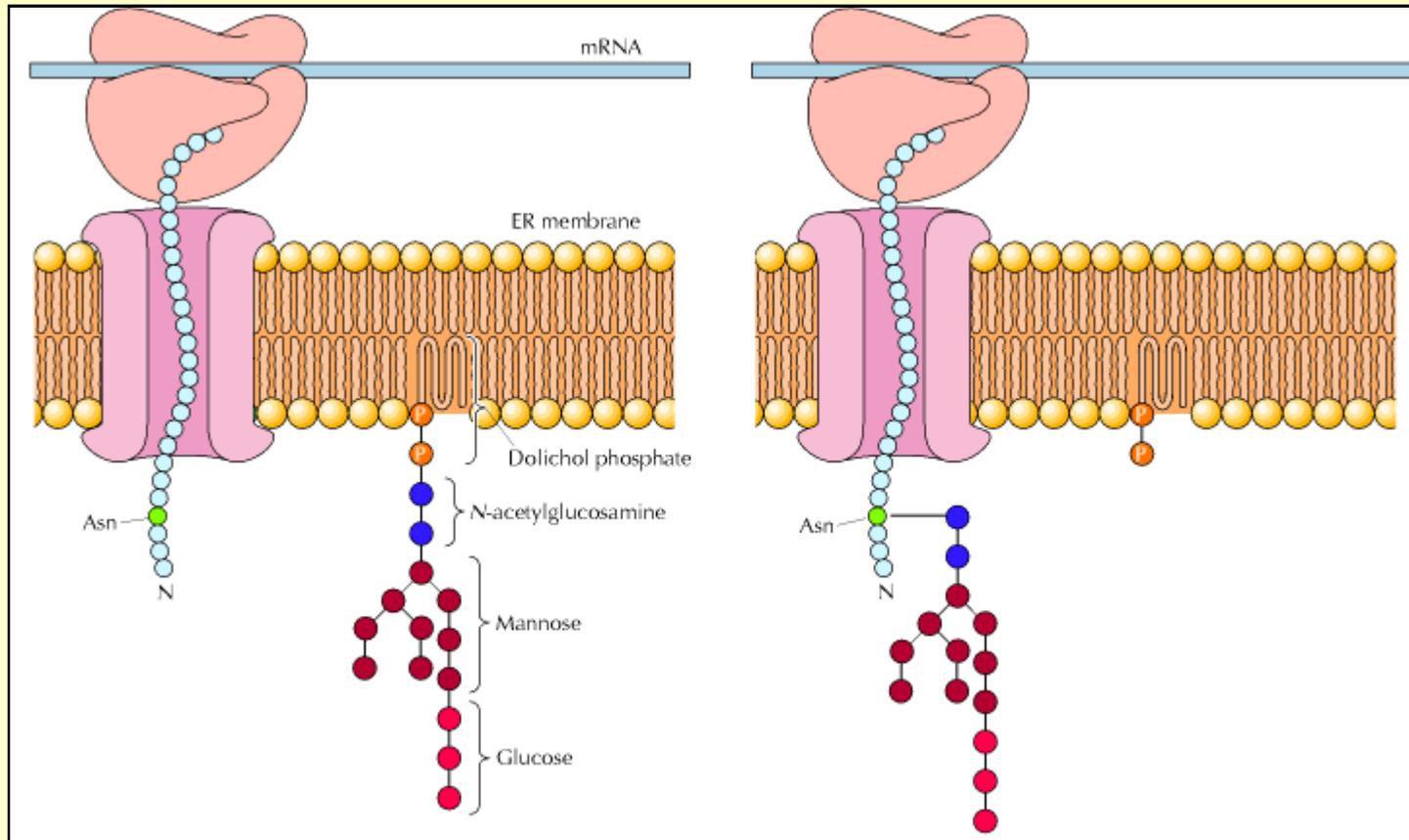
Se inserta como tipo I, una transamidasa reconoce y corta en una secuencia próxima al stop transfer y transfiere el resto de la proteína a un ancla preformada dirigiéndola a la cara apical en células polarizadas.

Las proteínas solubles y de membrana recientemente sintetizadas sufren cinco importantes modificaciones antes de alcanzar su destino final

- 1. Formación de puentes disulfuro**
- 2. Plegamiento y control de calidad**
- 3. Adición y procesamiento de carbohidratos**
- 4. Proteólisis específica**
- 5. Oligomerización**

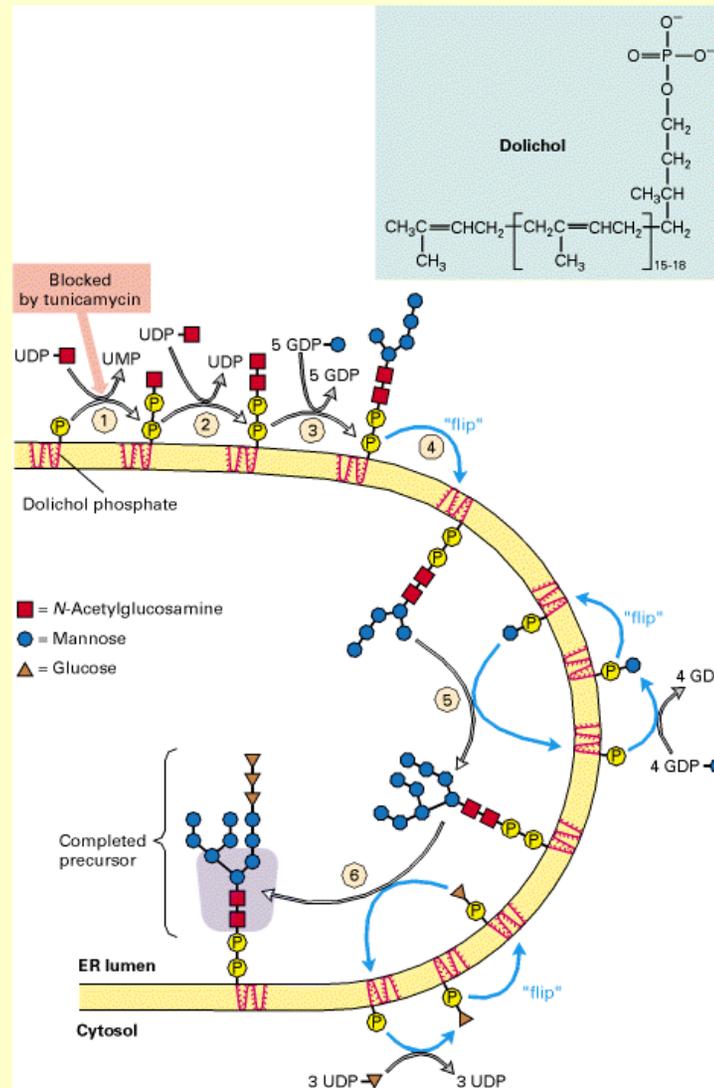


La glicosilación es la principal modificación post-traducciona que sufren las proteínas en la vía secretoria. La N-glicosilación es un proceso esencial para la viabilidad celular y juega un papel fundamental en la actividad biológica y en las propiedades físico-químicas de las proteínas.

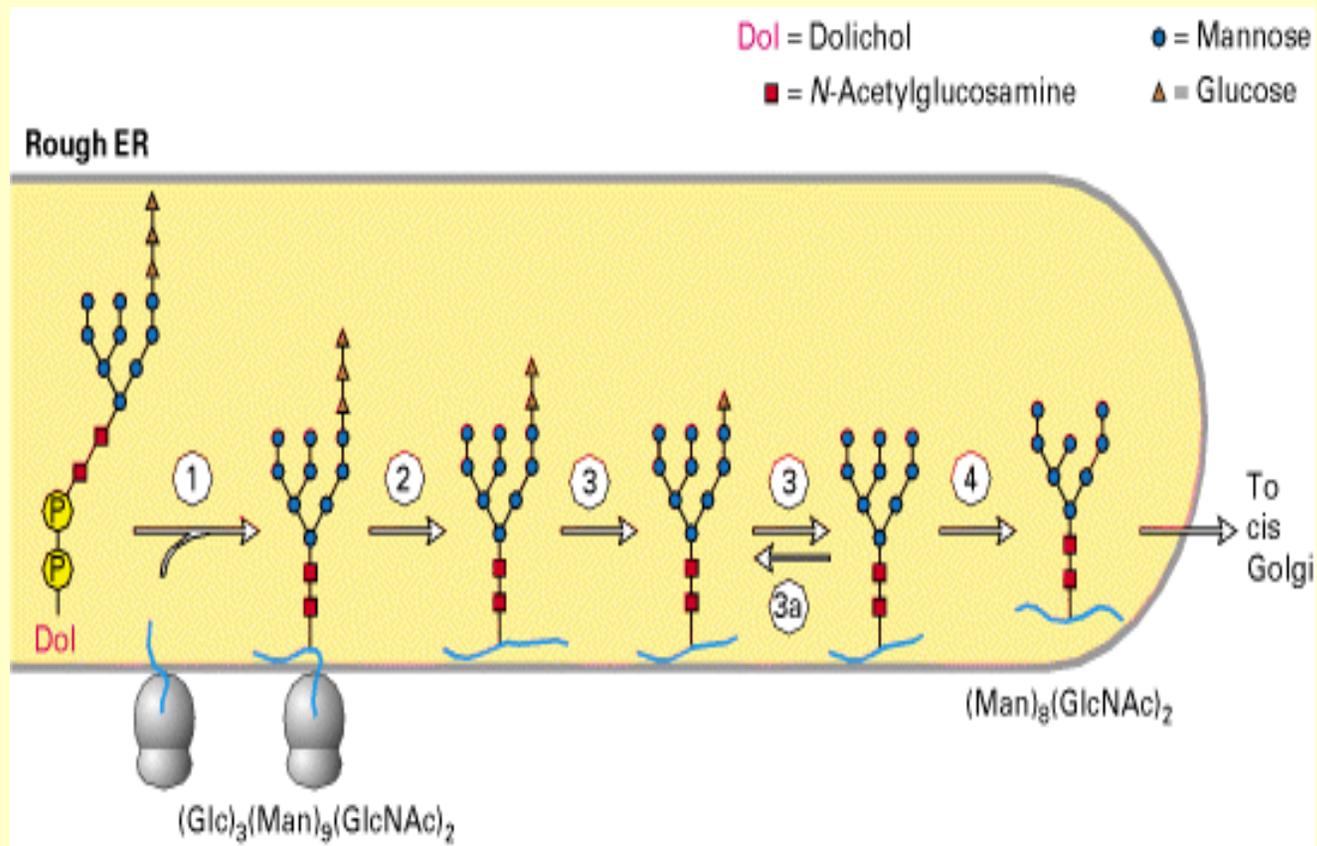


La N-glicosilación comienza en la mayoría de los eucariotas con la transferencia en bloque de un oligosacárido preformado $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a secuencias Asn-X-Ser/Thr en péptidos nacientes a partir del Dol-PP-oligosacárido.

Síntesis del Dol-PP-oligosacárido



Procesamiento del oligosacárido unido a proteína



Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)

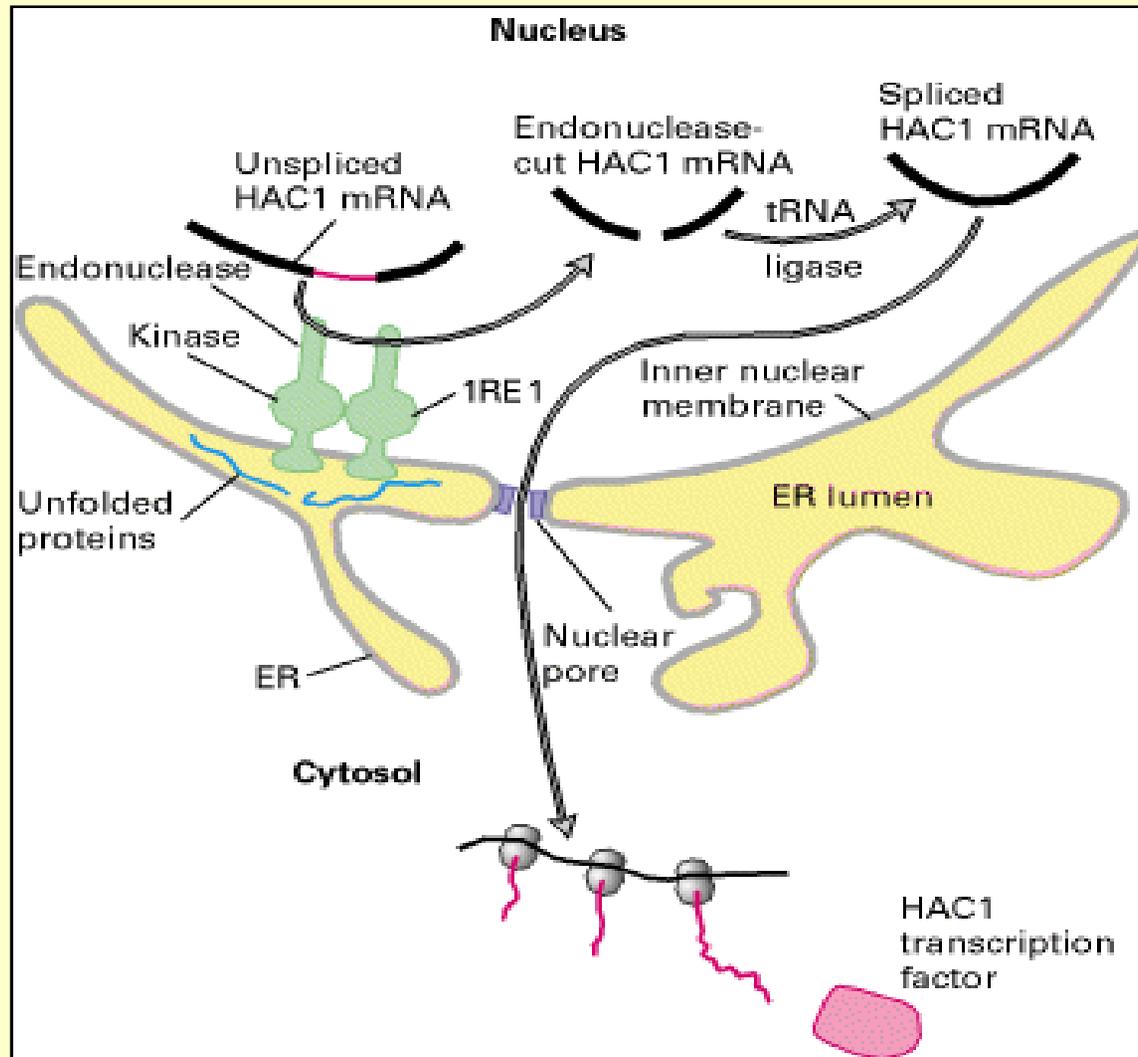


Table 1**Human diseases linked to ER stress**

Disease	Protein	Function	Major pathology	Ref
Wolcott-Rallison Syndrome	PERK	UPR sensor	Infantile diabetes	[8]
Wolfram Syndrome	WFS1	Involved in ERAD?	Diabetes insipidus, neurodegeneration	[8]
Hereditary tyrosinemia type I	FAH	Tyrosine metabolism	Liver and renal dysfunction; accumulation of a metabolic intermediate causes ER stress	[9]
Familial hypercholesterolemia	LDLR	Low density lipoprotein receptor	Hypercholesterolemia; accumulation of mutant protein causes ER stress	[59]
Z α 1-antitrypsin deficiency	A1AT (α 1-antitrypsin)	Protease inhibitor	Early onset liver disease; accumulation of mutant protein causes ER stress	[18]
Inclusion body myopathy (IBM/PFD)	p97/VCP/CDC48	ERAD	Early onset Paget disease and frontal temporal dementia, muscular dystrophy, motor neuron degeneration	[60,61]
Parkinson's disease	Parkin Others	E3 ubiquitin ligase	Tremor, bradykinesia; loss of inclusion-containing dopaminergic neurons in the substantia nigra; Mutation of Parkin causes ER stress	[16]
Familial Alzheimer's disease	PS1 Others	γ -secretase complex	Memory loss, dementia; loss of neurons from frontal cortex, hippocampus, basal forebrains, formation of extracellular plaques and intracellular neurofibrillary tangles; ER stress?	[16, 62,63]
Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis	SOD1	Cu/Zn superoxide dismutase	Degeneration of motoneurons in spinal cord, cortex and brain stem; caspase 12 is activated and mutant SOD1 forms aggregates in ER in transgenic mice	[16,64]
Marinesco-Sjögren syndrome	SIL1/BAP/SLS1	BiP adenine nucleotide exchange factor	Cerebellar ataxia, myopathy, cataracts; ER stress and UPR activation are observed in a mouse model	[39*, 40,41]
GM1 gangliosidosis	β -galactosidase	Carbohydrate/lipid metabolism	Severe cerebral neurodegeneration; Accumulation of gangliosides; ER stress is observed in a mouse model	[43*]
Pelizaeus-Merzbacher disease	PLP1	Proteolipid protein 1, myelin component	Spastic quadriplegia, ataxia; dysmyelination; ER accumulation of PLP causes ER stress	[16]
Batten disease/Infantile neuronal ceroid lipofuscinosis	PPT1	Palmitoyl-protein thioesterase-1	Seizures, mental deterioration, blindness; accumulation of toxic fatty-acylated proteins in neurons; may involve ER stress and activation of caspase 4	[65]
Bipolar disease	XBP1?	UPR sensor	Manic/depressive psychosis; <i>Xbp1</i> gene polymorphism?	[20,21]
Transmissible Spongiform Encephalopathy	PrP		Neuronal loss due to accumulation of the misfolded prion protein; enhanced calcium release and ER stress may be involved	[16]
Spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease	SCA3		Ataxia, abnormal ocular movement, spasticity; activation of the IRE1 and PERK branches of UPR	[16]
Huntington's disease	Huntingtin		Neurodegeneration, motor dysfunction, abnormal cognition; mutant huntingtin changes ER calcium homeostasis	[16]
Sporadic inclusion body myositis	APP		Muscle degeneration with vacuolated muscle fibers; inclusions containing either β -amyloid or phosphorylated tau induces ER stress	[19]
Cerebral ischemia			Paresis, memory disturbance; neuron death; ER stress and CHOP activation	[15]
Atherosclerosis			Cholesterol deposition on the artery wall; hyperhomocysteinaemia and accumulation of unesterified cholesterol cause UPR induction	[10, 66,67]
Solid tumors			UPR activation can protect tumor cells from hypoxia-induced apoptosis	[12]
Viral infection			UPR activation upon viral infection	[11]
Inflammation			Utilizes a specific UPR sensor, CREB-H	[25*]
Fluoride tooth			Fluoride causes ER stress in ameloblast, resulting in dental enamel formation	[68]

UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR)

La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del ER induce una respuesta adaptativa denominada UPR que coordina diferentes programas

Es el sistema de transducción de señales entre organelas mejor conocido

La UPR provee una forma de comunicación entre el núcleo y el lumen del ER y genera una respuesta a las cambiantes necesidades del mismo (‘‘fisiológicas’’ y de STRESS)

STRESS es la respuesta de un sistema a la perturbación de su estado normal

La capacidad de la célula de sentir, responder y controlar el stress es esencial para mantener la homeostasis

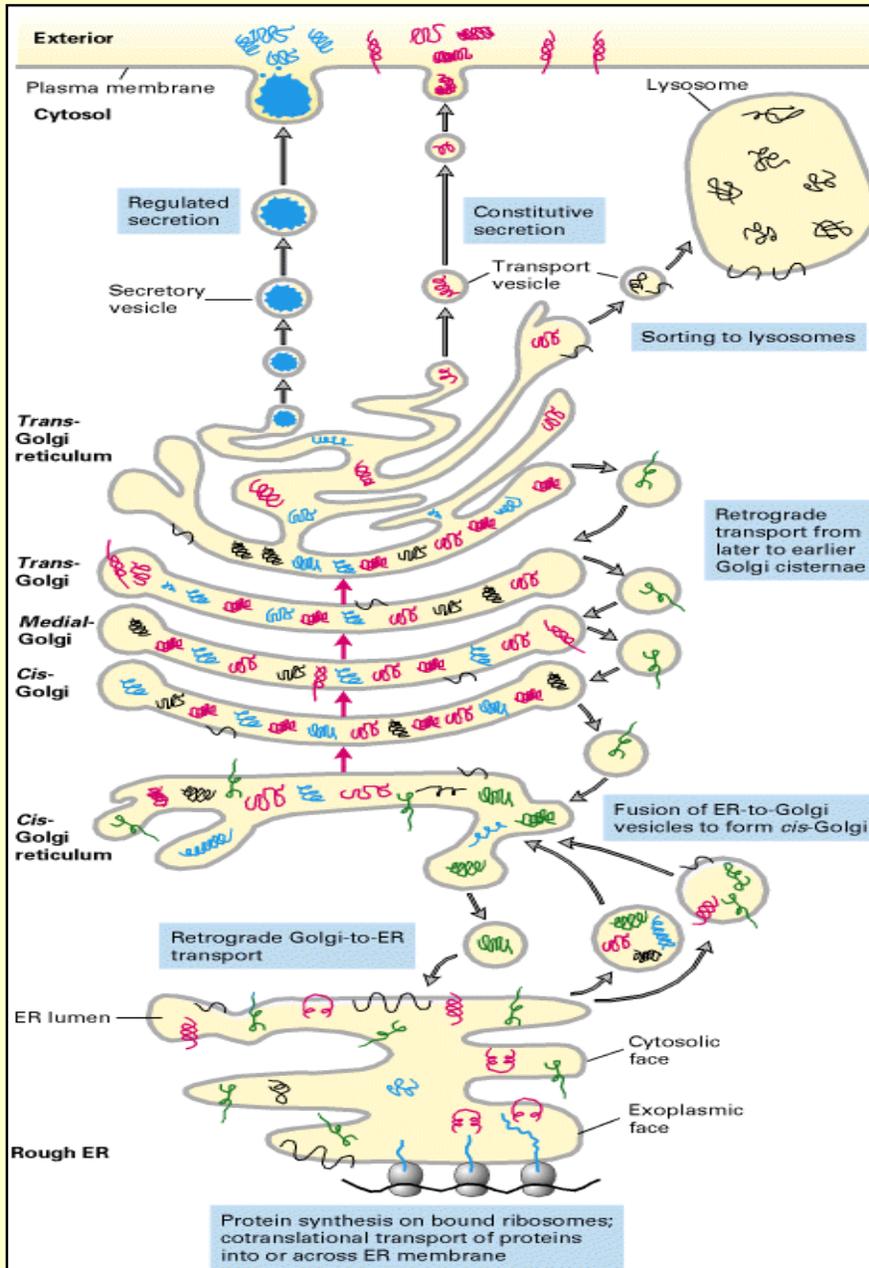
Genes regulados por la UPR

Table 1: Classes of UPR-regulated genes. This list was adapted from the data of Travers et al. (2000)

Function	Number of genes
Secretory pathway	103 total
ER protein translocation	7
Lipid/Inositol metabolism	19
ER protein glycosylation	17
Protein folding	10
Protein degradation	6
ER-to-Golgi transport	11
Golgi-to-ER retrieval	5
Golgi glycosylation	6
Vacuolar targeting	4
Distal secretion	7
Cell wall biogenesis	11
Non-secretory pathway	105 total
Unknown function	173 total

Exportación de proteínas del ER

- Las proteínas y los lípidos viajan de un compartimiento a otro en vesículas que emergen de un organelo y se fusionan con otro
- Las proteínas del lumen son empaquetadas en las vesículas y liberadas en el lumen del próximo compartimiento. Las proteínas de membrana viajan como parte de la membrana en la vesícula
- Si bien algunas proteínas deben seguir la vía secretoria. Otras deben ser retenidas en el ER (GT, GLS2, Bip, CNX)
- Salida del ER es otro punto de sorting. Señal proteínas solubles HDEL y KKXX las de membrana



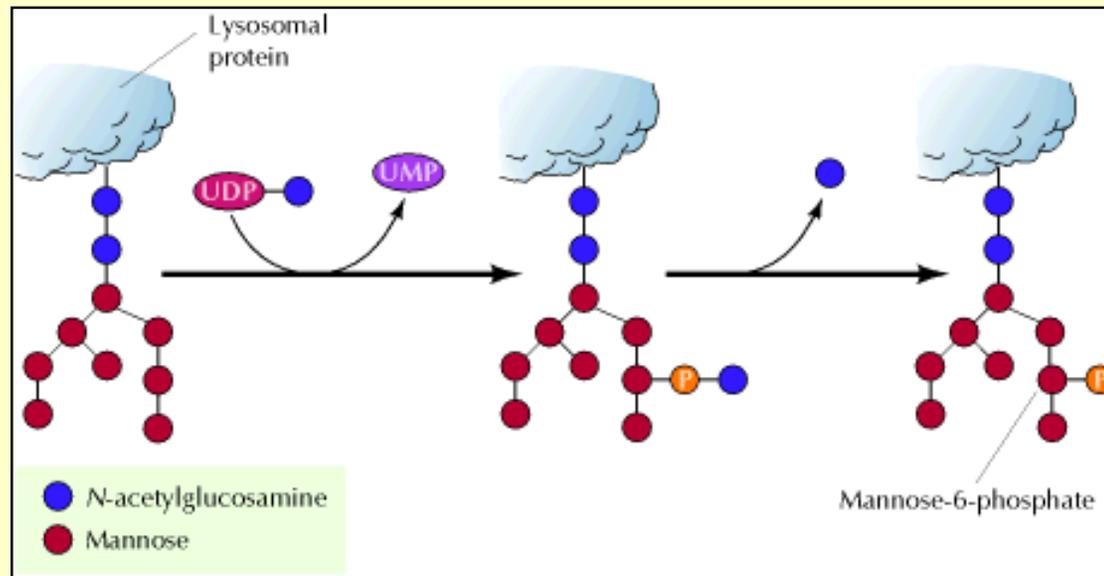
Formado por cisternas que maduran (cis, medial y trans, cada uno con funciones específicas).

Las proteínas sufren modificaciones sucesivas y cuando llegan a la cara trans son seleccionadas y enviadas a su destino final

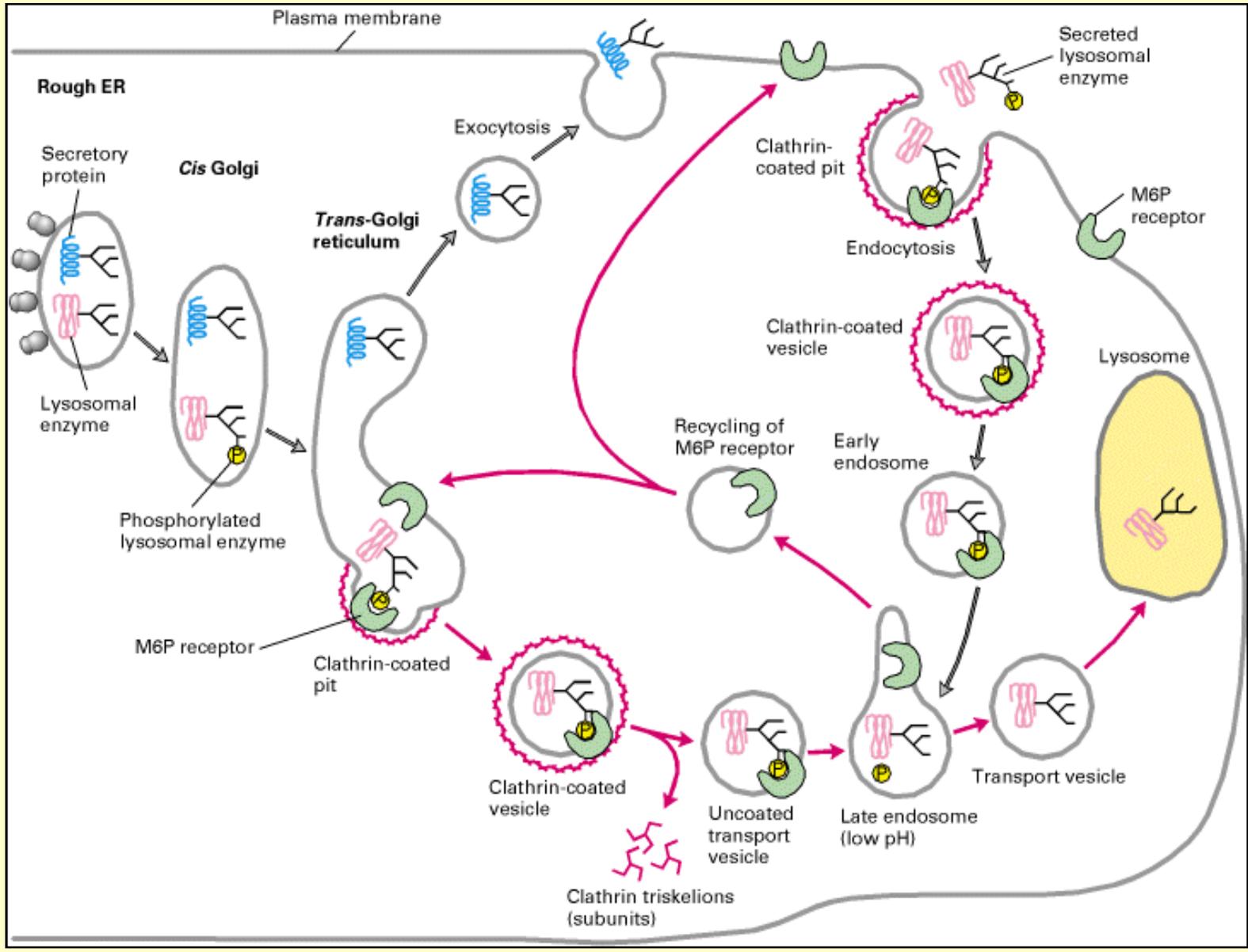
Procesamiento de oligosacáridos relacionados con función o llegada a destino final. (ER-plegamiento).

Síntesis de lípidos y azúcares complejos (ceramidas, glicolípidos, pectina, hemicelulosa).

Procesamiento de los oligosacáridos de las proteínas lisosomales

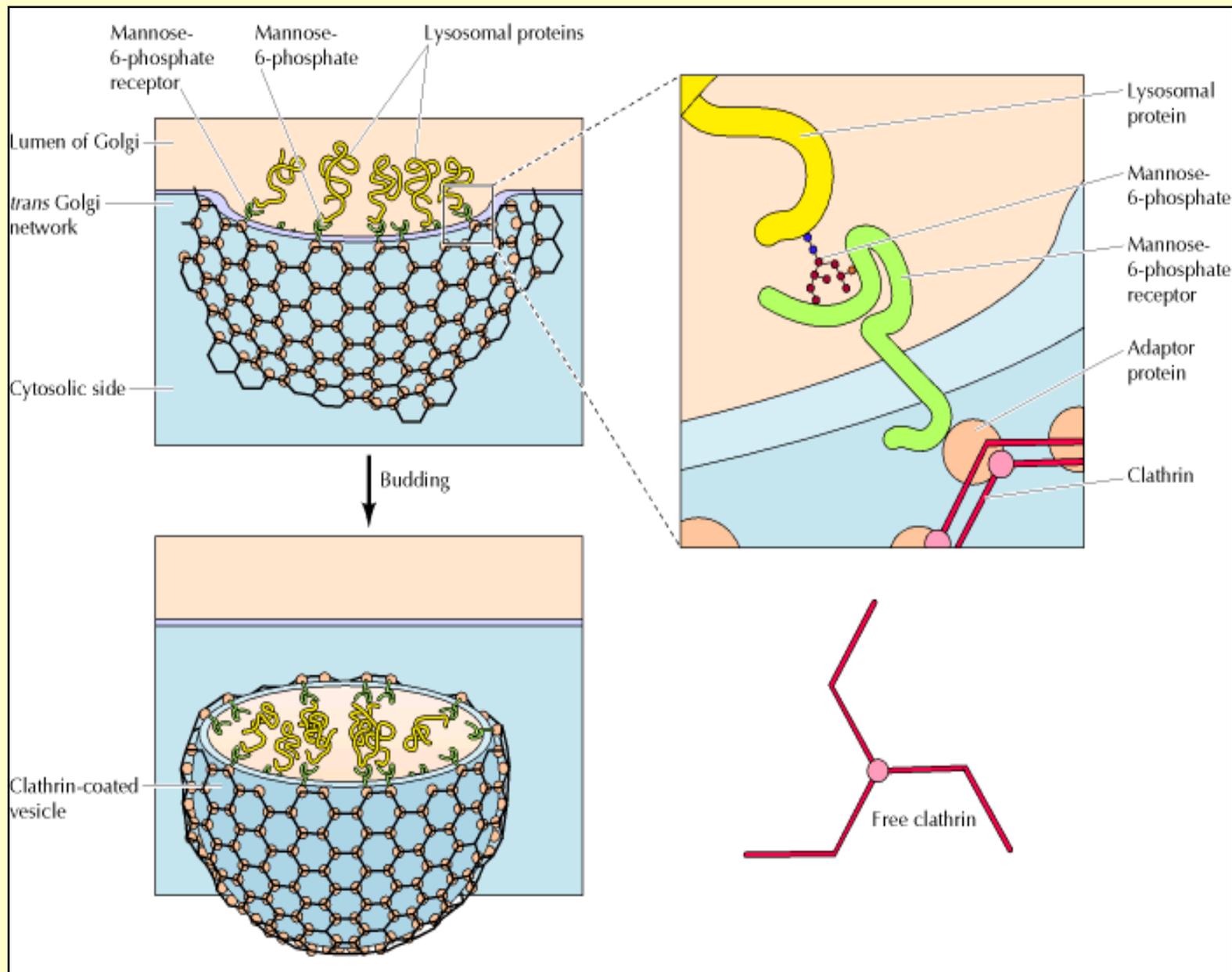


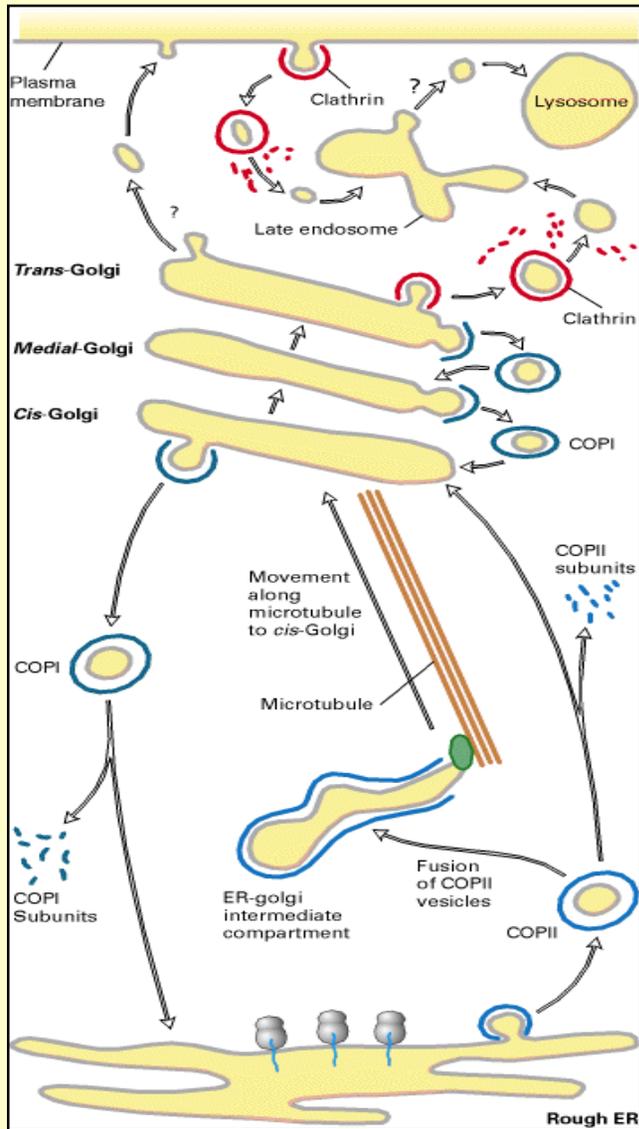
Se agrega una GlcNAc-P a una Man, luego se remueve la GlcNAc, dejando un residuo de Man-6-P. La señal no es lineal sino conformacional



Sorting en el trans-Golgi

- Proteínas lisosomales.
- Proteínas de secreción (constitutiva y regulada).
- Proteínas de Membrana Plasmática, en células polarizadas dos destinos posibles (apical o basolateral). Las tight junctions proveen esa identidad.
- Diversos mecanismos y no se conocen las señales moleculares.
- Probablemente varias señales en la misma proteína.





Tipos de vesículas correspondientes a los tres tipos de cubierta (COP I, COP II y clatrina) conocidas involucradas en el transporte de proteínas en la vía secretoria, tráfico vesicular y en la endocitosis

Signal Sequence*	Type of Protein	Transport Step	Vesicle Type	Signal Receptor
Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)	Secreted	Golgi to ER	COP I	KDEL receptor (ERD2 protein) in Golgi membrane
Lys-Lys-X-X (KKXX)	Membrane	Golgi to ER	COP I	COP α and β subunits
Di-acidic (e.g., Asp-X-Glu)	Membrane	ER to Golgi	COP II	Not known
Mannose 6-phosphate (M6P)	Secreted	<i>Trans</i> -Golgi and plasma membrane to late endosome	Clathrin	M6P receptor in Golgi and plasma membrane; AP1 and AP2 adapter proteins
Tyr-X-X- \emptyset (YXX \emptyset)	Membrane	Plasma membrane to endosome	Clathrin	AP2 adapter proteins
Leu-Leu (LL)	Membrane	Plasma membrane to endosome	Clathrin	AP2 adapter proteins

* X = any amino acid; \emptyset = bulky hydrophobic residues. Single-letter abbreviations are shown in parentheses.

Signal sequences are located in the cytosolic domains of membrane proteins.

Las secuencias señal en las proteínas que van a ser transportadas hacen contacto molecular con proteínas que forman parte de las vesículas