Utjecaj N-kraja na stabilnost proteina

Palfi, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:243874

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Maja Palfi

Utjecaj *N*-kraja na stabilnost proteina

N-end rule in protein stability

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, 2018.

Sažetak

Proteini su osnovna građevna jedinica koja se gradi povezivanjem 20 različitih aminokiselina u polipeptidne lance. Svaka od 20 aminokiselina razlikuje se po svojstvima zbog svoje strukture odnosno zbog različitih bočnih ogranaka. Aminokiseline se povezuju peptidnom vezom i tvore četiri razine struktura proteina: primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu. Svojstva proteina, pa i sama njihova stabilnost, ovisna su o redoslijedu njihovih aminokiselinskih ostataka. Od 1986. godine, kada je pravilo N-kraja postavljeno, provode se istraživanja kod eukariota i prokariota i dobivaju detaljniji podaci o samoj stabilnosti proteina. N-pravilo ukazuje kakva je stabilnost određenog proteina te koliko mu je vrijeme poluživota. Dvije grane N-pravila kod eukariota su pravilo Arg/N i pravilo Ac/N. Svaka grana ima svoj način prepoznavanja proteina za ubikvitinaciju. Pravilom N-kraja utvrđene su funkcije mnogih proteina i enzima te same koristi od N-kraj puta. Ubikvitinirani proteini se u proteosomu proteolitički razgrađuju. Prokariotske stanice imaju sličan način prepoznavanja proteina, ali drugačiji način obilježavanja bez ubikvitina te kompleks proteolitičkih proteina razgrađuje drugačijim mehanizmom.

U ovome će se radu kratko objasniti osnove o proteinima, njihova stabilnost ovisna o bočnim ograncima, pravilo N-kraja, njegove grane, funkcije i sam mehanizam razgradnje proteina kod eukariota i prokariota.

Ključne riječi: proteini, proteoliza, pravilo N-kraja, ubikvitin, Arg/N pravilo, Ac/N pravilo

Abstract

Proteins are a basic building block built by connecting 20 different amino acids in the polypeptide chain. Each of the 20 amino acids differs in properties due to their structure or due to different amino acid residue. Amino acids are linked together with peptide bonds and form four levels in protein structure: primary, secondary, tertiary and quaternary. Protein properties and the protein stability itself depends on sequence of the amino acids residues that make up a particular protein. Since 1986, when the N-rule rule has been set up, studies into eukaryotes and prokaryotes are conducted to get more detailed data on protein stability. The N-rule indicates the stability of a given protein and how long its half-life is. The two branches of the N-rules in the eukaryotes are the Arg/N rule and the Ac/N rule. Each branch has its own way of recognizing proteins for ubiquitination. The N-end rule has determined the functions of many proteins and enzymes. Ubiquitinated proteins are degraded proteolytically in the proteosome. Prokaryotic cells have a similar way of recognizing proteins, but a different way of marking without ubiquitin and the proteolytic protein complex is working by a different mechanism. This paper will briefly explain the basics of proteins, their stability dependent on aminoacid residues, the N-line rule, its branch, function, and the mechanism of degradation of proteins in eukaryotes and prokaryotes.

Key words: proteins, proteolysis, N-terminus, ubiquitin, Arg/N rule, Ac/N rule

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 3
2.1. Proteini 3
2.2. Razine u strukturi proteina 4
2.3. Pravilo N-kraja 9
2.3.1. Otkriće pravila N-kraja 9
2.3.2. Ubikvitin 10
2.3.3. Proteasom 11
2.3.4. Označavanje proteina za proteolizu 12
2.4. Grane puta N-kraja 13
2.4.1. Ac/N pravilo 13
2.4.2. Arg/N pravilo 14
2.5. Mehanizam razgradnje proteina kod eukariota 16
2.6. Mehanizam razgradnje proteina kod prokariota 18
2.7. Funkcije puta pravila N-kraja 19
2.7.1. Selektivnost podjedinice puta Arg/N pravila 19
2.7.2. Regulacija bakterijske zaraze Arg/N pravilom 19
2.7.3. Regulacija transporta peptida Arg/N pravilom 20
2.7.4. Pravilo N-kraja i degradacija pogrešno smotanih proteina 20
3. ZAKLJUČAK 21
4. LITERATURA 23

1. UVOD

Osnovni građevni elementi u eukariotskim i prokariotskim organizma su proteini. Ljudski je organizam građen od eukariotskih stanica u kojima su osnovne građevne jedinice proteini. Enzimi i neki hormoni su također građeni od proteina. U organizmu proteini nastaju povezivanjem aminokiselina peptidnom vezom. Oni čine preko 20% mase čovjeka, s tim da u strukturi mišića, unutrašnjih organa, kože, kose, noktiju predstavljaju primarnu komponentu.[1] Elementarni sastav proteina opisan je preko masenih udjela prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Elementarni sastav proteina iskazan u masenim udjelima[1]

Element	Maseni udio (%)
Ugljik	50-55
Vodik	6,5-7,3
Kisik	19-24
Dušik	15-18
Sumpor	0-2,4

Kod svakog proteina redoslijed aminokiselina je jedinstven; određen je redoslijedom nukleotida u genima, tj. informacija u DNA određuje strukturu proteina, preko redoslijeda baza. Tri uzastopne baze u DNA, nazvane kodon, određuju jednu aminokiselinu. Proteini su građeni od 20 različitih aminokiselina zbog čijih bočnih ogranaka imaju drugačija svojstva. Dogovorno je postavljeno pravilo da redoslijed aminokiselina u proteinu počinje s N-terminalnim (amino) krajem, a završavaju s C-terminalnim (karboksilnim) krajem. Istraživanjem metabolizma proteina, odnosno njihove razgradnje postavljeno je pravilo N-kraja. Ovo pravilo govori o vremenu poluživota proteina. Različiti proteini razlikuju se u stabilnosti pa prema tome imaju drugačiji vijek života u organizmu i vrijeme ulaska u ciklus razgradnje proteina. Istraživanjima je određeno vrijeme poluživota za aminokiseline koje ih svrstava na stabilizirajuće ili destabilizirajuće. Bitne sastavnice metabolizma proteina su ubikvitin i proteasom zbog svoje strukture i načina djelovanja.[2]

Životni vijek molekula proteina u stanicama u rasponu je od manje od jedne minute do mnogo dana. Među funkcijama unutarstanične proteolize su eliminacija krivih ili na neki drugi način abnormalnih proteina, održavanje zaliha aminokiselina uslijed primjerice gladovanje i generacija proteinskih fragmenata koji djeluju kao hormoni ili antigeni. Jedna od glavnih uloga proteolitičkih puteva je selektivno uništenje regulatornih proteina čije koncentracije variraju s vremenom i promjenama u stanici. Proteoliza također može poslužiti za aktiviranje molekula proteina, uklanjanje autoinhibitorne domene proteina ili selektivno uništavanje inhibitorne podjedinicu proteinskog kompleksa. Regulirana degradacija unutarstaničnih proteina se provodi u velikoj mjeri putem sustava ubikvitin proteasoma zajedno sa šaperonima, autofagima i lizosomskom proteolizom. Šaperoni posreduju sklapanje proteina in vivo te sastavljanje i rastavljanje kompleksa proteina. Sustav koji uključuje ubikvitin i šaperone određuje vjerojatnost ovisnu o vremenu za svaki protein neovisno je li funkcionalan, ciljan za degradaciju ili uznemiren na način (uključujući agregaciju) koja može ili ne mora dovesti do degradacije. N-kraj pravilo se odnosi na regulaciju vremena poluživota proteina *in vivo* u odnosu na N-terminalni ostatak.[3]

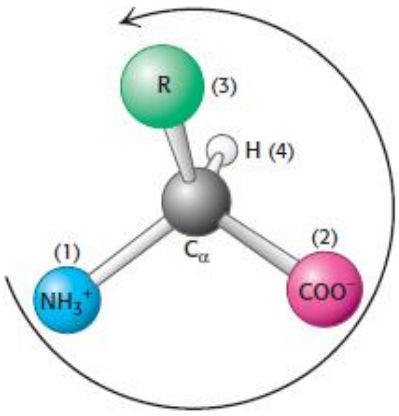
Pravilo N-kraja razgradnje proteina evoluiralo je tako da iskoristi strukturalnu jedinstvenost N-terminal aminokiseline, kao što je α-amino grupa i N-terminal bočni lanac. Selektivna proteoliza regulatornih proteina koji nose N-degrone, kontroliraju razne aspekte bioloških procesa u kvascu, sisavcima, biljkama i bakterijama. Ova zadaća uglavnom zahtjeva više proteina uključenih u N-terminal modifikacije i endoproteolitička cijepanja te pravovremena stvaranja i aktiviranja određenih degrona.[4]

2. LITERATURNI PREGLED

Proteini su linearni polimeri aminokiselina koji u živom svijetu imaju bitnu i raznoliku ulogu. Aminokiseline u proteinima povezane su peptidnom vezom između amino i karboksi skupina. Svaka od 20 različitih aminokiselina koja izgrađuje proteine ima svoj karakterističan bočni ogranak. Većina proteina sadržava između 50 i 2000 aminokiselina, a peptidi koji su građeni od manjeg broja aminokiselina se nazivaju oligopeptidi. Proteini imaju primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu strukturu. O vrsti strukture ovise i njihova različite karakteristike.[2]

2.1. Proteini

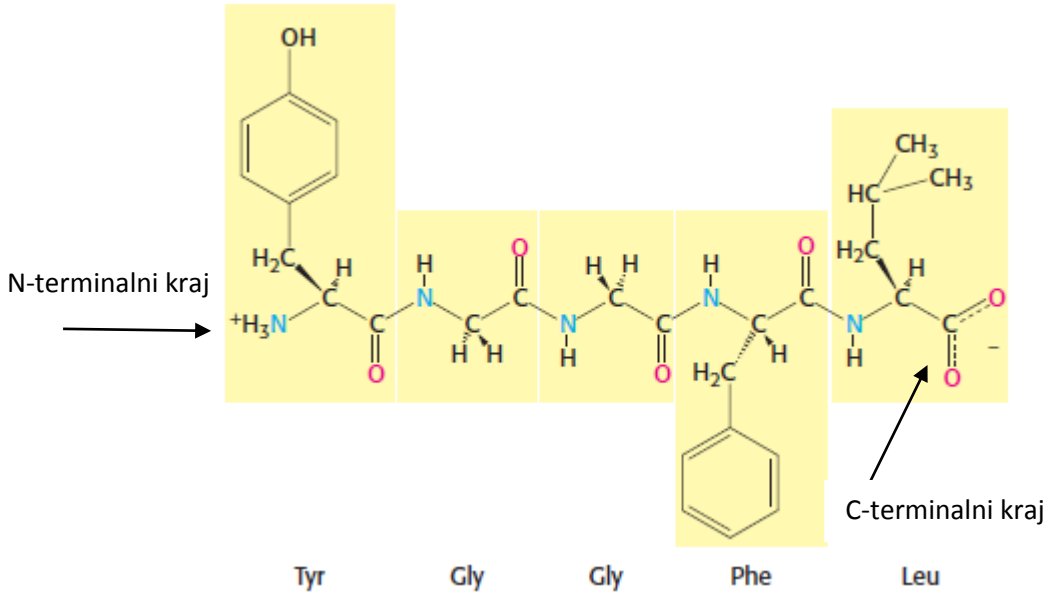
Proteini su građeni od linearnog slijeda 20 različitih aminokiselina. Aminokiseline postoje u L i D apsolutnoj konfiguraciji. Aminokiseline koje izgrađuju ljudski organizam pronađene su samo u L apsolutnoj konfiguraciji. α-amino kiselina građena je od α ugljikovog atoma na koji su vezani vodik, bočni ogranak, amino i karboksilna skupina. L apsolutna konfiguracija prikazana je na slici 1.[3]



Slika 1. L apsolutna konfiguracija α-amino kiselina[3]

Aminokiseline su povezane vezom koja se naziva peptidna veza (amidna veza). Kod peptidne veze dolazi do vezanja α-amino skupine jedne aminokiseline i α-karboksilne skupine druge aminokiseline. Niz aminokiselina povezanih peptidnim vezama čine polipeptidni lanac. Peptidna veza je planarna zbog prirode veze unutar peptida, ima karakter

dvostruke veze što sprječava rotaciju i ograničava konformaciju okosnice. Prema dogovoru svakom peptidu određuje se takozvani početak i kraj. Početak je N-kraj (amino skupina), a kraj C-kraj (karboksilna skupina). Polipeptid građen od 5 aminokiselina s naznačenim krajevima i peptidnom vezom, prikazan je na slici 2.[2]



Slika 2. Polipeptid građen od 5 aminokiselina[3]

2.2. Razine u strukturi proteina

Aminokiseline se razlikuju svojom konformacijom, nabojem bočnog ogranka, sposobnošću za stvaranje vodikovih veza, hidrofobnošću i kemijskom reaktivnošću. Konformacija proteina je prostorni raspored atoma u proteinu. Najčešće su konformacije koje zauzima protein i termodinamički najstabilnije što znači da je Gibbsova slobodna energija (G)[a] najmanja.[5] Stabilnost proteina definira se tendencijom proteina da zadrže svoju funkcionalnu konformaciju. Razlike proteina vidljive su u hidrofobnim interakcijama, one najviše pridonose stabilnosti konformacije proteina u vodenim otopinama. Proteini u svojoj

[a] Gibbsova slobodna energija (G) - energija oslobođena ili apsorbirana u reverzibilnom procesu pri konstantnoj temperaturi i tlaku.[4]

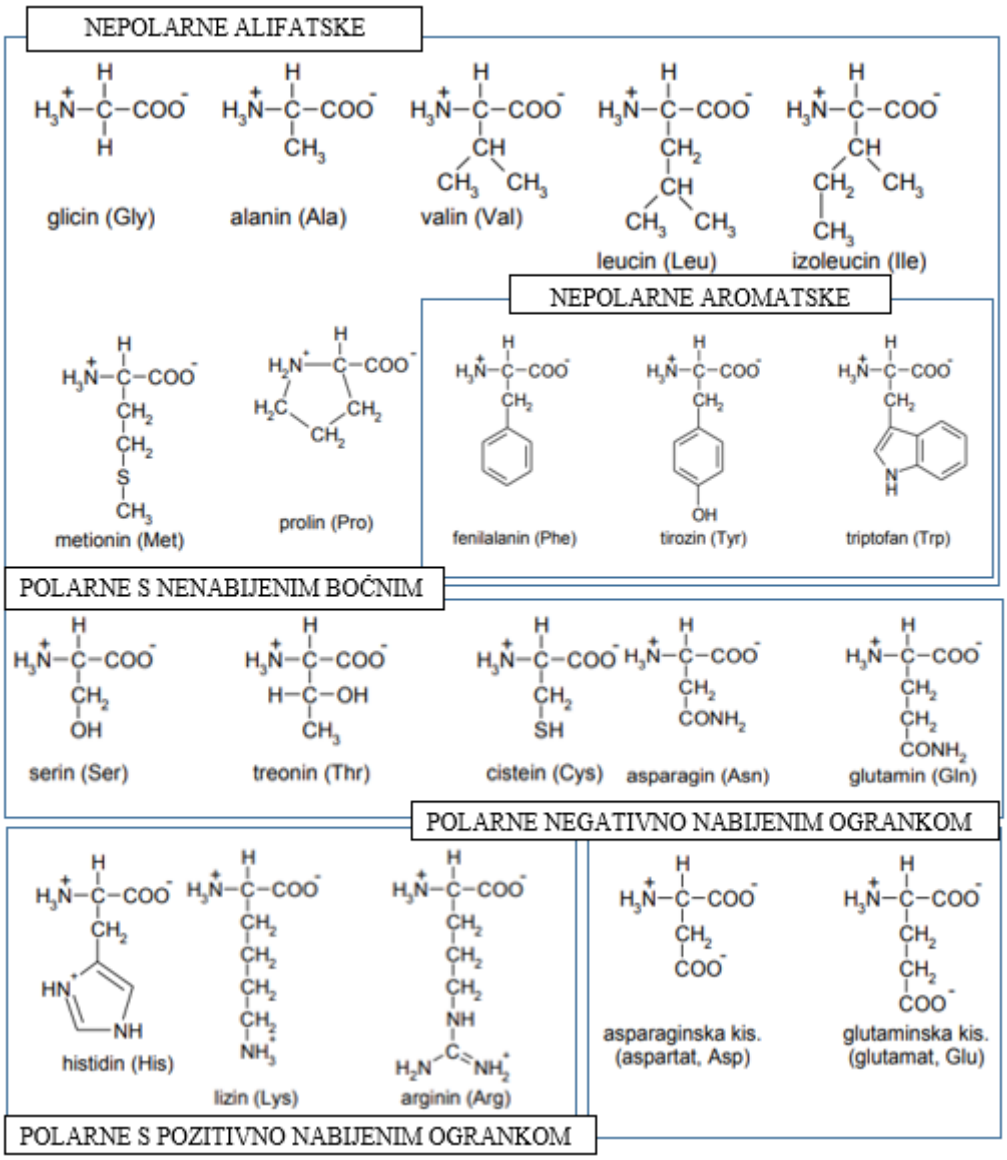
unutrašnjosti sadrže guste nakupine hidrofobnih bočnih ostataka i ove skupine ne dolaze u kontakt s vodom. Na strukturu također utječu i vodikove veze i elektrostatske interakcije. [3]

Budući da aminokiseline imaju drugačije ogranke, dijelimo ih u više različitih skupina. Podjela aminokiselina s obzirom na polarnost bočnog ogranka (R):

- Nepolarne alifatske
- Nepolarne aromatske
- Polarne s nenabijenim bočnim ogrankom
- Polarne s pozitivno nabijenim bočnim ogrankom
- Polarne s negativno nabijenim bočnim ogrankom

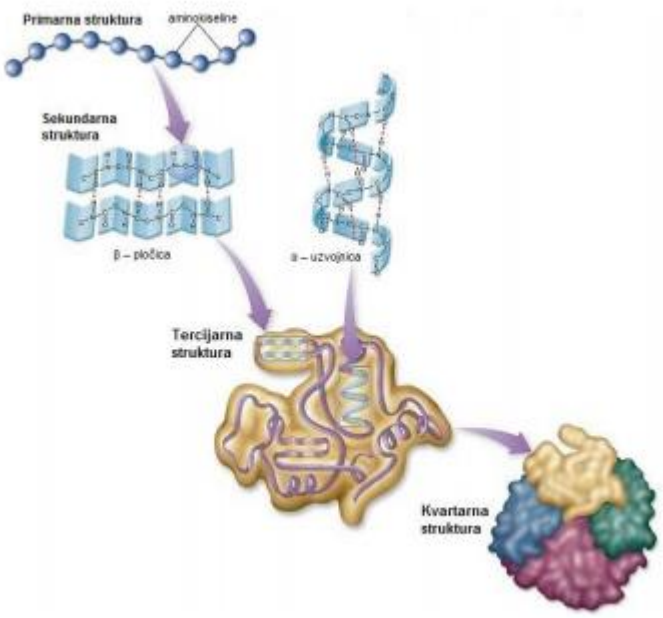
Nepolarne alifatske su: glicin, alanin, prolin, valin, leucin, izoleucin i metionin. Nepolarne aromatske su fenilalanin, tirozin i triptofan. Polarne s nenabijenim bočnim ogrankom su serin, treonin, cistein, asparagin i glutamin. Polarne s pozitivno nabijenim bočnim ogrankom su lizin, histidin i arginin, a polarne s negativno nabijenim bočnim ogrankom su aspartat i glutamat. Na slici 1 strukturno je prikazana grupacija 20 aminokiselina s obzirom na bočni ogranak. Neproteinogene aminokiseline su aminokiseline koje se pojavljuju u organizmima tijekom različitih biokemijskih reakcija, ali ne izgrađuju proteine.[3]

Aminokiseline dijelimo na esencijalne i neesencijalne. Esencijalne aminokiseline organizam ne može sintetizirati sam *de novo* nego se potreba za esencijalnim aminokiselinama namiruje unosom hrane ili razgradnjom staničnih proteina. Esencijalne kiseline su: histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan i valin.



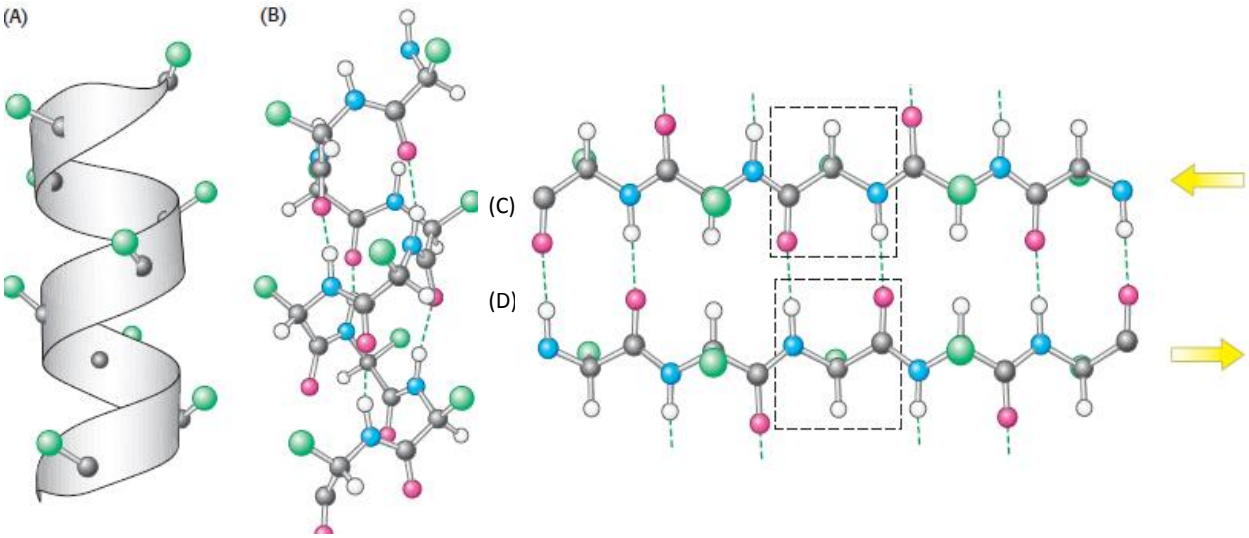
Slika 3. Podjela aminokiselina s obzirom na polarnost aminokiselina

Proteini mogu sadržavati četiri razine u strukturi, a to su: primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna (Slika 4.). Primarnu strukturu čini slijed aminokiselina vezanih peptidnom vezom u polipeptidne lance. Taj slijed ujedno određuje sekundarne i tercijarne strukture proteina, tj. njihovu prostornu strukturu. Tercijarnu strukturu proteina tako uvjetuje primarna što uvjetuje funkciju proteina iz čega se može zaključiti da je kovalentan slijed aminokiselina veoma bitan za razumijevanje funkcije proteina.[2]



Slika 4. Četiri načina organizacije proteina[6]

Strukture unutar kojih se veći dio aminokiselina pravilno slaže i smata pravilno se zovu sekundarne strukture proteina, a najučestalije su α-zavojnice i β-ploče. Kod α-zavojnice ima mnogo faktora koji uzrokuju njezinu stabilnost: kovalentne veze, elektrostatske interakcije, hidrofobne interakcije i vodikove veze. Svaki zavoj u α-zavojnici tvori vodikovu vezu između svake četvrte susjedne aminokiseline, povezuju se vodikovi atomi amino skupine i kisika karboksilne skupine n+4 aminokiseline. Ta zavojnica je efektivno dipol, zbog načina razmještaja aminokiselina, tj. blizu karboksilnog kraja nalaze se aminokiseline s pozitivnim nabojem, a blizu amino kraja nalaze se aminokiseline s negativnim nabojem. Beta ploče su sekundarne strukture proteina u kojima se beta lanci povezuju vodikovim vezama između kisika na karboksilnom C-atomu i vodika vezanog na dušik koji sudjeluje u stvaranju peptidne veze. Postoje paralelne i antiparalelne beta ploče od kojih su antiparalelne stabilnije zbog toga što se donor i akceptor vodika nalaze u istoj ravnini. Strukture α-zavojnice i β-ploče prikazana je na slici 5.[3]



Slika 5. Sekundarna strukture proteina: (A) prikaz α-zavojnice s bočnim ograncima i zavojem; (B) prikaz α-zavojnice modelom štapića i kuglica; (C)anti paralelna beta ploča [3]

Tercijarna struktura govori o međusobnom odnosu svih atoma u prostornim okvirima proteina, tj. međuodnos između elemenata sekundarne strukture unutar proteina. Polipeptidni lanac se nabire u funkcionalni protein tako da su hidrofobne aminokiseline u njegovoj unutrašnjosti, a hidrofilne aminokiseline na njegovoj površini što omogućuje amfipatičnost α-uzvojnica i β-nabranih ploča. Sekundarne strukture imaju s jedne strane hidrofobne, a s druge strane hidrofilne aminokiselinske ostatke, a dijelovi koji nisu u sekundarnoj strukturi su izloženi vodi.

Kvaterna struktura postoji samo kod proteina koji imaju više različitih podjedinica, a ona je prostorni raspored svih podjedinica jednog proteina. Podjedinice mogu biti povezane kovalentnim i nekovalentnim vezama. Kvaterne strukture mogu biti jednostavne gdje su dvije podjedinice jednake ili kompliciranije gdje ima više različitih podjedinica.[2]

2.3. Pravilo N-kraja

Pravilo N-kraja proteina odnosi se na regulaciju vremena poluživota proteina *in vivo* ovisno o N-terminalnom ostatku. Put pravila N-kraja je proteolitički put čiji fiziološki ciljevi uključuju proteine s destabilizacijskim N-terminalnim ostacima.

2.3.1. Otkriće pravila N-kraja

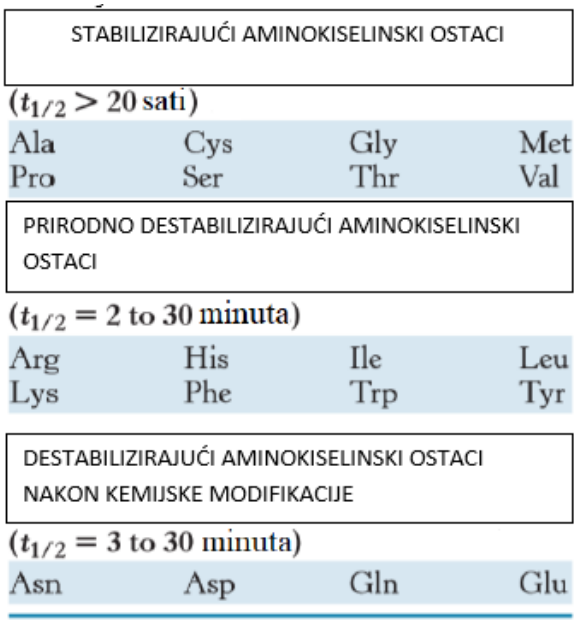
Otkrili su ga Alexander Varshavsky i suradnici 1986. Istraživanje su provodili na kvascima dodavanjem kodirajućeg gena za ubikvitin-β-galaktozidazu. Time je dobivena deubikvitinirana β-galaktozidaza čime je omogućeno daljnje istraživanje izlaganjem različitih amino terminalnih ostataka na β-galakto proteinima. Promjenom amino terminalnih ostataka promijenila su se vremena poluživota na proučavanim proteinima. Raspon vremena poluživota β-galaktoproteina bio je u rasponu od 20 sati pa sve do manje od 3 minute. Detaljan pregled vremena poluživota određenih aminokiselinskih ostataka bit će prikazan u narednom poglavlju.[7]

Istraživanjem različitih aminokiselinskih ostataka detaljnije je klasificiran redoslijed stabilizirajućih i destabilizirajućih aminokiselina. Određeno je:

- osam stabilizirajućih aminokiselinskih ostataka koji ima vrijeme poluživota veće od 20 sati (alanin, cistein, glicin, metionin, prolin, serin, treonin i valin)
- osam prirodno destabilizirajućih aminokiselinskih ostataka s vremenom poluživota od 2 do 30 minuta (arginin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, fenilalanin, triptofan i tirozin)
- četiri kemijski dobivena destabilizirajuća aminokiselinska ostatka s vremenom poluživota od 3 do 30 minuta (asparagin, glutamin, glutamat i aspartat)[8]

Također, utvrđeno je da osim samog N-kraja utjecaj na stabilnost ima i sljedeći po redu aminokiselinski ostatak u polipeptidnom lancu proteina. Pa tako najveći utjecaj kod idućeg ostatka imaju glutamat i aspartat koji su polarne aminokiseline s negativno nabijenim bočnim ogrankom. takav utjecaj je vidljiv u slučaju vezanja glutamata i aspartata na

destabilizirajući aminokiselinski ostatak kao na primjer arginin. Na slici 6 prikazana je podjela stabilizirajućih i destabilizirajućih aminokiselinskih ostataka.

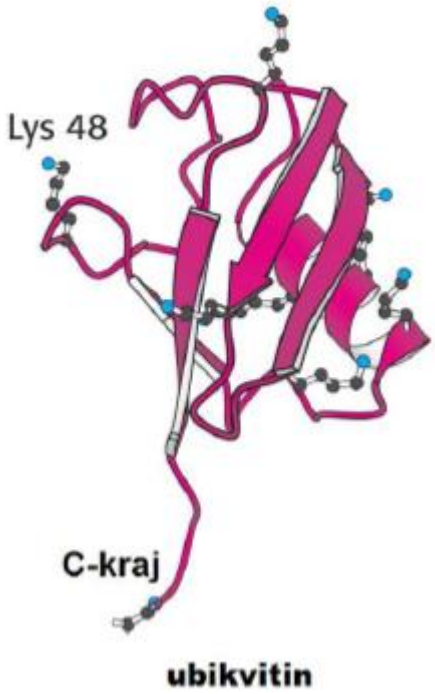


Slika 6. Klasifikacija aminokiselinskih ostataka po vremenu poluživota[8]

2.3.2. Ubikvitin

Ubikvitin je regulacijski protein prisutan kod svih eukariota koji služi kao biljeg proteina koji će se razgraditi. Ubikvitinacijom, proces povezivanja proteina kovalentnom vezom koji se treba razgraditi s jednim ili više ubikvitina, se regulira i kontrolira stanična stabilnost velikog broja proteina. Prisutan je u svim eukariotskim stanicama i obavlja mnoštvo uloga vezujući se na brojne ciljane proteine.[9]

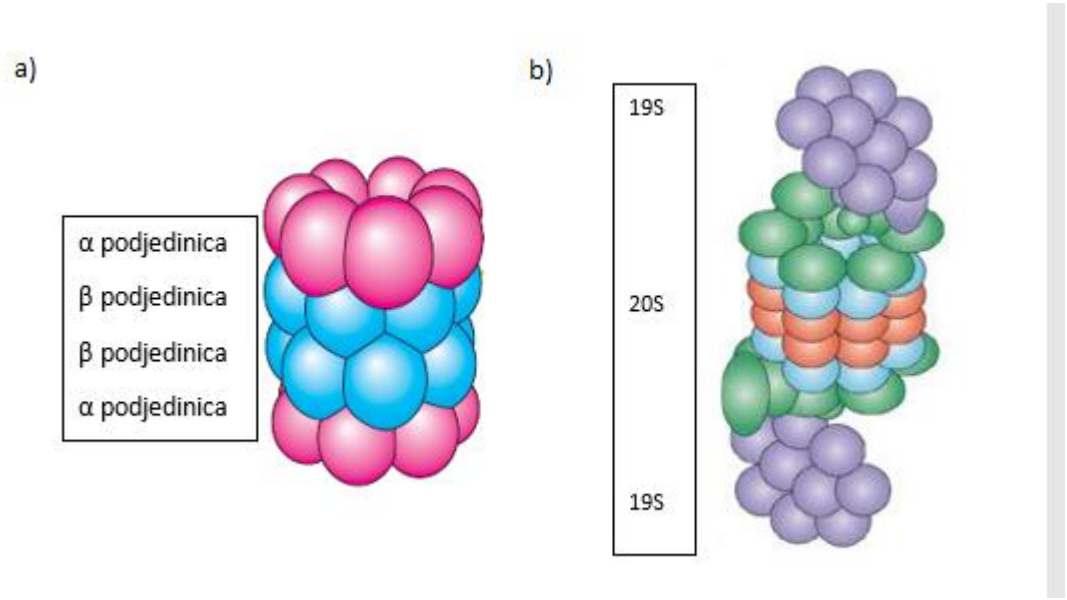
Otkrili su ga Avram Hershko i suradnici 1978. godine za što su 2004. godine dobili Nobelovu nagradu za kemiju. Prvi su ga put identificirali 1975. godine kao sveprisutni protein mase 8.5kDa.[10] Sastoji se od 76 aminokiselina te ima karakterističan C-terminalni kraj. Na slici 7 je prikazana struktura ubikvitina.



Slika 7. Struktura ubikvitina[3]

2.3.3. Proteasom

Proteini se razgrađuju u proteasomima. U eukariotskim stanicama, degradaciji citosolnih i nuklearnih proteina uglavnom posreduju 26S proteasom, veliki proteinski kompleks sastavljen od dvije različite komponente. 20S kompleks tvori šuplji cilindar koji je izgrađen je od 28 homolognih jedinica koje su poredane u 4 prstena od kojih svaki ima po 7 podjedinica. Ovaj kompleks čini proteolitički aktivnu komponentu proteasoma. Njegova aktivna mjesta nalaze se u šupljini cilindra te su dostupna samo uz uske pore na krajevima. Time je osigurana visoka koncentracija aktivnih mjesta za hidrolizu na kratkih oligopeptida, a sprječena je neregulirana degradacija proteina.[11]Prije razgradnje u proteosomima, označeni proteini za proteolizu moraju se denaturirati uz utrošak energije. 19S kompleksi nalaze se na oba kraja proteolitičkog 20S kompleksa koji sadrže šest ATPaza AAA vrste (engl. *ATPase associated with various cellular activities*). 19S kompleks uz pomoć hidrolize ATP-a razmotava supstrat kako bi mogao ući u 20S kompleks. Još jedna uloga 19S kompleksa je da specifično veže poliubikvitinirane lance i time osigurava razgradnju samo označenih. Struktura 20S kompleksa kao i cjelovitog proteosoma, prikazana je na slici 8.[12]



Slika 8. a) Struktura 20S kompleksa proteasoma; b) Struktura proteasoma[3]

2.3.4. Označavanje proteina za proteolizu

N-terminalni ostaci koji sadrže degradacijske signale za put pravila N-kraja se nazivaju N-degroni. Glavna karakteristika N-degrona je destabilizirajući N-terminalni ostatak proteina. Pravilo se primjenjuje na eukariote i prokariote, ali s različitim pravilima i ishodima.

U eukariotskim stanicama za pravilo N-kraja je bitan protein ubikvitin koji se selektivno veže za proteine preko degradacijskih signala čime ih označava za razgradnju djelovanjem o ATP-u ovisne proteaze u 26S proteasomima. Prokariotski proteolitički put ne sadrži protein ubikvitin nego su odgovorni drugi specifični proteini.

Komponente prepoznavanja putanja pravila N-kraja nazivaju se N-prepoznavatelji (engl. *N-recognins*). U bakterijama N-prepoznavatelji su ClpS proteini koji se vežu na N-degrone supstrata N-kraja i tako ih prenose na ATP-ovisnu ClpAP proteazu. U eukariotskim stanicama N-prepoznavatelji su E3 protein ligaze koje se vežu na odgovarajuće N-degrone. Kompleks E3 N-prepoznavatelj i njegov srodan E2-ubikvitin par preko puta pravila N-kraja se veže za protein i tako označen usmjerava u proteosom na razgradnju.[13]

2.4. Grane puta N-kraja

U eukariotskim stanicama postoje dva puta N-kraja, a to su: Arg/N pravilo i Ac/N pravilo. Pravilo Ac/N kraja obuhvaća proteine čiji su N-terminalni krajevi acetilirani. Arg/N pravilo prepoznaje neacetilirane N-terminalne ostatke i uključuje njihovu arginilaciju. Zajedno te dvije grane označuju za degradaciju većinu staničnih proteina. Više od 80% ljudskih bjelančevina su N- terminalno acetilirani što znači da većina proteina imaju određeni signal degradacije nazvan AcN-degron od trenutka sinteze.[12]

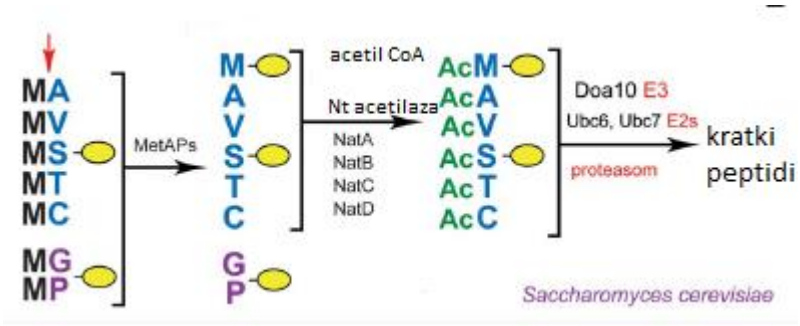
2.4.1. Ac/N pravilo

Ac/N pravilo uključuje acetilaciju N-terminalnog kraja koja se događa u isto vrijeme kad i translacija novonastalih proteina čiji N-terminalni kraj sadrži metionin ili male nenabijene aminokiselinske ostatke: alanin, valin, serin, tirozin ili cistein. Nabrojeni aminokiselinski ostaci postanu N-terminalni kada se nakon translacije uz metionin aminopeptidazu ukloni N-terminalni metionin što je prikazano na slici 10. N-terminalno acetilirani proteini tada su regulirani sa Ac/N pravilom za razgradnju. N-acetilirani metionin, alanin, valin, serin, tirozin i citozin aminokiselinski ostatak novoformiranih proteina sadrže specifičnost N-degrona, AcN-degrona.

Kotranslacijska acetilacija početnih proteina je oboje enzimatski i funkcionalno drugačija od posttranslacijskih acetilacija unutarnjih ostataka u mnogim proteinima. N-terminalna kotranslacijska acetilacija ima drugačiji set specifičnih acetilaza od posttranslacijske acetilacije te je ireverzibilna. Nijednoj N-terminalnoj kotranslacijskoj acetilazi nije identificiran enzim koji bi vršio deacetilaciju. Proteolitička funkcija N-kotranslacijske acetilacije je bitna za više od 80% ukupnog proteosoma što znači za tisuće acetiliranih proteina. Nasuprot tome identificirano je samo oko 10 N-terminalno acetiliranih proteina čija uloga nije proteolitička.

Osim novih saznanja o N-pravilu i njegovih funkcijama, otkriće Ac/N pravila 2010. godine, otkrilo je i druge glavne fiziološke uloge dviju klasa enzima: Nt-acetilaze i Met-aminopeptidaze. Nt-acetilaze proizvode AcN-degrone, a Met-aminopeptidaze cijepanjem N-terminalnog metioninskog ostatka čine ove signale degradacije moguće za sve AcN-degrone

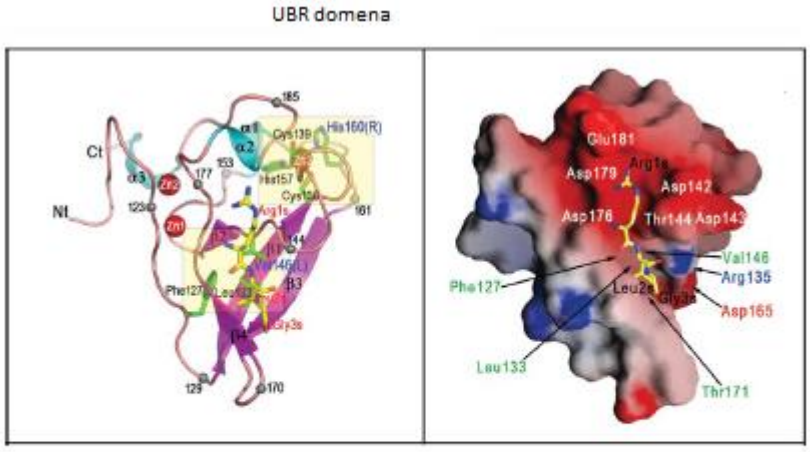
koji sadrže Nt-acetilirani N-terminalni metionin. Nt acetilaze i Met-aminopeptidaze su bitni enzimi čija je fiziološka funkcija prije proučavanja pravila N-kraja bila nepoznata. Ovi enzimi su sada specifični za Ac/N put N-kraj pravila.[12]



Slika 9. Shematski prikaz Ac/N pravila[12]

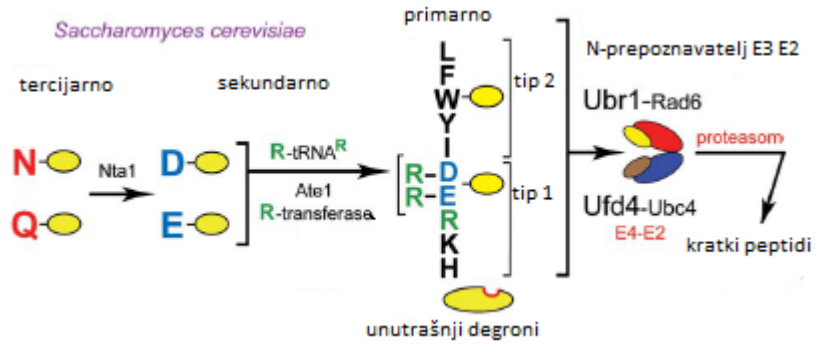
2.4.2. Arg/N pravilo

Arg/N pravilo nalazimo kod eukariota koji uključuje arginilaciju proteinskih supstrata i djeluje na nemodificirane velike hidrofobne i bazične N-terminalne ostatke pomoću E3 ubikvitin ligaze. Arg/N pravilo je N-kraja kod eukariota koji uključuje arginilaciju proteinskih supstrata i djeluje na nemodificirane velike hidrofobne i bazične N-terminalne ostatke pomoću E3 ubikvitin ligaze. N-terminalni arginin, lizin, histidin, leucin, fenilalanin, tirozin, triptofan, izoleucin, aspartat, glutamat, asparagin, glutamin i cistein čine glavnu skupinu N-degrona u Arg/N pravilu puta. Među tim N-degronima bazični (Arg, Lys, His) i veliki hidrofobni (Leu, Phe, Tyr, Trp, Ile) N-terminalni aminokiselinski ostaci se prepoznaju direktno od srodnika E3 N-prepoznavatelja. E3 enzimi sadrže prostorno velike regije (80%) koje se zovu UBR domene ili vezno mjesto tipa 1 što je prikazano na slici 10.[12]



Slika 10. UBR domene N-prepoznavatelja u Arg/n putu[12]

Preklapanjem oko tri cinkova iona, UBR domena se veže na N-terminalni arginin, lizin ili histidin što su primarni destabilizirajući ostaci supstrata tipa 1 N-pravila. Susjedna regija UBR-a N-prepoznavatelja se zove vezujuće mjesto tipa 2 i prepoznaje N-terminalni leucin, fenilalanin, tirozin, triptofan i izoleucin, koji se nazivaju tip 2 primarni destabilizirajući ostaci. Zajedno se tip 1 i tip 2 primarni destabilizirajući N-terminalni ostaci označuju kao Ndp ostaci. Za razliku od ovih ostataka, N-terminalni aspartat, glutamat, asparagin, glutamin i cistein djeluju kao destabilizirajući ostaci nakon što prođu preinake. Jedna od tih izmjena je Nt-arginilacija, tj. N-terminalni arginin je Ndp ostatak što znači da ga može prepoznati E3 N-prepoznavatelji u Arg/n pravilu. Arg-tRNA- protein transferaza prenosi arginin na N-terminalni Asp, Glu ili oksidirani cistein proteina ili kratkih peptida. R-transferaze nalazimo u organizmima od kvasca do sisavaca, ali su odsutni u prokariotima. N-terminalni asparagin i glutamin ostaci se ne mogu arginirati R-transferazom, ali zato put pravila Arg/N sadrži specifične N-terminalne amidaze koje pretvaraju N-terminalni asparagin i glutamin u aspartat i glutamat nakon čega slijedi njihova Nt-arginilacija. (Slika 13).[12]



Slika 9. Shematski prikaz Arg/N pravila[12]

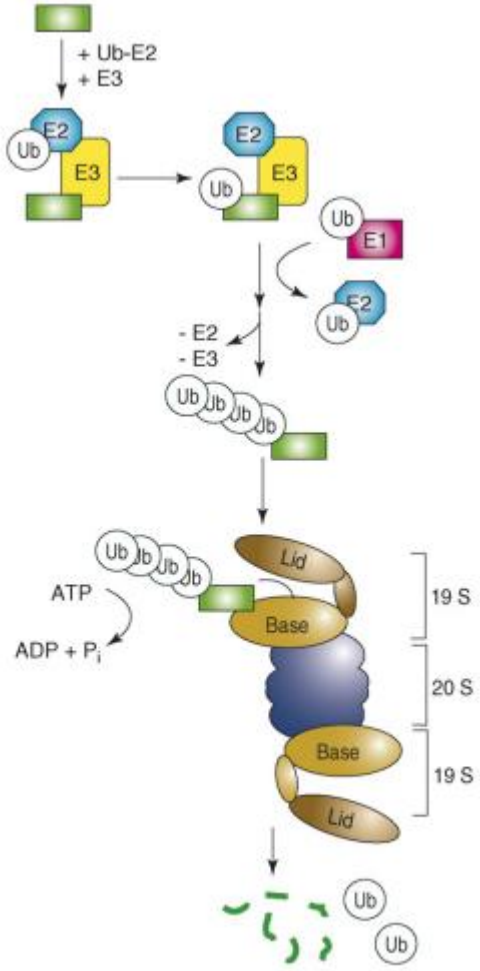
2.5. Mehanizam razgradnje proteina kod eukariota

Proteoliza je razlaganje proteina na manje peptide ili aminokiseline. Nekatalizirane proteolize se hidroliziraju vrlo sporo pa su katalizirane enzimima proteazama.

Za mehanizam razgradnje proteina kod eukariota ubikvitin ima važnu ulogu označavanja proteina na uništenje. Proteini s kratkim vremenom poluživota se kovalentno vežu na ubikvitin uz pomoć 3 enzima: E1 (ubikvitin aktivirajući enzim), E2 (ubikvitin konjugirajući enzim) i E3 (ubikvitin-protein ligaza). Ubikvitirani supstrat je kovalentno vezan na karboksilni ostatak ubikvitina (Gly) preko unutrašnjeg lizinskog ostatka. Selektivnost ubikvitina predstavlja presudan korak u odabiru supstrata. Taj korak je određen pomoću E3 enzima koji povezuje ubikvitin s lizinskim ostatkom proteina koji se treba razgraditi. Svaki E3 enzim prepoznaje ograničen broj supstrata pa tako postoji preko 500 različitih ubikvitin-protein ligaza.[13]

Ubikvitinacija se događa u tri koraka. Aktivacija ubikvitina je prvi korak ubikvitinacije gdje ubikvitin aktivira E1 ubikvitin-aktivirajući enzim u procesu koji troši ATP kao izvor energije i nastaje ubikvitin-adenilat. Drugi korak je prijenos ubikvitina do aktivnog mjesta na E1 enzimu, točnije na sulfihidrilne skupine cisteina, te se otpušta AMP-a. Ovim korakom nastaje tioesterska veza između C-terminalne karboksilne grupe ubikvitina i sulfihidrilnom grupom cisteina na enzimu E1. Zatim dolazi do prijenosa ubikvitina s E1 do cisteinskog ostatka u aktivnom mjestu ubikvitin-konjugirajućeg enzima E2. U posljednjem koraku reakcije ubikvitinacije stvara se izopeptidna veza između lizina ciljanog proteina koji se

treba razgraditi i C-terminalnog glicina ubikvitina. Ovaj korak u reakciji zahtijeva aktiviranje jednog od stotina E3 ubikvitin-protein ligaza. Lizini ubikvitina nastavljaju kovalentno vezanje novih ubikvitina i nastaje ubikvitirani biljeg koji prepoznaje kompleks 19S proteasoma. AAA vrste proteina kompleksa 19S uz ATP odmotavaju i premještaju vezani supstrat u proteolitički 20S kompleks. Ubikvitin se oslobađa od supstrata i pošteđen je degradacije.[14]

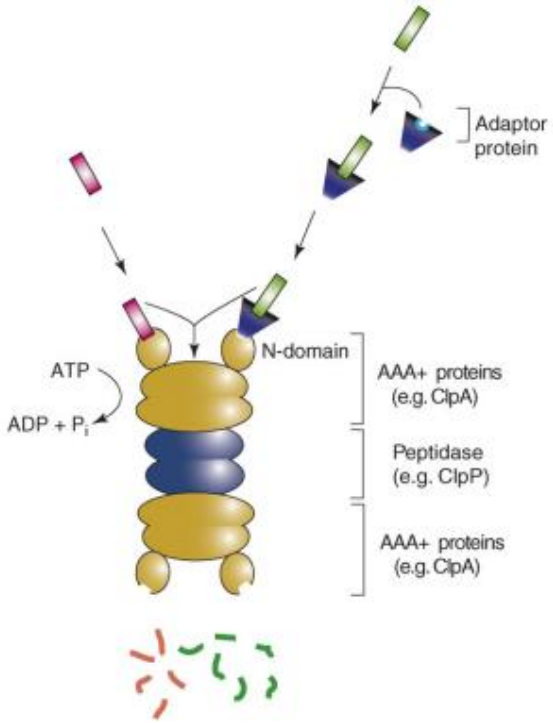


Slika 14. Shema proteolize u eukariotskim stanicama[14]

2.6. Mehanizam razgradnje proteina kod prokariota

Proteolizi bilo pogrešno povezanih ili posebno označenih proteina u citosolu prokariota posreduje proteinski kompleks ClpA ili ClpX, sličan proteasomu eukariota koji također troši ATP za razgradnju proteina. Na te proteinske komplekse vezana je proteolitička komponenta (Lon) ili peptidaza (ClpP). Peptidaza ClpP iz bakterije Echerichia coli nije homologna sa eukariotskim kompleksom 20S. Peptidaza se sastoji od dva heptamerna prstena koji tvore proteolitičku jezgru cilindričnog oblika s aktivnim mjestom u unutrašnjoj šupljini. Pristup aktivacijskom mjestu kontroliraju uske pore koje ne dopuštaju prolaz nerazmotanih polipeptida tako da se ATP troši kao i kod eukariota na razmatanje i premještanje.[11] Proteini koji razmataju supstrat su razni Hsp100 proteini (ClpA) koji su povezani s bilo kojim krajem ClpP jezgre. Rade istu ulogu kao 19S proteini u eukariotskim sustavima. [14]

Regulacija proteolize u prokariota je u potpunosti neovisna o ubikvitinu koji se ne može naći u stanicama bakterija. Za regulaciju su odgovorni specifični proteini Hsp100 koji su dio proteolitičkog proteinskog kompleksa. Hsp100 proteini dobivaju funkcionalnu raznolikost uz prisutnost drugih proteina koji stupaju u interakciju s proteinima Hsp100. Shematski prikaz proteolize u prokariotskim stanicama prikazan je na slici 10.



Slika 15. Shematski prikaz proteolize u prokariotskim stanicama[14]

2.7. Funkcije puta pravila N-kraja

Otkrićem pravila N-kraja omogućena su mnoga istraživanja kontrole i selekcije određenih proteina koji se razgrađuju. U ovom poglavlju su opisane neke od funkcija živih organizama koje su regulirane pravilom N-kraja.

2.7.1. Selektivnost podjedinice puta Arg/N pravila

Podjedinična selektivnost proteolize je prvo otkrivena u kontekstu Arg-N pravila, a temelj je većine funkcija sustava s ubikvitinom jer omogućuje preoblikovanje proteinskog kompleksa kroz podjediničnu proteinsku degradaciju. Tako bi, na primjer, razdvojena podjedinica nekog proteina čiji C-terminalni kraj nosi destabilizirajući N-terminalni ostatakbila potencijalni supstrat za degradaciju što je posredovano uklanjanjem ove podjedinice iz kompleksa proteina. Budući da Arg/N pravilo može ciljati i N-degrone i specifične interne degrone, remodeliranje proteina ne uključuje samo cijepanu podjedinicu koja sadrži N-degron nego i cjelovitu podjedinicu proteinskog kompleksa. Arg/N pravilo se u takvim slučajevima može koristiti za proteolizu specifičnih podjedinica bez da se uništava cijeli oligomerni kompleks.[12]

2.7.2. Regulacija bakterijske zaraze Arg/N pravilom

Listeria monocytogenes je Gram-pozitivna patogena bakterija.. Nakon ulaska u stanice sisavaca, bakterije su zadržane u vakuoli stanice domaćina, no vrlo brzo uspjevaju ući u citosol gdje rastu i dijele se. Prolazak ovih bakterija kroz membranu omugućen je djelovanjem proteinalisteriolizina (LLO) koji djeluje kao toksin i stvarajući pore. LOO, koji se iz bakterijskih stanica izlučuje u citosol stanica sisavaca. nosi N-terminalni lizin, tzv. Ndp ostatak. LLO je kratkoživući supstrat N-kraja u stanicama sisavaca. Štoviše, zamjena N-terminalnog lizina LOO-a s valinom ne samo da smanjuje vrijeme poluživota i*n vivo* nego i smanjuje zarazu *L. monocytogenes* bakterije. Dakle, prisutnost jako destabilizirajućih ostataka na N-kraju LLO toksina iz L. monocytogenes i srodnih bakterija vjerojatno je evolucijski izabrano da bi se smanjile razine izlučenog LLO toksina u citosol stanica domaćina.[12]

2.7.3. Regulacija transporta peptida Arg/N pravilom

Peptidi mogu poslužiti kao izvor aminokiselina i dušika u svim organizmima. Uvoz dipeptida i tripeptida u *Saccharomyces cerevisiae* kontrolira Arg/N pravilo kroz specifičan dizajn enzima Ubr1 E3 ubikvitin ligaze. Područja za vezanja supstarata tipa 1 i 2 ne Ubr1 vežu se na destabilizacijske terminalne Ndp ostatke tipa 1 i 2 proteina ili kratkih peptida, dok treće vezno mjesno Ubr1 prepoznaje unutarnji degron Cup9, regulator transkripcije koji je uglavnom represor kod više od 30 gena. Regulacija Cup9 uključuje i *PTR2* gen koji kodira glavne uvoznike dipeptida/tripeptida. Vezanjeuvezenih di/tripeptida, koji nose destabilizirajući N-terminalni ostatak, na mjesta tipa 1 i 2 Ubr1 alosterički aktivira inače autoinhibirano Cup9 vezujuće mjesto Ubr1. Rezultat je povećanje Ubr1 molekula koje mogu ciljati Cup9 za poliubikvitinaciju što pak dovodi do brže degradacije Cup9 (t1/2 <2 min) a samaim time i uklanjanje represije *PTR2* gena. Ovaj krug pozitivne povratne sprege omogućuje *S. cerevisiae* da otkrije prisutnost ekstracelularnog peptida i da reagira na povećanje brzina njihovih unosa.[12]

2.7.4. Pravilo N-kraja i degradacija pogrešno smotanih proteina

Pogreške u određenim koracima sinteze proteina se događaju u 5-20% slučajeva. Prerani prestanak translacije i točkaste mutacije su dodatni izvor neispravnih polipeptida. Pogrešno oblikovanje i agregacija pogrešno prevedenih proteina rezultira u značajnoj toksičnosti. Istraživanja su pokazala da Ubr1, E3 N-prepoznavatelj S. *cerevisae* preko pravila Arg/N vrši dio kontrole kvalitete koja funkcionira tako da selektivno uklanja pogrešne proteine u jezgri i citosolu.[12]

3. ZAKLJUČAK

Proteini su građeni od aminokiselina i definira ih primarna struktura proteina, tj. poredak aminokiselina povezanih peptidnom vezom u polipeptidnom lancu. Aminokiseline su građene od α-C atoma na koji je vezan vodik, bočni ogranak, amino i karboksilna skupina. Slijed aminokiselina je određen slijedom nukleotida u genima koji se uz tri koraka (replikacija, transkripcija, translacija) očitava. U živim organizmima postoji 20 aminokiselina koje se razlikuju po svom bočnom ogranku i istraživanjima je utvrđeno da različitom kombinacijom aminokiselina se određuje struktura pa prema tome i funkcija proteina.

1986. istraživanjem na kvascima Alexandera Varshavskog i suradnika mijenjanjem aminokiseline na N-kraju proteina dobili su proteine koji su imali raspon vremena poluživota od 20 sati do manje od 3 minute. Tim istraživanjem su zaključili da N terminalni kraj utječe na stabilnost proteina i prema tome napravili pregled koje aminokiseline na N kraju su destabilizirajuće, a koje stabilizirajuće.

Tim su otkrićem potaknuta daljnja istraživanja koja su objasnila mehanizam proteolize u eukariotima i prokariotima. 2004. godine Avram Hershko i suradnici su dobili Nobelovu nagradu za otkriće ubikvitina, proteina koji je odgovoran za označavanje proteina kod eukariota za proteolizu. Mehanizam proteolize i označavanja proteina razlikuje se u eukariotskim i prokariotskim stanicama, ali se može uočiti sličnost kod mehanizma prepoznavanja.[7]

Zbog otkrića pravila N-kraja omogućena su mnoga istraživanja varijacija aminokiselinskih ostataka utjecajem na stabilnost istraživanih proteina te sam mehanizam razgradnje. Dva bitna pravila N-kraja kod eukariotskih stanica su Arg/N pravilo i Ac/N pravilo čijim proučavanjem stječemo daljnje razumijevanje o razgradnji proteina, ulozi enzima i samih pravila. Premda su osnovni mehanizmi temeljnih N-kraj pravila modifikacija i selektivnost supstrata dobro definirani, malo je poznato o identitetu i regulaciji dijelova koji tvore N-degrone, posebno u određenim staničnim stanjima, na primjer u kontekstu staničnog ciklusa.

Eukariotske i prokariotske stanice evolucijski su se razvile od istog pretka. Nakon razdvajanja eukariota i prokariota razlike u proteolizi su bile male, ali s vremenom i evolucijskim razvojem došlo je do promjena. Proučavanjem pravila N-kraja mogu se zaključiti sličnosti u obilježavanju i mehanizmu proteolize.

4. LITERATURA

1. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox. Principles of biochemistry, 6th edition. New York: W.H.Freeman and company , 2013.
2. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry, 5. izd., W. H. Freeman and Company, New York 2002.
3. E.K. Schrader, K.G. Harstad, A. Matouschek, Targeting proteins for degradation, *Nat. Chem. Biol.* **250** (2009), 815–822.
4. M.S. Shashikanth, K.Y. Bo, K.T. Yong, The N-end rule pathway: emerging functions and molecular principles of substrate recognition, *Nature*, **12** (2011), 735-747.
5. P. W. Atkin, M. J. Clugston, Principles of Physical Chemistry, 3rd edition. UK, Longman 1986.
6. K. Kušević, Računalna metoda za određivanje proteinskih interakcija, 2013.
7. A. Bachmair, D. Finley, A. Varshavsky, In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue, *Science* **234** (1986), 179–186
8. D. K. Gonda; et al.,Universality and Structure of the N-end Rule, *J. Biol. Chem.*, **264** (1989), 16700–16712
9. A. Hershko, The protein substrate binding site of the ubiquitin-protein ligase system, *J. Biol. Chem*. **261** (1986), 11992–11999
10. I. Weygand-Đurašević, Nobelova nagrada za kemiju 2004., *Osvrti, Kem. Ind.* **53** (2004), 596—599
11. A. Hershko, A. Ciechanover, I. A. Rose, Resolution of the ATP-Dependent Proteolytic System from Reticulocytes: A Component that Interacts with ATP, *P. Natl. Acad. Sci-Biol.***76** (1979), 3107-3110
12. A. Varshavsky, The N-end rule pathway and regulation by proteolysis, Division, *Calif. Med*, **52** (2011), 234-237
13. H. Tae, K. P. Kim, F. Lledias, A. F. Kisselev, K. M. Scaglione, D. Skowyra, S. P. Gygi, A. L. Goldberg, Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages, *J. Biol. Chem.* **282**, (2007), 17375–17386
14. A. Mogk, R. Schmidt, B. Bukau, The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies, *Science Direct* **282** (2007) 69103-69120