Leucin kao signalna molekula

Kostelac, Anja

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:630639

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

LEUCIN KAO SIGNALNA MOLEKULA

LEUCINE AS A SIGNAL MOLECULE

SEMINARSKI RAD

Anja Kostelac
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ:

1. UVOD
……..……..1

2. BIOLOGIJA
LEUCINA……..1

2.1. LEUCIN
……..2

2.2. MEHANIZAM TRANSPORTA LEUCINA U STANICU……2

3. LEUCIN KAO SIGNALNA MOLEKULA KOJA REGULIRA EKSPRESIJU CILJANIH GENA
TRANSKRIPCIJE……...…….4

3.1. REGULATORNI PROTEIN OVISAN O LEUCINU……..4

3.2. ULOGE U NUKLEOIDNOJ ORGANIZACIJI I TRANSKRIPCIJI CILJANIH GENA ….…...…….8

4. LEUCIN KAO SIGNALNA MOLEKULA METABOLIZMA……10

4.1. PROTEIN SESTRIN2…….10

4.2. PRIJENOS SIGNALA POSREDNIČKIM PROTEINIMA……14

4.3. GRAĐA mTORC1……..….16

4.4. ULOGA U STANIČNOM METABOLIZMU……....18

5. ZAKLJUČAK…….....…….19

6. LITERATURA……..20

7. SAŽETAK……22

8. SUMMARY……...……...23

PRILOZI…….24

1. UVOD

Biosignalizacija je jedan od najbitnijih bioloških mehanizama te, kao takav, jedan od najistraživanijih područja molekularne biologije/biokemije. Signalizacija se temelji na pretvorbi primljenog izvanstaničnog signala u unutarstanični signal koji potiče ili utišava ciljane stanične procese. Prijenos signala uključuje proces umnažanja signala i prevođenja jedne vrste signala u drugi signal koja stanici predstavlja određenu informaciju. Glavne karakteristike biosignalizacije obuhvaćaju slijedeće: specifičnost signala obzirom na ciljani receptor te kooperativnost interakcija liganda i receptora, umnažanje signala enzimskom kaskadom, prilagodba receptora na produljenu izloženost signalu i integracija sličnih ili različitih signala istog staničnog puta. Signalizacijom se stanice (tkiva kod višestaničnih organizama) prilagođavaju izvanstaničnim uvjetima (staničnom okruženju) i na posredan način komuniciraju s okolinom tako da aktiviraju ili utišaju ekspresiju ciljanih gena, a time i metaboličke puteve. Općenito, prijenos signala započinje vezanjem izvanstaničnog primarnog signala na stanični receptor koji odgovara na vezanje tog signala konformacijskom promjenom. Zbog prvotne interakcije primarnog signala i receptora dolazi do porasta unutarstanične koncentracije sekundarnog signala koja predstavlja informaciju za aktivaciju/inhibiciju ciljanih enzima. Jednom kada je enzim aktiviran/inhibiran, enzim djeluje kao regulator određenih staničnih puteva čime se informacija vanstaničnog signala uspješno prenijela na unutarstaničnu razinu. Primarni signali su izvanstanični glasnici koji interakcijom sa staničnim receptorom prenose informaciju stanici o staničnoj okolini. Najpoznatiji primjeri su hormoni glukagon i inzulin te različiti neurotransmiteri. Za razliku od primarnih signala, sekundarni signali su unutarstanični glasnici čiju unutarstaničnu koncentraciju indirektno regulira primarni glasnik. Jedan od mnogih primjera sekundarnih glasnika je ciklički AMP (cAMP), inozitol trisfosfat i ion kalcija (Ca^{2+}). Signali mogu biti različitog podrijetla bez obzira na veličinu, masu ili kemijska svojstva: antigeni, razvojni signali, faktori rasta, hormoni, svijetlost, mehanički signali, nutrijenti, feromoni (Lehninger i sur, 2008). Jedan od aminokiselinskih staničnih signala je nepolarna aminokiselina L- leucin.

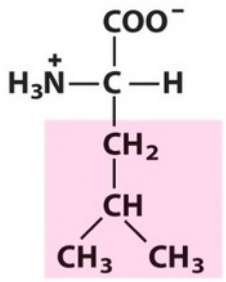
Općenito, L-leucin je vrlo bitna aminokiselinska gradivna molekula koja sudjeluje u gradnji proteina pa tako i tkiva bogatih proteinima (jetra, mišići), ali i u metabolizmu kao prekursor i intermedijer mnogih metabolita. Kao signalna molekula, L-leucin signalizira stanici da je u staničnom okolišu dovoljno hranjivih tvari koje se mogu iskoristiti kao

energija za vlastite metaboličke potrebe stanice. Drugim riječima, povećana koncentracija L-leucina u stanici je signal koji regulira ekspresiju gena i biosintezu proteina s ciljem određenog biološkog djelovanja. Cilj ovog rada je opisati L-leucin kao signalnu molekulu i pojasniti interakciju leucina s proteinskim senzorima Lrp (eng. *leucine-responsive regulatory protein*) u bakteriji *Escherichia coli* i Sestrin2 u sisavaca koji dalje prenose informaciju o stanju u okolišu na staničnu razinu i na taj način omogućuju ekspresiju ciljanih gena, odnosno aktivaciju metaboličkih puteva.

2. BIOLOGIJA LEUCINA

2.1. LEUCIN

L-leucin (u nastavku leucin), skraćeno Leu ili L, je nepolarna proteinogena aminokiselina koja za bočni ogranak ima izobutilnu skupinu (Slika 1.). Leucin pripada skupini razgranatih aminokiselina (eng. *branched-chain amino acid* (BCAA)) zbog toga što bočni ogranak, izobutilna skupina, nije linearne građe. Molekulska masa leucina je 131,17 Da, dok neto naboj ovisi o pH.

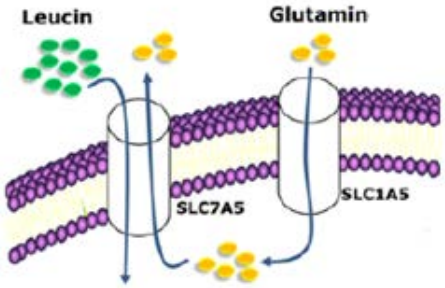


Slika 1. Strukturni prikaz L-leucina u formi Zwitter iona. Ružičasto označeno je bočni ogranak - izobutilna skupina. Leucin je α aminokiselina jer su amino i karboksilna skupina vezane na drugi (α) C atom (Lehninger i sur., 2008).

Zbog svoje nepolarnosti, ova se aminokiselina preferentno nalazi u hidrofobnoj unutrašnjosti proteina, stabilizirajući hidrofobnu srž proteina. Leucin je u stanici kodiran s ukupno šest kodona - UUA, UUG, CUU, CUC, CUA i CUG, prema čemu se može zaključiti da je vrlo bitna aminokiselina za pravilno funkcioniranje stanice. Sisavci ne mogu sintetizirati leucin, za razliku od biljaka i mikroorganizama, te im je ta aminokiselina esencijalna i mora biti uzeta prehranom (Lehninger i sur., 2008).

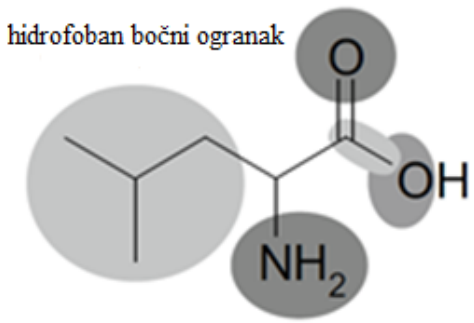
2.2. MEHANIZAM TRANSPORTA LEUCINA U STANICU

Leucin se u stanicu transportira Na^+-neovisnim glikoproteinskim transporterom LAT1 (eng. *L-type amino acid transporter 1* ili *large neutral amino acid transporter*) (Nagamori i sur., 2016). LAT1 je glikoproteinski transporter građen od heterodimernog glikoproteina CD98 koji se sastoji od monomera SLC3A2 i SLC7A5 (Pedroso, 2015, Boado, 1999). Uz leucin kojeg prenosi u stanicu LAT1 iznosi glutamin iz stanice pa je, prema tome, antiporter (Slika 2.) (Pochini i sur., 2004).



Slika 2. Shematski prikaz LAT1 transportera lokaliziranog na staničnoj membrani (na slici je prikazana samo podjedinica SLC7A5). Leucin se prenosi u stanicu, a istovremeno glutamin se iznosi iz stanice (Pedroso i sur., 2015).

Neophodni elementi prepoznavanja aminokiselina od strane LAT1 prilikom transporta u stanicu su karbonilni kisik, alkoksidni kisik karboksilne skupine i amino skupina (Slika 3.). Prema tome, LAT1 je univerzalni prenositelj različitih aminokiselina poput izoleucina, norvalina i valina zbog ostvarivanja interakcija sa zajedničkim dijelovima strukture aminokiselina (amino skupina i kraboksilna skupina). Međutim, najpovoljnije interakcije prenositelja i supstrata se ostvaruju kada je supstrat L-leucin.



Slika 3. Elementi prepoznavanja pripadne aminokiseline od strane LAT1. Crno označeni krugovi označavaju nužne dijelove (karbonilni kisik, alkoksidni kisik karboksilne skupine i amino skupina), a sivi

krugovi dijelove aminokiseline koji mogu biti varijabilni s tim da bočni lanac mora biti hidrofoban (Nagamori i sur., 2016).

Mehanizam transporta, temeljen na bakterijskom ortologu AdiC, smatra da leucin tvori vodikove veze svojim karbonilnim kisikom, alkoksidnim kisikom i amino skupinom s aktivnim mjestom transportera LAT1. Nakon uspostave povoljnih interakcija, transporter mijenja konformaciju što omogućava transport leucina u stanicu (Nagamori i sur., 2016).

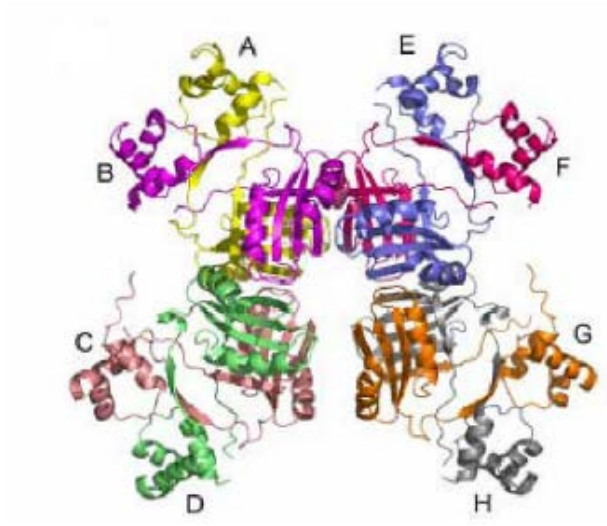
3. LEUCIN KAO SIGNALNA MOLEKULA KOJA REGULIRA EKSPRESIJU CILJANIH GENA TRANSKRIPCIJE

Leucin je molekula koja regulira stanični rast i metabolizam djelujući na ekspresiju ciljanih gena bakterije *E. coli*. Aktivirajući ili inaktivirajući posredničke proteine koji služe kao transkripcijski aktivatori ili represori, leucin djeluje na ekspresiju gena potrebnih za sintezu aminokiselina, aminoacil-tRNA-sintetaza, rRNA, ribosomalnih proteina i ostalih metabolita koji trebaju biti sintetizirani obzirom na trenutne uvjete okoliša. Jedan od takvih posredničkih proteina je i transkripcijski regulator Regulatorni protein ovisan o leucinu. Ovaj protein sudjeluje u regulaciji transkripcije gena za transport, biosintezu i katabolizam, ponajprije aminokiselina, ali i ostalih metabolita.

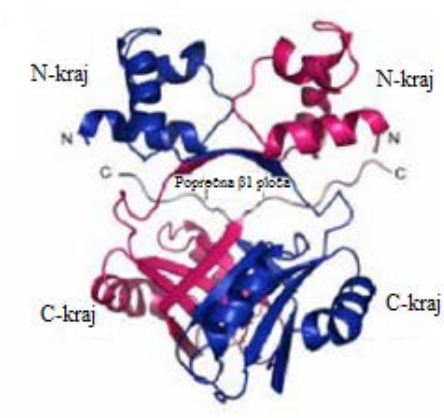
3.1. REGULATORNI PROTEIN OVISAN O LEUCINU

Regulatorni protein ovisan o leucinu (eng. *leucine- responsive regulatory protein),* skraćeno Lrp, je protein molekulske mase 18,8 kDa. Lrp je oktamer, odnosno dimer tetramera (Slika 4.A) i B)), koji pripada Lrp/AsnC obitelji transkripcijskih regulatornih proteina (Shimada i sur., 2015). Transkripcijski regulatori su proteini koji vezanjem ili disocijacijom s operatora omogućuju transkripciju gena, odnosno vezanje RNA-polimeraze na molekulu DNA kako bi se transkribirao kodirajući lanac. Lrp sadrži tri funkcionalne domene: N-kraj sadrži strukturni motiv zavojnica-okret-zavojnica (eng. *helix- turn- helix*), središnji dio proteina sadrži domenu potrebnu za aktivaciju ili stišavanje transkripcije, te C-kraj ima domenu odgovornu za vezanje leucina (Slika 4.C)) (Shimada i sur., 2015). Motiv zavojnica-okret-zavojnica (skraćenica HTH) je sveprisutan DNA vezni motiv koji se sastoji od dvije α-zavojnice između kojih je okret (Lehninger i sur., 2008). N-kraj Lrp-a se sastoji od tri α-zavojnice (Slika 4.C)). Između druge i treće zavojnice se nalazi okret (eng. *turn*). Treća zavojnica α3 se veže u veliki utor molekule DNA te na taj način utječe na ekspresiju gena. C-kraj veže signalnu molekulu te posjeduje strukturni motiv homologan domeni RAM (eng. *regulation of amino acid metabolism*) za

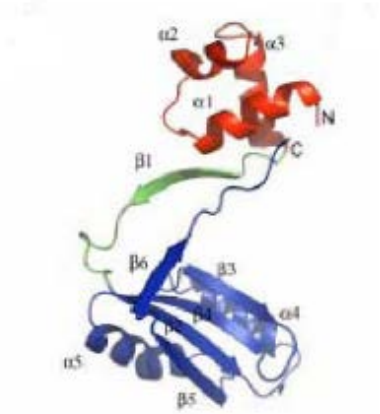
koju je dokazano da sudjeluje u ekspresiji gena koji reguliraju metabolizam aminokiselina (Slika 4.C)) (Shimada i sur., 2015, des los Rios i Perona, 2007).



(A)



(B)

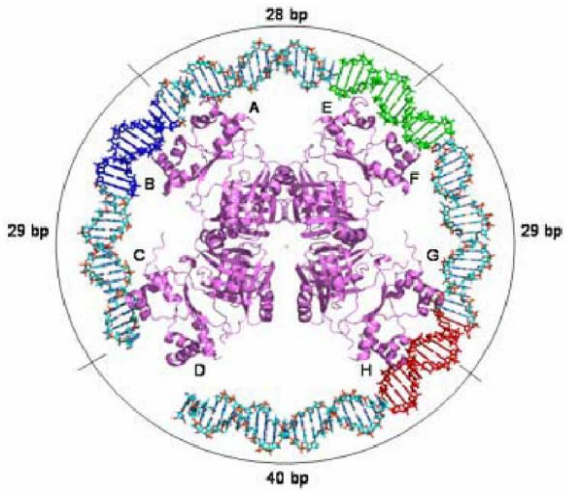


(C)

Slika 4. Struktura proteina Lrp. **A)** Oktamer Lrp baktrije *E. coli* tvori linearnu strukturu zbog nepovezivanja monomera CD i GH, dok su homolozi Lrp ciklične strukture. Oktamer je stabiliziran hirofobnim interakcijama. **B)** Prostorna organizacija Lrp dimera; monomeri su okrenti jedan od drugog. Poprečna β1 ploča formira flekisbilan aminokiselinski slijed koji omogućuje različitost pozicioniranja N- i C- terminalne domene monomera Lrp. Poprečna β6 ploča svakog monomera se povezuje s β3 pločom drugog monomera. **C)** Struktura monomera Lrp. N-kraj (crveno) sadrži HTH strukturni motiv, središnji dio proteina (zeleno) sadrži domenu potrebnog za transkripcijsku aktivaciju, te C-kraj (plavo) ima domenu odgovornu za vezanje leucina. Domena RAM ima βαββαβ motiv, a između β3 i β4 se nalazi omča na koju se veže na ligand, odnosno efektor – leucin (des los Rios i Perona, 2007).

Iako nema razrađenog mehanizma djelovanja proteina Lrp smatra se da vezanjem leucina na domenu RAM (na omču između β3 i β4 podjedinica monomera) dolazi do

konformacijske promjene proteina kojom se utječe na interakciju HTH motiva (α3 zavojnice) s velikim utorom molekule DNA (des los Rios i Perona, 2007). Lrp je transkripcijski regulator – može biti ili aktivator ili represor mnogih operona. Njegova funkcija može biti aktivirana, reducirana ili potpuno neovisna o egzogenom leucinu. Mnogo mogućnosti regulacije ekspresije ciljanih gena proteinom Lrp dozvoljava različitu regulaciju obzirom na uvjete okoliša. Lrp može djelovati na transkripciju na dva načina: pozitivnom ili negativnom regulacijom. Iako točno nije razjašnjen mehanizam, smatra se da vezanje leucina na Lrp djeluje na ekspresiju gena na slijedeći način: pozitivna regulacija u odnosu na Lrp znači da je ekspresija ciljanih gena potaknuta kada je vezan protein Lrp na molekulu DNA. Lrp je u ovom slučaju aktivator. Vezani HTH motiv na molekuli DNA uzrokuje uvijanje DNA na mjestu operatora te tako priprema promotor za interakciju s ostalim proteinima koji sudjeluju u transkripciji kao i s RNA-polimerazom. RNA-polimeraza odvija DNA na mjestu promotora kako bi se omogućila transkripcija i sinteza domena mijenja konformaciju te se Lrp više ne može vezati na molekulu DNA. Nakon disocijacije proteina Lrp više se ne može vezati transkripcijski kompleks koji inicira transkripciju. Drugim riječima, u ovom slučaju vezanje leucina na protein Lrp inhibira ekspresiju ciljanih gena. Važno je uočiti da se Lrp veže na više mjesta unutar promotora čime se dolazak transkripcijskog kompleksa na dodatan način aktivira (Slika 5.). Sličan se motiv vezanja aktivatora na više mjesta unutar operona uočava i kod *lac* operona. Negativna regulacija u odnosu na protein Lrp znači da je ekspresija ciljanih gena suprimirana dok god je Lrp vezan na molekulu DNA. Vezani protein Lrp ometa inicijaciju transkripcije te ne dopušta transkripcijskom kompleksu da se veže na promotor. U ovom slučaju, Lrp je represor jer ometa vezanje transkripcijskog kompleksa. Vezanjem leucina u aktivno mjesto Lrp-a HTH domena mijenja konformaciju te se oslabljuju interkacije Lrp s molekulom DNA. Time se omogućava vezanje transkripcijskog kompleksa i ekspresija gena. Drugim riječima, vezanje leucina na protein Lrp aktivira ekspresiju ciljanih gena (Newman i Lin, 1995).



Slika 5. Prikaz vezanja oktamera Lrp na molekulu DNA. Navedene duljine DNA u parovima baza (bp) označavaju međusobnu udaljenost dimera Lrp (des los Rios i Perona, 2007). Očuvani slijed molekule DNA koji ostvaruje interakcije s HTH motivom: TTTATTCTNAAT. Ako slijed nukleotida DNA na koji se veže Lrp sadrži metiliran GATC dio, Lrp se veže drugačijim afinitetom (Calvo i Matthews, 1994).

Lrp regulira metaboličke puteve kao odgovor na dostupnost aminokiseline leucina u staničnom okolišu. Lrp pozitivno regulira one gene koji sudjeluju u metabolizmu tijekom uvjeta gladi, a negativno regulira one gene koji sudjeluju u metabolizmu tijekom uvjeta kada je hrana dostupna (Tablica 1.). Količina proteina Lrp tijekom rasta bakterija u minimalnom mediju je veća nego prilikom rasta u bogatom mediju (npr. LB). Princip zašto je u bogatom mediju koncentracija Lrp manja nije poznat. Tijekom rasta u minimalnom mediju, tj. u uvjetima gladi, koncentracija Lrp je visoka, a leucina vrlo niska pa su pozitivno regulirani geni maksimalno eksprimirani, a negativno regulirani maksimalno utišani. U minimalnom mediju s leucinom ili alaninom, koncentracija Lrp je visoka pa su pozitivno regulirani geni relativno eksprimirani, a negativno regulirani relativno utišani zbog prisutnosti leucina. U bogatom mediju s puno leucina pozitivno regulirani geni su potpuno utišani, a negativno regulirani potpuno eksprimirani zbog toga što je koncentracija Lrp niska (Calvo i Matthews, 1994).

Pozitivno regulirani geni u odnosu na Lrp	**Negativno regulirani geni u odnosu na Lrp**
ilvIH (AHAS III)	*sdaA* (L-serin-deaminaza)

serA (3-fosfoglicerat-dehidrogenaza)	*tdh* (treonin-dehidrogenaza)
gcv (sustav razgradnje glicina)	*lysU* (lizil-tRNA-sintetaza II)
gltBDF (glutamat-sintaza)	*lrp* (Lrp)
glnALG (glutamin-sintetaza)	*micF* (antisense RNA)
ompF (porin F)	*ompC* (porin C)
papBA (P pili)	*livJ* (leucin-vezujući protein)[a]
fanABC (K99 pili)	*livKHMGF* (LIV-I transport)[a]
daaAB (F1845 pili)	*glyA* (serin-hidroksimetiltransferza)
sfaBA (S pili)	*oppABCDF* (oligopeptid-permeaza)
fimB i *fimE* (poticanje pila vrste I)	
pnt (piridin nukleotid-transhidrogenaza)	
CP8 (korištenje ugljikohidrata, tj. šećera)	
leuABCD (biosinteza leucina)	

[a] Operoni su negativno regulirani u odnosu na Lrp, dok je u prisutnosti leucina represija znatno povećana.

Tablica 1. Popis pozitivno i negativno reguliranih gena u regulonu Lrp. Regulon je grupa gena koja se ragulira kao cjelina, odnosno jedan regulator regulira ekspresiju niza gena koji su pod njegovom kontrolom (tablica prilagođena prema Calvo i Matthews, 1994).

Uspostava regulacije ekspresije gena *lrp* je vrlo bitna jer ako stanična koncentracija Lrp nije varijabilna, onda će ekspresija nekih gena uvijek biti utišana/aktivirana. Prema tome, moraju postojati faktori regulacije transkripcije gena *lrp*. Smatra se da je jedan od najvažnijih faktora medij u kojem raste bakterija *E. coli*. Što je medij bogatiji nutricijentima, to je manja koncentracija proteina Lrp. Jedan od faktora koji reguliraju transkripciju gena *lrp* je i sam protein Lrp, što znači da je Lrp autogeno reguliran. Što je veći broj kopija gena *lrp* u bakteriji *E. coli*, to je stanična koncentracija proteina Lrp manja. Drugim riječima, ako je gen lokaliziran na plazmidu, kojeg ima veliki broj u bakterijskoj stanici, ekspresija gena *lrp* je umanjena 10 puta u odnosu kada je prisutna samo jedna kopija gena na nukleoidu. Ekspresija gena *lrp* nije pod utjecajem leucina.

Smatra se da je protein Lrp evoluirao zbog prilagodbe bakterije *E. coli* na okoliš bogat nutricijentima. Takva bakterija *E. coli* je imala mnoštvo asimilacijskih, a malo

biosintetskih gena pa se vjeruje da je nastanak ovog proteina uvjetovan prijelazom s asimilacijskog na biosintetski načina života. Leucin kao efektor nije odabran zbog kemijskih svojstava karakterističnih za ovu aminokiselinu, nego vjerojatno slučajno zbog toga što je indikator aktivne proteolize u staničnoj okolini (Newman i Lin, 1995).

3.2. ULOGE U NUKLEOIDNOJ ORGANIZACIJI I TRANSKRIPCIJI CILJANIH GENA

Protein Lrp ima glavnu ulogu u regulaciji transkripcije ciljanih gena, ali i jednu manje istraženu ulogu u kondenzaciji nukleoida. U većini prokariota kružna nukleoidna DNA se gusto pakira superzavijanjem, no sve je više indikacija da postoje i različiti proteini (IHF, Crp) koji sudjeluju u tom procesu. Iako se Lrp veže najvećim afinitetom na očuvani slijed molekule DNA od 12 parova baza (TTTATTCTNAAT) čime regulira ekspresiju gena, vezanje na drugačije sljedove molekule DNA s manjim afinitetom, omogućuje kondenzaciju i pakiranje prokariotske DNA. Naime, više je razloga zbog kojih se smatra da je Lrp ima ulogu u nukleoidnoj organizaciji bakterije *E. coli*: male dimenzije, mogućnosti savijanja molekule DNA kao pripreme za transkripciju i veliki broj molekula po stanici (3000 molekula /stanici) (Newman i Lin, 1995).

Kao transkripcijski regulator, Lrp pozitivno ili negativno regulira monoge operone: biosintetske, degradivne, transportne, one koji reguliraju sintezu pila i fimbrija i ostale. Također regulira ekspresiju transkripcijskih faktora. Prema tome, Lrp dirketno ili indirekno djeluje na ekspresiju gena. Direktno tako da regulira operone, a indirektno tako da regulira operone preko posrednog transkripcijskog regulatora.

Pet operona uključenih u sintezu aminokiselina je regulirano s proteinom Lrp: *glnALG* – kodira za glutamin-sintetazu, *gltBDF* - kodira za glutamat-sintazu, *ilvIH* – kodira acetohidroksikiselinsku-sintazu III (enzim uključen u sintezu razgranatih aminokiselina), *leuABCD* – kodira enzime biosinteze leucina i *serA* – kodira fosfoglicerat-kinazu. Lrp direktno vezujući se na operone pozitivno regulira sve operone osim *glnALG* kojeg regulira indirektno; tako da aktivira njegov transkripcijski regulator.

Tri operona uključena u degradaciju aminokiselina je reglirano s proteinom Lrp: *sdaA* – kodira za L- serin-dehidratazu, *tdh* – kodira za treonin-dehidrogenazu i 2-amino-3-ketobutirat-lijazu i *gcv* – kodira za protein potreban za formiranje molekula s 1 C atomom od glicina. Prva dva operona su negativno, dok je posljednji *gcv* pozitivno reguliran.

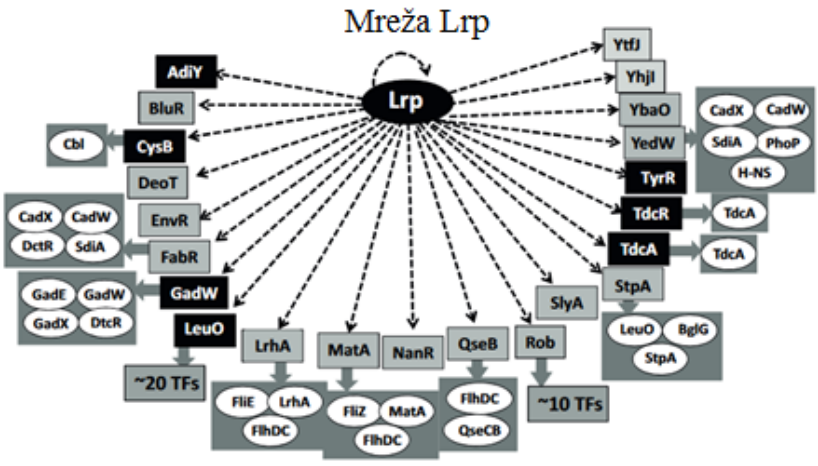
Šest operona uključenih u transport nutrijenata u stanicu je negativno regulirano s Lrp: *livJ* i *livKHMGF* – kodiraju proteine za transport dugolančanih aminokiselina, *oppABCDF* – kodira za oligopeptid-permeazu, *sdaC* – kodira protein za transport L-serina, *malEGH*, *malK-lamB-malM* i *malT* – kodiraju proteine za transport maltoze te *ompF i ompC* – kodiraju za porine vanjske membrane gram negativnih bakterija.

Različiti operoni koji kodiraju za različite vrste pila i fimbrija su regulirani od strane proteina Lrp.

Lrp pozitivno regulira *osmY* – protein koji je prisutan prilikom ulaska u stacionarnu fazu rasta bakterijske kulture (Calvo i Matthews, 1994).

Osam aminoacil-tRNA-sintetaza je pozitivno regulirano s Lrp: *alaS, asnS, glnS, glyQ, pheS, serS, thrS i tyrS*. Svih sedam gena rRNA bakterije *E. coli* je pod kontrolom Lrp (Shimada, 2015). Također su i geni tRNA pod kontrolom istog transkripcijskog regulatora (Pul, 2005).

Lrp i indirektno djeluje na ekspresiju gena. Regulator je transkripcije 21 metaboličkog transkripcijskog regulatora, uključujući i samog sebe – gen *lrp* (Slika 6.) (Shimada i sur., 2015).



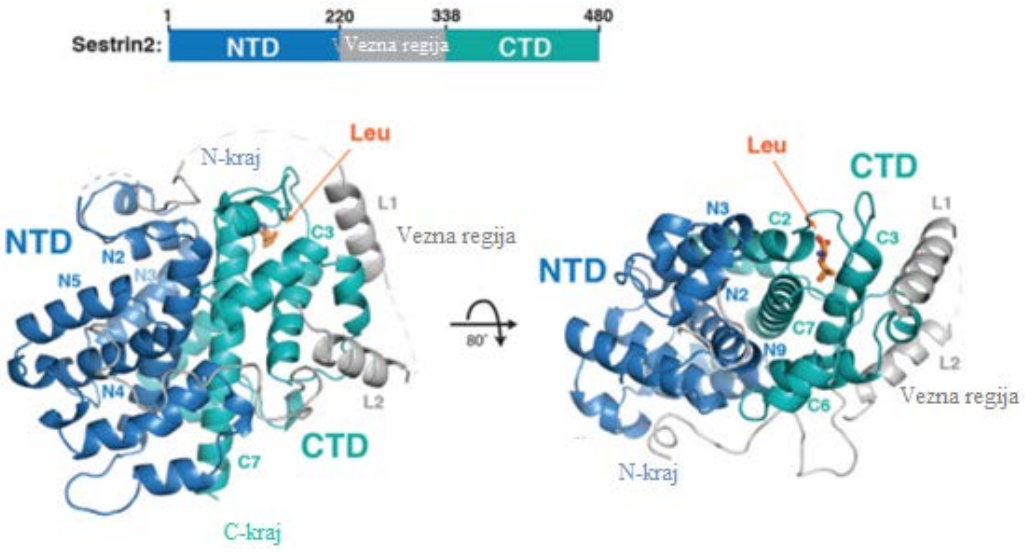
Slika 6. Mreža transkripcijskih regulatora pod kontrolom tranaskripcijskog regulatora Lrp. Crno pobojani kvadrati predstavljaju proteine koji kodiraju za regulatore aminokiselinskih regulona – *AdiY, CysB, GadW, LeuO, TdcA, TdcR, TyrR*. Sivo pobojani kvadrati predstavljaju proteine koji kodiraju za regulatore gena zaslužnih za odgovor na stres i životni okoliš bakterije *E. coli* (Shimada i sur., 2015).

4. LEUCIN KAO SIGNALNA MOLEKULA METABOLIZMA

Leucin je aminokiselina koja nije samo signal u bakteriji *E. coli*, nego je i signalna molekula u stanicama sisavaca i kvasaca. Leucin je molekula koja regulira stanični rast i metabolizam aktivirajući posrednički kompleks okolišnih signala i staničnog metabolizma – mTORC1. Aktivacijom mTORC1 aktivira se i posrednik koji umnaža signal leucina na razinu metabolizma – mTOR protein-kinaza koja regulira, između ostalog, sintezu proteina i lipida, ali i autofagiju.

4.1. PROTEIN SESTRIN2

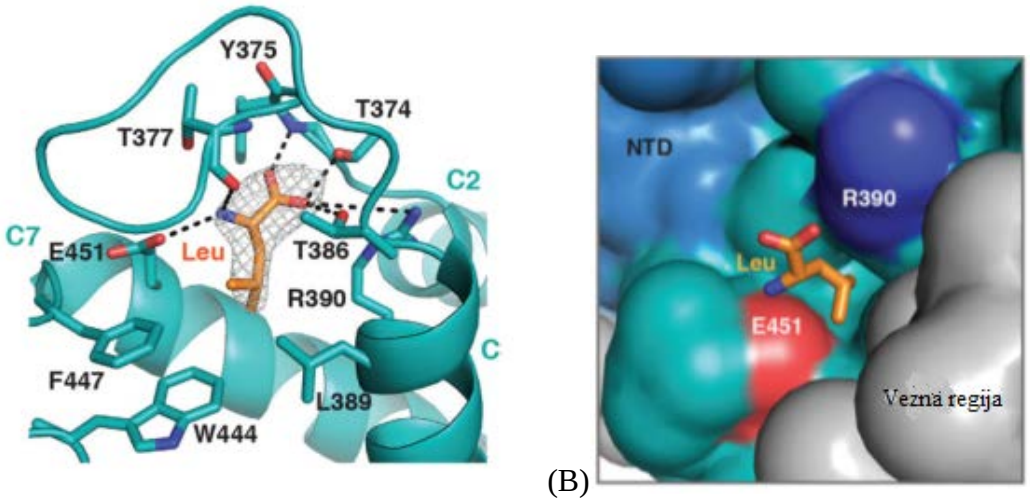
Dugo se godina smatralo da je leucil-tRNA-sintetaza potencijalni senzor leucina u stanicama sisavca, no tijekom godina istraživanja došlo se do saznanja da je jedan drugi protein ima ulogu 'osjećanja' prisutnosti leucina – Sestrin2. Sestrin2 (55kDa) je monomerni globularni protein građen samo od α-zavojnica. Lokaliziran je u citosolu. N-kraj proteina Sestrin2 je neuređen, domena C-kraja proteina ima značajnu ulogu u vezanju leucina, dok se između ta dva dijela nalazi vezna regija (Slika 7.).



Slika 7. Tercijarna struktura proteina Sestrin2 s obilježenim domenom N-kraja (NTD), domenom C-kraja (CTD), veznom regijom i veznim mjestom za leucin. Vezno mjesto leucina označeno je narančastom strelicom. Uočava se da je protein građen samo od α-zavojnica (Saxton i sur., 2015).

Domena C-kraja proteina Sestrin2 lokalizira ligand u tzv. 'džepu' koji sadrži pozitivno nabijene aminokiseline Glu 451 i Arg 390 koje ionskim mostovima tvore interakcije s leucinom (Slika 8. A) i B)). Dodatne interakcije se postižu van der Waalsovima interakcijama leucinskog izopropilnog lanca i Leu 389, Trp 444 i Phe 447 (Slika 8. A)). Iako Glu 451 i Arg 390 mogu intereagirati s bilo kojom aminokiselinom koja ima

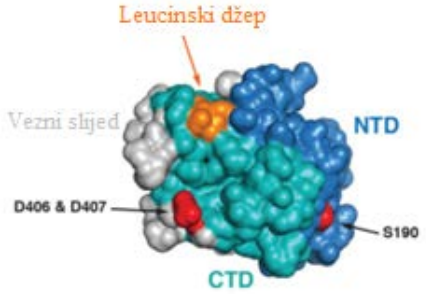
slobodnu amino i karboksilnu skupinu te tako vezati aminokiseline koji nisu leucin, hidrofobne aminokiseline džepa odbijaju sve nabijene i polarne aminokiseline. Također, Trp 444 predstavlja steričku smetnju za vezanje velikih hidofobnih aminokiselina (Phe), dok male aminokiseline (Ala, Val) ne mogu tvoriti van der Waalsove interakcije s Leu 389, Trp 444 i Phe 447 (Slika 8. A)) (Saxton i sur., 2015). Prema tome, Sestrin2 svojom primarnom i tercijarnom strukturom osigurava da jedino leucin može aktivirati metabolički put, a ne neka druga signalna molekula koja bi mogla narušiti ravnotežu pravih signalnih molekula i metaboličkog puta. U prilogu 1. je prikazano sravnjenje sljedova nukleotida gena za Sestrin2 iz različitih organizama i analiza istog u JalViewu.



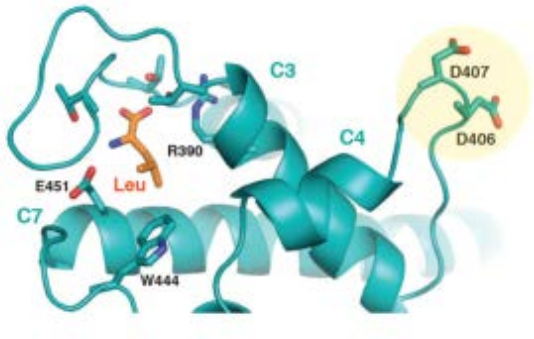
Slika 8. A) Koordiniranje liganda leucina u veznom mjestu aminokiselinama Glu 451, Thr 377, Tyr 375, Thr 374, Thr 386 i Arg 390. 'Džep' tvore Glu 451 i Arg 390. 'Poklopac' tvori interakcije s leucinom vodikovim vezama. Vodikove veze su prisutne između liganda (leucina) i Thr 377, Thr 374 i Thr 386**. B)** Prikaz lokaliziranja leucina ionskim mostovima pomoću aminokiselina Glu 451 i Arg 390 (Saxton i sur., 2015).

Omča između dviju α-zavojnica C2 i C3 N-kraja proteina tvori 'poklopac' (eng. *lid*). Aminokiseline 'poklopca' Thr 377, Thr 374 i Thr 386 tvore vodikove veze s leucinom (Slika 8 A)). Vezanjem leucina u 'džep' proteina, dolazi do konformacijske promjene 'poklopca' zbog promjene konformacije α-zavojnice C3. Na protein Sestrin2 je u uvjetima rasta u minimalnom mediju vezan protein GATOR2 (Slika 9.A) i D)). Konformacijskom promjenom zavojnice C3 dolazi do promjene položaja aminokiselina Asp 406 i Asp 407 (Slika 9.B)) koje uzrokuju disocijaciju proteina GATOR2 (Slika 9. D)). Alternativno,

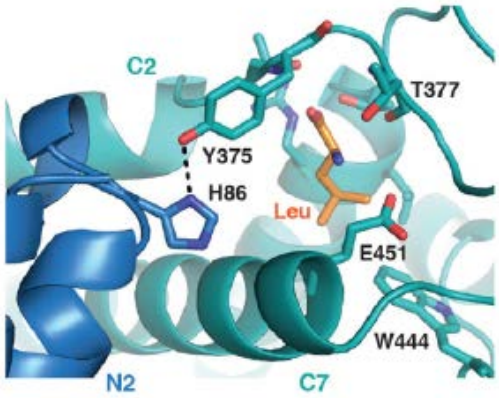
moguće je da i vezna regija proteina Sestrin2 sudjeluje u konformacijskoj promjeni i tako uzrokuje disocijaciju GATOR2. Nakon konformacijske promjene, Thr 375 tvori jake vodikove veze s His 86 (Slika 9. C)), koji s ostalim aminokiselinama tvori tzv. 'bravu' (eng. *latch)*, te je 'poklopcu' onemogućeno otvaranje zbog novoostvarenih interakcija s 'bravom'. Drugim riječima, 'poklopac' ne dopušta disocijaciju vezanog leucina iz 'džepa' zbog mehanizma 'poklopac-brava'. Znači, vezanjem leucina dolazi do konformacijske promjene Sestrin2 koja onemogućava disocijaciju leucina i omogućava prestanak interakcija s proteinom GATOR2 koji dalje prenosi signal (Slika 9.D)) (Saxton i sur., 2015).



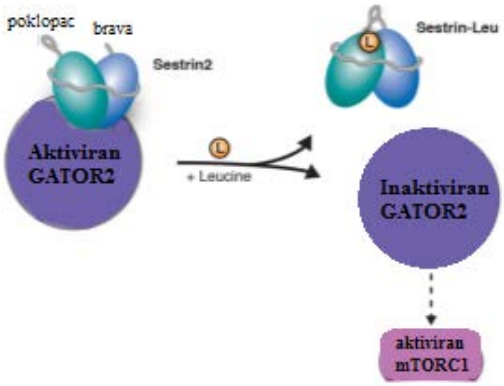
(A)



(B)



(C)



(D)

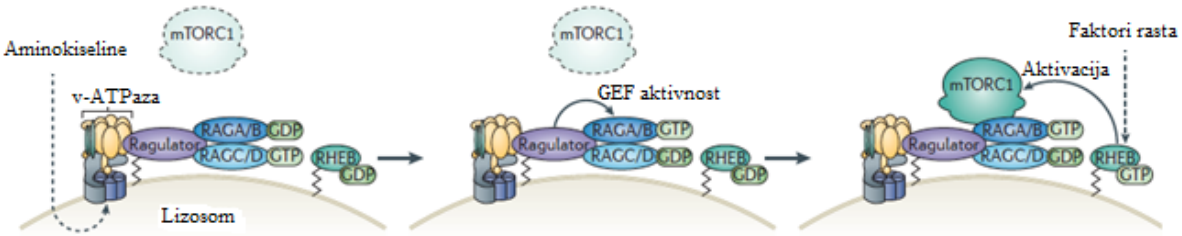
Slika 9. **A)** Prikaz proteina Sestrin2. Crveno označena su područja na koja se veže protein GATOR2, plavo je domena N-kraja proteina, zeleno domena C-kraja proteina, a narančasto leucinski džep. **B)** Položaj Asp 406 i Aspr 407 u odnosu na vezno mjesto leucina. **C)** Tzv. 'brava' koju tvore Tyr 375 i His 86. 'Brava' sprečava otvaranje 'poklopca'. **D)** Prikaz aktivacije proteina GATOR2 nakon vezanja leucina čime se aktivira mehanizam 'poklopac-brava' koji onemogućuje disocijaciju leucina. Aktivan protein GATOR2 nije vezan na protein Sestrin2. GATOR2 dalje prenosi signal preko ostalih proteinskih molekula kako aktivirao mTORC1 (Saxton i sur., 2015).

4.2. PRIJENOS SIGNALA POSREDNIČKIM PROTEINIMA

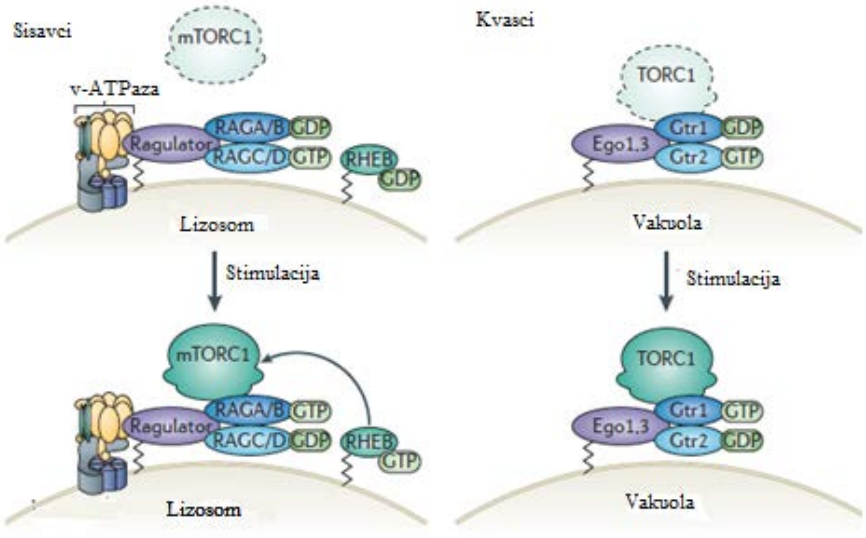
Protein Sestrin2 i konačan akceptor signala mTORC1 su lokalizirani u citosolu. Međutim, protein Sestrin2 ne aktivira mTORC1 direktno, nego nizom posredničkih proteina. Ti su posrednički proteini lokalizirani na lizosomalnoj membrani i oni aktiviraju te lokaliziraju mTORC1 na lizosomalnu membranu. Prvi protein koji je potreban za lokalizaciju mTORC1 je kompleks Rag gvanozin-trifosfataza, čije su dvije podjedinice RagA/B u GTP stanju, a RagC/D u GDP stanju (Saxton i sur., 2015).

Nakon što konformacijska promjena proteina Sestrin2 vezanjem leucina onemogući daljnju interakciju s proteinom GATOR2, aktivirani GATOR2 negativno regulira protein GATOR1. GATOR1 je enzim koji ima GAP aktivnost, odnosno on je GTP-azni aktivirajući protein koji stimulira hidrolizu GTP-a u GDP. Inaktivan GATOR1 nema GAP aktivnost, pa ne stimulira hidrolizu GTP-a proteina RagA/B. Protein Ragulator je enzim koji ima GEF aktivnost, odnosno on je gvanozin nukleotid izmjenjujući faktor koji potiče zamjenu GDP-a s GTP-om. Znači, aktiviran protein GATOR2 onemogućuje aktivnost proteina GATOR1, čime se inhibira daljnja hidroliza GTP-a proteina RagA/B te je zbog toga Ragulator u mogućnosti aktivirati i lokalizirati RagA/B (Kim i sur., 2015). Ragulator

izmjenjuje GDP s GTP-om na proteinu RagA/B te ga tako lokalizira na lizosomalnu membranu. Također je potrebna lokalizacija vakuolarne H^+-ATPaze na istoj membrani koja veže Ragulator i koja, kao takva, sudjeluje u lokalizaciji RagB GDP (Slika 12.) (Jewell i sur., 2013). Jednom kada je RagB GDP lokaliziran na lizosomalnoj membrani, može se formirati heterodimer RagA/B GTP + RagC/D GDP pomoću proteina Ragulatora. Smatra se da u formiranju dimera RagC/D GDP sudjeluje Folikulin-folikulin intereagirajući protein 2 (FLCN-FNIP2) (Wolfson i sur., 2016). Konačan kompleks potreban za aktivaciju mTORC1 sastavljen je od: heterodimera RagA/B GTP + RagC/D GDP, Ragulatora, SLC38A9, v-ATPaze, i proteina RHEB GTP koji aktivira mTORC1 kinaznu aktivnost (Laplante i Sabatini, 2012). Tek kada je postignut kompleks RagA/B GTP + RagC/D GDP - Ragulator - SLC38A9 - v-ATPaza, RHEB GTP aktivira mTORC1 (Slika 10.) (Wolfson i sur., 2016). Iako SLC38A9 nema aktivnu ulogu u aktivaciji mTORC1 leucinom (nego argininom) (Wolfson i sur., 2016), služi kao transmembranski protein za lokalizaciju Rag heterodimera i Ragulatora na lizosomalnu membranu. Paralelna usporedba mTORC1 sisavaca i TORC1 kvasaca je prikazana na Slici 11.



Slika 10. Prikaz aktivacije mTORC1-a aktivacijskim kompleksom RagA/B GTP + RagC/D GDP – Ragulator - SLC38A9 - v-ATPaza - RHEB GTP. Uočava se da su Ragulator i RHEB GTP integralni proteini usidreni masnom kiselinom u lizosomalnu membranu (Jewell i sur., 2013). Napominje se da SLC38A9 nije prikazan na slici.



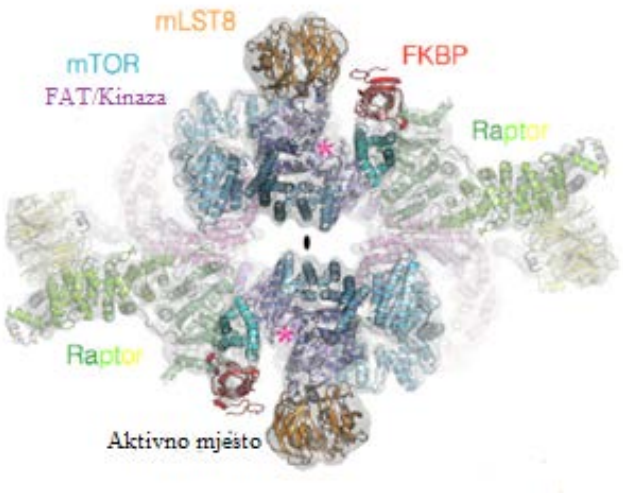
Slika 11. Paralelna usporedba aktivacije mTORC1 sisavaca i TORC1 kvasaca. Raznolikost građe aktivacijskog kompleksa mTORC1 (TORC1): aktivacijski kompleks mTORC1 je građen od RagA/B GTP + RagC/D GDP – Ragulator - SLC38A9 - v-ATPaza - RHEB GTP. mTORC1 je aktiviran od strane RHEB GTP. TORC1 je lokaliziran na vakuolarnoj membrani. TORC1 aktivacijski kompleks je građen od homologa RagA/B GTP + RagC/D GDP – heretodimera Gtr1 GTP + Gtr2 GDP i homologa Ragulatora– Ego 1,3. Zanimljivo je da tijekom rasta kvasca u minimalnom mediju TORC1 ostaje lokaliziran na vakuolarnoj membrani iako nema fizičkih interakcija aktivacijskog kompleksa i TORC1. S druge strane, mTORC1 difuzibilan u stanici tijekom rasta u minimalnom mediju (Jewell i sur., 2013).

4.3. GRAĐA mTORC1

TOR (eng. *target of rapamycin*) je jedan od najvažnijih proteina koji sudjeluje u prijenosu signala iz okoline na metaboličku razinu kako bi se stanica prilagodila uvjetima obilja nutricijenata. mTOR (eng. *mammalian TOR*) je atipična serinska/treoninska protein-kinaza koja pripada fosfoinozitid 3-kinaza (PI3K) srodnoj proteinskoj obitelji kinaza. mTOR se nalazi u kompleksu s ostalim proteinima tvoreći kompleks mTORC1 (eng. *mammalian trget of rapamycin complex 1*) (Laplante i Sabatini, 2012). mTORC1 se, uz mTOR, sastoji od sljedećih proteina: Raptor (eng. *regulatory associated protein od mTOR*) koji sudjeluje u uspostavi dimerne arhitekture i lokalizaciji mTORC1 te vezanju supstrata mTOR-a protein-kinaze, Pras 40 (eng. *proline rich AKT substrate 40kDa*) koji inhibira mTORC1, Deptor (eng. *DEP domain –containing mTOR-interacting protein*) koji inhibira mTORC1, mLST8 (eng. *mammalian lethal with SEC13 protein 8*) koji pozitivno

aktivira mTORC1 te, prema nekim autorima, heterodimera TT1/TEL2 koji regulira formiranje i stabilnost mTORC1 (Laplante i Sabatini, 2012, Jewell, 2013). Sličan kompleks mTORC2 je relativno neistražen (Laplante i Sabatini, 2012).

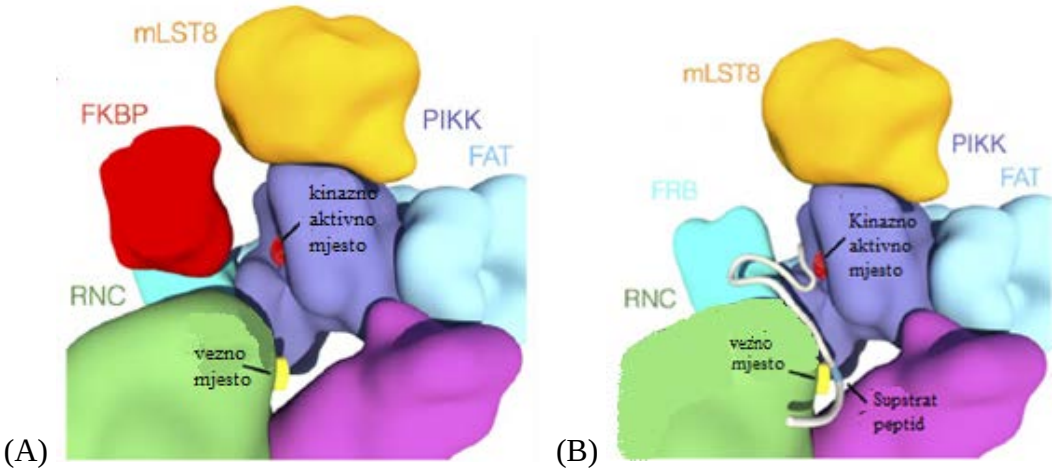
Kompleks mTORC1 tvori dimernu arhitekturu koja ima C2 simetriju i čije os simetrije prolaze kroz veliku šupljinu kompleksa. Protein-kinaza mTOR je stabilan i samostalan dimer unutar kompleksa mTORC1. N-kraj mTOR je građen od ponavljajućih HEAT sljedova koji su stabilizirani interakcijom s tzv. 'armadilo' domenama proteina Raptora. HEAT sljedovi su ponavljajući strukturni motivi superzavojnica nazvanih 'rog' (eng. *horn*) i linearnih motiva nazvanih 'most' (eng. *bridge*). HEAT sljedovi su stabilizirani proteinom Raptorom kako bi bila omogućena dimerizacija arhitekture mTORC1 čime se aktivnost cijelog kompleksa dodatno stabilizira. Također, HEAT sljedovi omogućuju dimerizaciju protein-kinaze mTOR unutar kompleksa mTORC1 (Slika 12.).



Slika 12. Struktura dimerne arhitekture mTORC1 odozgo. Raptor je obojan zeleno, HEAT sljedovi mTOR ljubičasto, kinazna domena i FAT sljedovi mTOR plavo, HEAT sljedovi mTORC1 ljubičasto, mLST8 narančasto, a mjesto vezanja proteina FKBP koji veže antibiotik rapamicin crveno. Katalitički centri (označeni ružičastom zvjezdicom) se nalaze u središtu dimerne arhitekture te su okrenuti jedan prema drugom ne tvoreći interakcije. Raptor i mLST8 se nalaze na perifernoj strani dimerne arhitekture (Aylett, 2015).

Mehanizam konformacijske promjene prilikom vezanja supstrata koji će biti fosforilirani nije do kraja poznat, ali se smatra da protein FKBP fizički ometa ulazak supstrata (Slika

13.A)). Tek kada protein FKBP disocira omogućuje se pozicioniranje supstrata u aktivno mjesto dimera mTOR čime se omogućava fosforilacija proteina (Slika 13.B)) (Aylett i sur., 2015).



Slika 13. A) Steričko ometanje ulaska supstrata u vezno mjesto mTOR-a proteinom FKBP Raptora. **B)** Domena RNC proteina Raptora veže proteinske supstrate i tako ih na taj način pozicionira i navodi u katalitičko (kinazno) mjesto mTOR-a (označeno crveno) (Aylett i sur., 2015).

4.4. AKTIVACIJA STANIČNOG METABOLIZMA

Aktivacijom mTOR protein-kinaze, leucin indirektno regulira stanični metabolizam na više mjesta. Najvažniji stanični putevi koji su regulirani egzogenim leucinom su procesi sinteze proteina, sinteze lipida, metabolizma koji služi za pretvorbu energije te autofagije. Leucin može djelovati pozitivno ili negativo na stanične puteve. Pozitivna regulacija znači da mTORC1-ovisna fosforilacija (potaknuta leucinom) potiče aktivnost ciljanih proteina, dok negativna regulacija (potaknuta leucinom) znači da se fosforilacijom aktivnost ciljanih proteina inhibira. Pozitivno su regulirani sinteza proteina, sinteza lipida i metabolizam koji služi za pretvorbu energije, dok je autofagija negativno regulirana.

Sinteza proteina je najistraženiji proces kontroliran mTORC1-om zbog toga što mTOR izravno fosforilira eukariotski protein koji veže translacijski faktor eIF4E (4E-BPI) i S6 kinazu 1 (S6K1). Foforilacija 4E-BPI sprečava vezanje 4E-BPI na protein eIF4E (veže se na 5' kapu mRNA), čime se omogućava formiranje kompleksa eIF4E koji je potreban za translaciju ovisnu o kapi mRNA. Fosforilacija S6K1 potiče aktivaciju proteina TIF-1A

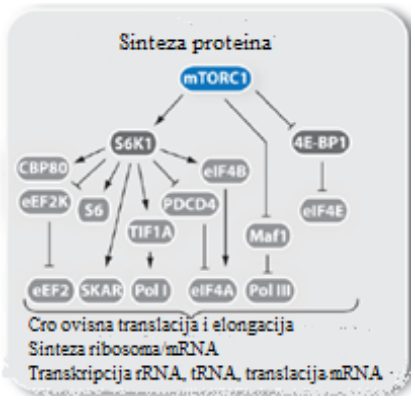
koji potiče ekspresiju gena rRNA interakcijom s RNA-polimerazom I. Također, fosforiliran S6K1 omogućuje aktivaciju eIF4B koji aktivira eIF4A, incijacijski faktor nužan za vezanje mRNA na malu podjedinicu ribosoma. Time se postiže povećana sinteza mRNA, odnosno staničnih proteina, ribosoma, rRNA i tRNA (Slika 14.A)).

Ovaj kompleks sudjeluje u sintezi lipida preko transkripcijskog faktora SREBP1/2. mTORC1 cijepa transkripcijskog faktora SREBP1/2 te ga na taj način aktivira. SREBP1/2 sudjeluje u kontroli sinteze masnih kiselina i kolesterola. mTORC također sudjeluje i u aktivaciji peroksisom proliferirajućeg-aktivacijskog receptora γ (PPAR- γ) koji je glavni regulator adipogeneze (Slika 14.B)).

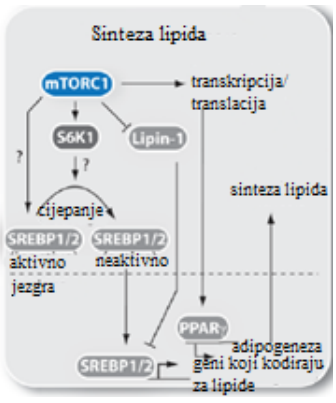
mTORC1 aktivira transkripciju i translaciju HIF1α, pozitivnog regulatora glikolitičkih gena, te PGC1 i YY1, regulaota koji pozitivno reguliraju biogenezu mitohondrija i oksidativne procese (Slika 14.C)).

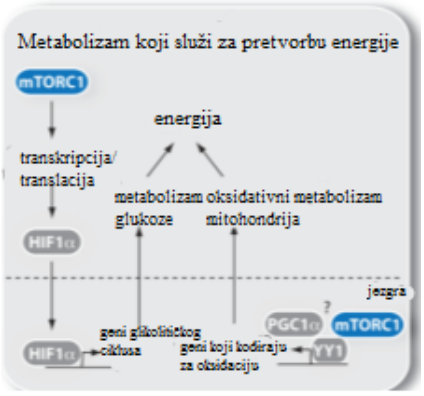
Kompleks mTORC1 negativno djeluje na autofagiju direktno fosforilirajući i tako inhibirajući kinaznu aktivnost ULK1 i Atg13. Proteini ULK1 i Atg13 formiraju inicijacijski kompleks autofagije zajedno s proteinom FIP200. Također, mTORC1 inhibira aktivnost proteina DAP1 koji suprimira autofagiju (Slika 14.D)) (Laplante i Sabatini, 2012) čime se omogućava aktivacija procesa autofagije.

(A)

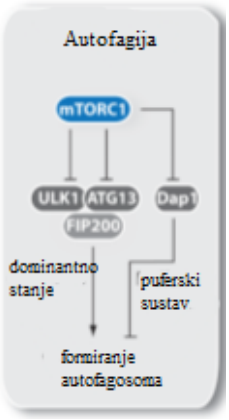


(B)





(C)



(D)

Slika 14. A) Putevi sinteze proteina na koje mTORC1 pozitivno djeluje. **B)** Putevi sinteze lipida na koje mTORC1 pozitivno djeluje. **C)** Putevi metabolizma koji služi za pretvorbu energije na koje mTORC1 pozitivno djeluje. **D)** Putevi autofagije na koje mTORC1 negativno djeluje (Laplante i Sabatini, 2012).

Činjenica je da tijekom godina života ljudskog organizma i neprestanog aktiviranja/inaktiviranja puta mTORC1 dolazi do sve veće deregulacije ovog metaboličkog puta. Također, vanjski uvjeti poput staničnog stresa uvjetuju slabije osjećanje hranjivih tvari, smanjenu sintezu staničnih proteina i aktivnost mitohondrija čime se efikasnost kompleksa mTORC1 dodatno smanjuje. Sve navedeno može uzrokovati razne metaboličke bolesti (Laplante i Sabatini, 2012).

5. ZAKLJUČAK

Biosignalizacija je procesi koji se temelji na pretvorbi primljenog izvanstaničnog signala u unutarstanični signal koji potiče ili utišava ciljane stanične procese. Prijenos signala uključuje proces umnažanja signala i prevođenja jedne vrste signala u drugi signal koji omogućuje komunikaciju stanice s okolišem, tj. tkivom kod višestaničnih organizama. L-leucin je aminokiselina koja transporterom LAT1 ulazi u stanicu gdje služi kao građevni element za stanične potrebe, ali i kao signalna molekula. Leucin je signal stanici koji označava uvjete okoliša bogatih nutricijentima. Proteini Lrp i Sestrin2 su unutarstanični senzori leucina koji su potaknuti na konformacijsku promjenu vezanjem leucina. Lrp, protein lokaliziran u jezgri bakterije *E. coli*, je transkripcijski regulator koji uslijed interakcije s leucinom modificira svoju ulogu represora ili aktivatora ekspresije ciljanih gena. Nadalje, Lrp ima i drugu ulogu u bakteriji *E. coli*. - kondenzacija nukleoida.

Protein Sestrin2 je citosolni protein u sisavaca i ima jedinu ulogu da prenosi signal preko posredničkih proteina do krajnjeg akceptora signala - proteinskog kompleksa mTORC1. mTORC1 je kompleks koji sadrži mTOR protein-kinazu koja fosfoliranjem daljnjih enzima potiče ili smanjuje njihovu aktivnost. Na taj način leucin djeluje na metaboličke puteve sinteze proteina, lipida, metabolizma koji služi za pretvorbu energije te autofagiju stanice. Važno je uočiti da se ova dva puta biosignalizacije razlikuju po tome što je senzor leucina Lrp prisutan bakteriji *E. coli*, dok se protein Sestrin2 nalazi u citosolu eukariotskih (ljudskih) stanica. Nadalje, jedna od najuočljivijih razlika je i način prijenosa unutarstaničnog signala leucina različitim citosolnim proteinima. Na kraju, ova dva različita regulatorna puta ovisna o leucinu razlikuje i krajnji akceptori primitka signala – u bakteriji *E. coli* molekula DNA je konačan akceptor koji prima informaciju prenesenu leucinom, dok je akcpetor u stanicama sisavaca kompleks mTORC1, odnosno mTOR protein-kinaza.

6. LITERATURA

Aylett CHS, Sauer E, Imseng S, Boegringer D, Hall MN, Ban N, Maier T, Architecture of human mTOR complex 1, Science, 2015, 315(6268): 48-52

Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM, Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood–brain barrier, PNAS, 1999, 96(21): 12079–12084

Calvo JM, Matthews RG, The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*, Microbiological Reviews, 1994, 58(3):466-90

Jewell JL, Russell RC, Guan KL, Amino acid signalling upstream of mTOR, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013, 14(3):133-139

Kim JS, Ro SH, Kim M, Park Hw, Semple IA, Park H, Cho US, Wang W, Guan KL, Karin M, Lee JH, Corrigendum: Sestrin2 inhibits mTORC1 through modulation of GATOR complexes, Science Report, 2015, 5: 14029

Laplante M, Sabatini DM, mTOR signaling in grownth control and disease, Cell, 2012, 149(2): 274-293

Lehninger AL, Nelson D, Cox MM, Lehninger: Principles of biochemistry, peto izdanje, W.H. Freeman and Company, New York, 2008

Nagamori S, Wiriyasermkul P, Okuda S, kojima N, Hari Y, Kiyonaka S, Mori Y, tominaga H, Ohfaki R, Kanai Y, Structure–activity relations of leucine derivatives reveal critical moieties for cellular uptake and activation of mTORC1-mediated signaling, Amino Acids, 2016, 48(4): 1045-1058

Newman EB, Lin R, Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli,* Annual Review in Microbiology, 1995, 49:747-75

Pedroso JAB, Zampieri TT, Donato J, Reviewing the Effects of l-Leucine Supplementation in the Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Glucose Homeostasis, Nutrients, 2015, 7(5): 3914–3937

Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Indiveri C, Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health, Frontiers in chemistry, 2004, 2:61

Pul U, Wurm R, Lux B, Meltzer M, Menzel A, Wagner R, RP and H-NS--cooperative partners for transcription regulation at *Escherichia coli* rRNA promoters, Molecular Microbiology, 2005, 58(3):864-76.1

des los Rios S, Perona JJ, Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly, Journal of Molecular Biology, 2007, 366(5):1589-1602

Saxton RA, Knockenhauer KE, Wolfson RL, Chantranupong L, Pacold ME, Wang T, Schwartz TU, Sabatini DM, Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway, Science, 2016, 351(6268):53-58

Shimada T, Saito N, Maeda M, Tanaka K, Ishihama A, Expanded roles of leucine-responsive regulatory protein in transcription regulation of the Escherichia coli genome:

Genomic SELEX screening of the regulation targets, Microbial Genomics, 2015, internetsko izdanje

Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, Shen K, Scaria SM, Cantor JR, Sabatini DM, Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway, Science, 2016, 351(6268): 43-48

7. SAŽETAK

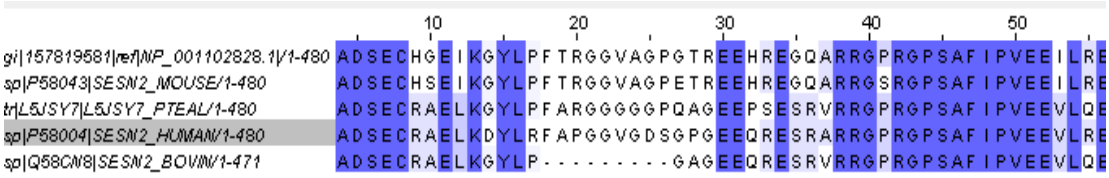
Biosignalizacijom se stanice (tkiva kod višestaničnih organizama) prilagođavaju izvanstaničnim uvjetima (staničnom okruženju) i na posredan način komuniciraju s okolinom tako da aktiviraju ili utišaju ekspresiju ciljanih gena, a time i metaboličke puteve. Signalizacija se temelji na pretvorbi primljenog izvanstaničnog signala u unutarstanični signal koji potiče ili utišava ciljane stanične procese. Prijenos signala uključuje proces umnažanja signala i prevođenja jedne vrste signala u drugi signal koja stanici predstavlja određenu informaciju. Jedna od signalnih molekula je i aminokiselina L-leucin. Molekula L-leucina je signal koji označava uvjete energetskog obilja okoline,a prenosi se u stanicu transporterom LAT1. Cilj ovog rada bio je opisati L-leucin kao signalnu molekulu koja djeluje na transkripciju gena te metabolizam. Regulatorni protein ovisan o leucinu, Lrp, i protein Sestrin2 su unutarstanični senzori leucina, a vezanjem leucina su potaknuti na konformacijsku promjenu. Lrp, protein iz bakterije *Escherichia coli*, je transkripcijski regulator koji prenosi infomaciju leucina na molekulu DNA čime se aktivira/utiša transkripcija gena. Na ovaj način L-leucin djeluje na transkripciju gena tRNA, rRNA, katabolizma aminokiselina, fimbrija i transkripcijskih faktora. Sestrin2 je citosolni protein sisavaca koji prenosi singal L-leucina preko posredničkih proteina do krajnjeg akceptora signala - proteinskog kompleksa mTORC1. mTORC1 je arhitektura koji sadrži protein-kinazu mTOR koja fosforilacijom ciljanih proteina potiče ili inhibira njihovu aktivnost. Fosforilirani proteini sudjeluju u sintetskim reakcijama proteina i lipida, metabolizmu koji sudjeluje u pretvorbi energije i autofagiji. Na taj način L-leucin djeluje na metaboličke puteve stanice.

8. SUMMARY

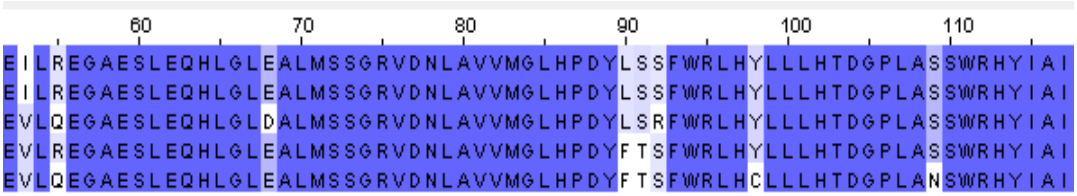
Biosignalization helps cells to adapt to the extracellular conditions (environment) and indirectly communicate with environment by activating/silencing expression of target genes and metabolism, respectively. Signalization is based on conversion of extracellular signal to the intracellular signal which activates or inhibits many cellular processes. Transduction of the signal includes the process of signal amplification and signal translation from one type to another. After the signal has been interpreted, it provides a cell a specific information. One of the signal molecules is an amino acid L-leucine. The aim od this report was to present L-leucine as a signal molecule for gene transcription and metabolism. L-leucine is an signal that indicates nutrient-rich conditions and is transported into the cell by LAT1 transporter. Leucine-responsive regulatory protein, Lrp, and protein Sestrin2 are intracellular L-leucine sensors that are induced to conformational change by binding of leucine. Lrp, a *Escherichia coli* protein, is a transcriptional regulator which transduces L-leucine information to the DNA and therefore activates/represses transcription of target genes. In this way, L-leucine effects transcription of tRNA, rRNA, amino acid catabolism genes, fimbria and transcription factors genes. Sestrin2 is a mammalian cytosolic protein that transfers L-leucine signal through mediator proteins to the terminal signal acceptor – protein complex mTORC1. mTORC1 is an architecture that includes mTOR protein kinase. Once mTOR has phosphorilated protein, actvity of a protein is activated or repressed. Phosphorilated proteins take part in lipid and protein biosynthesis reactions, energy metabolism and autophagy. In this way, L-leucine acts on the metabolic pathways of the cell.

PRILOZI

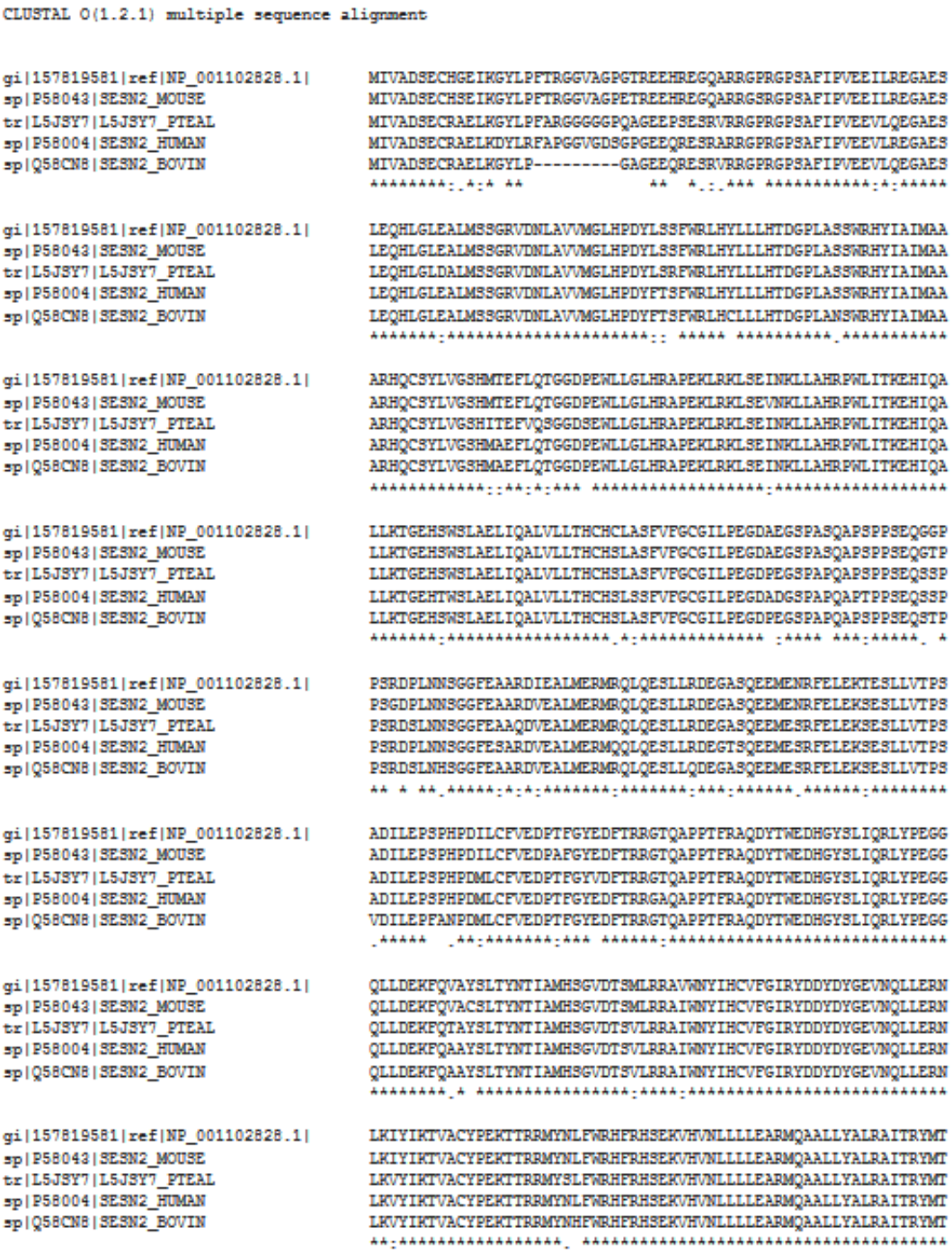
Prilog 1. A) i **B)** Analizom u Jalviewu najveća raznolikost sljedova proteina Sestrin2 je na N-kraju (na višestrukom sravnjenju tamnoplavo pobojano su identične aminokiseline, svijetlo plavo slične aminokiseline). Prema znanstvenom članku autora Saxton, 2015. aminokiseline koje vežu leucin su Glu 451 i Arg 390, aminokiseline koje stvaraju interakcije s izopropilnim lancem leucina su Leu 389, Trp 444 i Phe 447, aminokiseline koje tvore tzv. 'poklopac' su Thr 347, Thr 377 i Thr 386, dok su aminokiseline značajne za vezanje proteina GATOR2 Asp 406 i Asp 407. Analizom u Jalviewu sve sljedovi proteina Sestrin2 imaju, bez iznimki, gore navedene aminokiseline, što znači da se sljedovi razlikuju u aminokiselinama koje nisu presudne za ulogu kao senzora leucina. **C)** višestruko sravnjenje aminokiselinskih sljedova proteina Sestrin2 iz organizama *Rattus norvegicus, Mus musculus, Homo sapiens, Bos taurus* i *Pteropus alecto* algoritmom EMBOSS Clustal Omega.



(A)



(B)



(C)

Legenda: ***** (zvjezdica) označava poziciju u kojoj je potpuno očuvana ista aminokiselina, **:** (dvotočka) označava poziciju u kojoj su aminokiseline vrlo sličnih svojstava, **.** (točka) označava poziciju u kojoj su aminokiseline slabih očuvanih svojstava.