Primjena inteina u procesiranju proteina

Gabrilo, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:217:348759

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO –MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

PRIMJENA INTEINA U PROCESIRANJU PROTEINA

THE USE OF INTEINS IN PROTEIN SPLICING

SEMINARSKI RAD

Jelena Gabrilo

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2015.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. PROCESIRANJE PROTEINA 2

3. EKSPRESIJA I MODIFIKACIJA PROTEINA 4

3.1. CIKLIZACIJA 4

3.1.1. TRANS DORADA PROTEINA 4

3.1.2. METODA VEZANJA SINTETSKOG PROTEINA 6

3.2. PROTEINI S UNIFORMNIM N – TERMINALNIM OSTACIMA 7

3.3. EKSPRESIJA PEPTIDA, TOKSIČNIH PROTEINA I PROTEINA IZ JEDNOG OKVIRA ČITANJA 8

3.4. INTEINSKE PROTEAZE 10

3.5. INTEINI KAO GENETIČKI MARKERI 11

4. PROCESIRANJE I OZNAČAVANJE PROTEINA POSREDOVANO INTEINIMA 12

4.1. SEMI – SINTEZA PROTEINA NA POVRŠINI STANICE 12

4.2. OZNAČAVANJE PROTEINA U STANICI 13

5. REGULACIJA AKTIVNOSTI PROTEINA UZ POMOĆ UVJETNE DORADE PROTEINA 14

5.1. UVJETNA DORADA PROTEINA INDUCIRANA MALIM MOLEKULAMA 14

5.2. UVJETNA DORADA PROTEINA AKTIVIRANA TEMPERATUROM 14

5.3. UVJETNA DORADA PROTEINA INDUCIRANA REDUKCIJOM 15

6. ZAKLJUČAK 16

7. LITERATURA 17

8. SAŽETAK 19

9. SUMMARY 19

1. UVOD

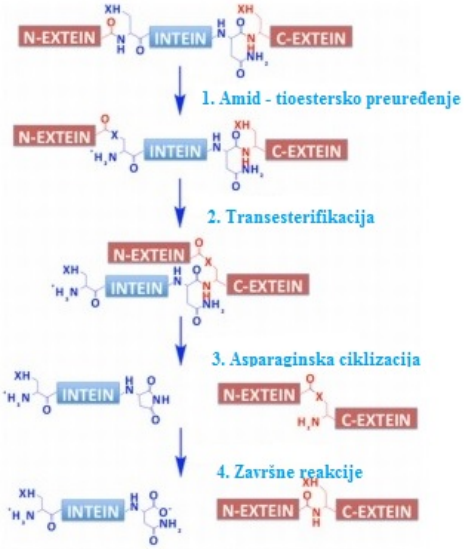
Inteini su pokretni genetički elementi koji imaju sposobnost samoizrezivanja iz polipeptida tijekom posttranslacijske dorade. Prisutni su u sve tri domene živoga svijeta kao i u virusima. Proces je analogan izrezivanju introna na razini RNA molekule. Dorada proteina je posttranslacijski proces tijekom kojega intervenirajuća regija, odnosno intein, katalizira vlastito izrezivanje iz polipeptida te ligaciju preostalih eksteina. Na taj način se prekursorski polipeptid pretvara u zreli i funkcionalni protein (Novikova i sur. 2014). Nomenklatura inteina uključuje oznaku roda i vrste, skraćenu na tri slova te oznaku gena domaćina. Na primjer, intein koji potječe iz kvaščevog gena VMA1 se naziva *Sce* VMA1.

Inteini se dijele u dvije skupine, veliki i mini inteini. Veliki inteini sadrže HEN (homing endonuclease) domenu te domenu za prekrajanje proteina. Mini inteini se dobivaju uklanjanjem endonukleazne domene iz velikih inteina što ukazuje da ta domena nije potrebna za procesiranje. Većina inteina se eksprimira unutar jednog polipeptidnog lanca (*cis* – splicing inteini) dok su neki podijeljeni u dva polipeptida od kojih svaki sadrži po jedan eksteinski i inteinski fragment (*trans* – splicing inteini). Takvi inteini se nazivaju podijeljeni inteini (Elleuche i sur. 2010).

Metode temeljene na upotrebi inteina se svakim danom razvijaju sve više i više te su postale glavni alat u modernoj biotehnologiji. Koriste se za ekspresiju i modifikaciju proteina, posttranslacijsko procesiranje i označavanje, regulaciju proteina i ekspresiju *trans* gena. Također, imaju i ulogu biosenzora (Topilina i sur. 2014).

2. PROCESIRANJE PROTEINA

Mehanizam prekrajanja proteina sastoji se od četiri koraka. Prekursor procesiranog proteina sadrži tri segmenta : N – ekstein, intein i C – ekstein (Slika 2 A). Nukleofilnim napadom N – terminalnog cisteina ili serina inteina, peptidna veza koja povezuje N – ekstein i intein se pretvara u tioestersku ili estersku vezu. Zatim se N – ekstein transesterifikacijom prenosi sa bočnog ogranka inteina na bočni ogranak C – eksteina pri čemu nastaje razgranati esterski intermedijer. Taj razgranati ester se razrješava asparaginskom ciklizacijom koja je spregnuta s cijepanjem peptidne veze. Rezultat ove reakcije su ligirani eksteini povezani esterskom vezom i odvojeni od inteina koji ima C – terminalni aminosukcinimid. U zadnjem koraku, esterska veza između eksteina se pretvara u amidnu vezu, a C – terminalni aminosukcinimid se hidrolizira (Slika 1).



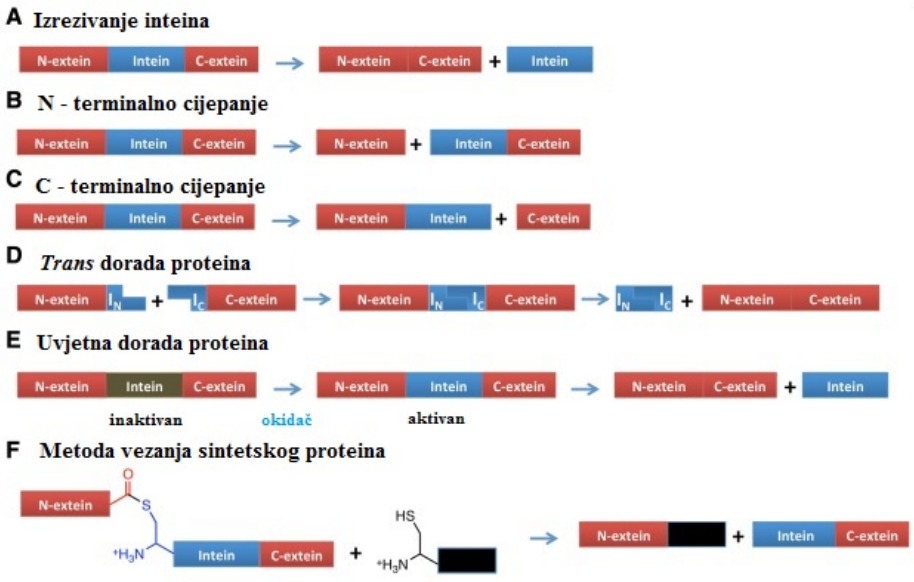
Slika 1. Mehanizam izrezivanja inteina. Preuzeto i prilagođeno iz Topilina i sur. 2014.

Dvije sporedne reakcije se mogu dogoditi tijekom procesa izrezivanja inteina. Ester ili tioester koji nastaje u prvom koraku se može pocijepati hidrolizom ili tiolizom bez asparaginske ciklizacije. Taj proces se naziva N – terminalno cijepanje, a rezultat je N – ekstein izrezan iz

prekursora (Slika 2 B). S druge strane, asparaginska ciklizacija se može dogoditi neovisno o prvom i drugom koraku prilikom čega dolazi do oslobađanja C – eksteina. Taj proces se naziva C – terminalno cijepanje (Slika 2 C). Također, neki inteini su eksprimirani kao dva razdvojena fragmenta i kao takvi se koriste za *trans* doradu proteina (protein *trans* splicing, PTS). Tijekom te dorade prvo dolazi do reasocijacije inteinskih fragmenata, a tek onda do njihovog izrezivanja (Slika 2 D).

I *cis* i *trans* splicing inteini se mogu podvrgnuti uvjetnoj doradi proteina (conditional protein splicing, CPS). CPS zahtijeva nekakav okidač koji će pokrenuti doradu prekursorskog proteina (Slika 2 E). Kao okidač može poslužiti svjetlost, promjena pH vrijednosti ili temperature, redoks stanja te prisutnost malih molekula (Topilina i sur. 2014).

Metoda vezanja sintetskog proteina (expressed protein ligation, EPL) se koristi za modifikaciju C terminusa. Protein svojim C terminusom fuzioniran s inteinom se prenosi na bočni ogranak sintetskog peptida koji ima N - terminalni cistein. Taj peptid može sadržavati nenativne aminokiseline ili druge kemijske probe koje se na taj način mogu ugraditi u protein (Slika 2 F).



Slika 2. Shematski prikaz izrezivanja proteina. A. Izrezivanje inteina. B. N – terminalno cijepanje. C. C – terminalno cijepanje. D. *Trans* dorada proteina. E. Uvjetna dorada proteina. F. Metoda vezanja sintetskog proteina. Preuzeto i prilagođeno iz Topilina i sur. 2014.

3. EKSPRESIJA I MODIFIKACIJA PROTEINA

Metode bazirane na inteinima se koriste za modifikaciju sekvence ili strukture rekombinantnih proteina, uključujući ciklizaciju i polimerizaciju proteina, ekspresiju proteina s nativnim N – terminalnim ostacima i mjesno specifičnu proteolizu. Inteini mogu olakšati i ekspresiju toksičnih proteina te velikih proteina iz istog okvira čitanja, omogućuju posttranslacijsko stvaranje malih peptida te služe kao selektivni genetički markeri.

3.1. CIKLIZACIJA PROTEINSKE OKOSNICE

Ciklizacija proteina označava povezivanje N i C krajeva proteinskog lanca kovalentnom vezom. Ciklizacija rezultira njihovom povećanom stabilnošću i bioaktivnošću (Topilina i sur. 2014). Stabilnost takvih proteina se povećava budući da su otporni na egzoproteaze koje ne mogu degradirati cikličke proteine. Posebno su zanimljivi ciklički antibiotici koji u usporedbi sa svojim linearnim analozima imaju veću stabilnost te aktivnost (Elleuche i sur. 2010). Cirkularizacija odnosno ciklizacija proteinske okosnice se koristi za proučavanje i manipulaciju strukture i funkcije proteina. Također, ciklizacija stabilizira smatanje proteina reducirajući entropiju koja je inače povezana s nesmotanim stanjem.

Jedna od najvažnijih primjena ciklizacije uz pomoć inteina je *in vivo* stvaranje velikih biblioteka genetički kodiranih cikličkih peptida. Iako je kemijska sinteza cikličkih peptida jako razvijena, biosinteza ipak ima mnogo više prednosti upravo iz razloga što se biblioteke cikličkih peptida mogu stvarati i pretraživati *in vivo*. Ciklizacija peptida i proteina se uz pomoć inteina može postići dvjema metodama: metoda vezanja sintetskog proteina i *trans* dorada proteina.

3.1.1. TRANS DORADA PROTEINA (PTS)

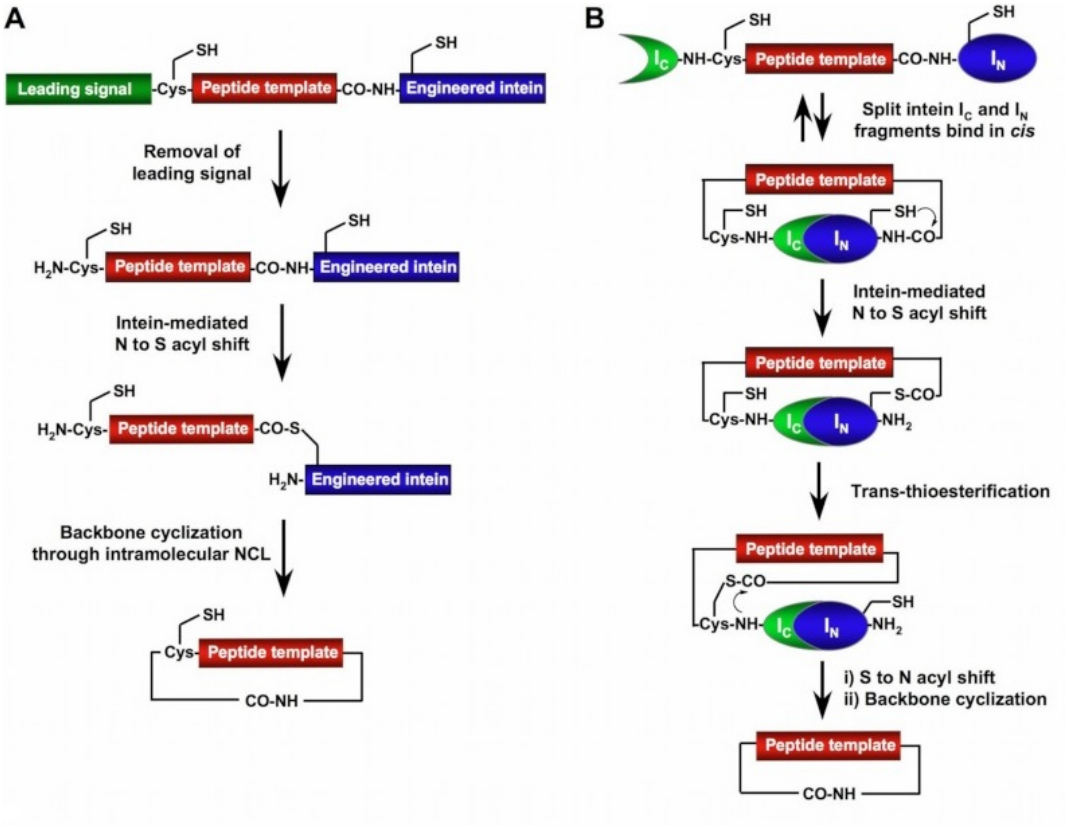
Trans dorada proteina koristi intein koji je podijeljen u dva fragmenta, N intein i C intein. O ovoj metodi su prvi izvijestili Benkovic i suradnici koristeći DnaE split intein iz *Synechocystis* sp. za proizvodnju cikličkih peptida i proteina *in vivo*. Inteinski fragmenti nisu

individualno aktivni, ali se vežu jedan za drugoga s visokom specifičnošću te stvaraju aktivnu inteinsku domenu in *trans*. Ciljni protein se eksprimira kao fuzija s C- i N- split inteinskim fragmentima. Promjenom redoslijeda N- i C- inteinskih fragmenata dolazi do PTS reakcije te nastanka cikliziranog peptida (Slika 3 B). Ova metoda se često naziva i SICLOPPS (split intein circular ligation of proteins and peptides) i primjenjuje se za stvaranje biblioteka malih cikličkih peptida (Aboye i sur. 2012).

Naime, došlo se do zaključka da se ova tehnologija može koristiti u kombinaciji s nonsense supresorskom tRNA tehnologijom kako bi se izgradile velike biblioteke cikličkih heksapeptida koristeći širok spektar „neprirodnih“ aminokiselina. Te biblioteke su se koristile u pretraživanju za inhibitorom HIV proteaze primjenjujući selekciju na temelju stanične vijabilnosti. To je postignuto povezivanjem stanične vijabilnosti s aktivnošću HIV proteaze. Mjesto koje HIV proteaza cijepa je uvedeno u fleksibilnu regiju gena za tetraciklinsku otpornost (Tn10-HIV). Uvođenje ove sekvence ne utječe značajno na biološku aktivnost Tn10-HIV. Međutim, kad se koeksprimira zajedno s HIV proteazom, gubi se otpornost na tetraciklin. Stoga će stanice koje eksprimiraju Tn10-HIV i HIV proteazu moći rasti na mediju koji sadrži tetraciklin samo ako je HIV proteaza inhibirana; u suprotnom će pocijepati Tn10-HIV.

Znanstvenici su koristili ovaj pristup za pretraživanje (screening) preživjelih stanica koje eksprimiraju HIV/Tn10-HIV te koje su transformirane genetički kodiranom bibliotekom cikličkih peptida. U ovim uvjetima, samo stanice koje eksprimiraju cikličke peptide sposobne inhibirati HIV proteazu mogu rasti do zasićenja. Znanstvenici su uspjeli selektirati različite cikličke heksapeptide koji sadrže neprirodnu aminokiselinu p-benzoilfenilalanin koja može inhibirati HIV proteazu. Ova otkrića su dovela do saznanja da brojne aminokiseline koje se ne nalaze u prirodi mogu doprinijeti evolucijskoj prednosti nad selekcijskim pritiskom te pomoći u liječenju mnogih bolesti (Aboye i sur. 2012).

Osim za ciklizaciju, podijeljeni inteini se mogu koristiti i za polimerizaciju ciljnog proteina.



Slika 3. Dva pristupa u biološkoj proizvodnji cikliziranih polipeptida. A. Metoda vezanja sintetskog proteina. B. *Trans* dorada proteina. Preuzeto iz Aboye i sur. 2012.

3.1.2. METODA VEZANJA SINTETSKOG PROTEINA (EPL)

U ovoj metodi, ciklizacija se može postići na način da se protein od interesa fuzionira svojim N i C krajevima s različitim inteinima. Proteolizom ili C – terminalnim cijepanjem na mjestu spajanja N – inteina i ciljnog proteina dobije se N – terminalni cistein. Taj cistein reagira s aktiviranim tioesterom na mjestu spajanja C – inteina i ciljnog proteina EPL reakcijom te nastaje ciklizirani protein (Slika 3 A) (Topilina i sur. 2014).

EPL metoda se koristi za mjesno – specifično uvođenje kemijskih modifikacija na C – terminus rekombinantnih proteina. Osim ciklizacije polipeptida, svoju primjenu je našla i u mjesno - specifičnoj imobilizaciji proteina na čvrstim nosačima, ugradnji neprirodnih aminokiselina i optičkih sondi, semi – sintezi preniliranih proteina (Berrade i sur. 2009).

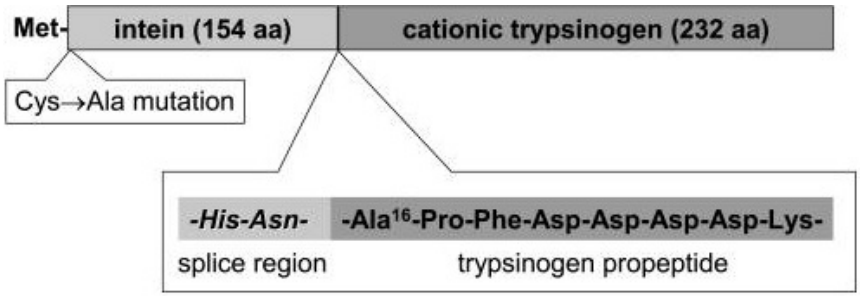
Ovaj pristup se koristio i za biosintezu ciklotida unutar bakterijskih stanica. Ciklotidi su mali globularni mikroproteini sa „head-to-tail“ cikliziranom okosnicom koja je

stabilizirana trima disulfidnim vezama. Broj i položaj cisteina je konzerviran te čini motiv cistinski čvor koji ciklotidima daje otpornost na fizičku, kemijsku i biološku razgradnju (Aboye i sur. 2012). Također, pronađeni su neki ciklotidi koji mogu proći kroz eukariotske membrane. Ta svojstva ih čine idealnim kandidatima za razvoj lijekova na bazi peptida.

3.2. PROTEINI S UNIFORMNIM N – TERMINALNIM OSTACIMA

Inteini se koriste i za ekspresiju proteina s uniformnim N – terminalnim ostacima u bakteriji *E. coli*. Pojačano eksprimirani proteini u *E. coli* mogu biti podvrgnuti neželjenom N – terminalnom procesiranju od strane metioninskih i prolinskih aminopeptidaza. Kako bi se izbjeglo to cijepanje i zadržale njihove nativne N – terminalne aminokiseline, ciljni protein je svojim N krajem fuzioniran sa *Ssp* DnaB mini – inteinom i eksprimiran u soju *E. coli* koji je deficijentan u enzimu aminopeptidaza, odnosno gen *pepP* koji kodira za aminopeptidazu P je deletiran iz genoma. Nakon C – terminalnog cijepanja inteina, dobije se protein sa željenom aminokiselinom na N kraju.

Kako bi se dokazalo da rekombinantni proteini proizvedeni na ovaj način imaju neprocesirane i homogene N - krajeve koristio se ljudski kationski tripsinogen. Naime, ovaj ekspresijski sustav je razvijen u sklopu projekta kojim se pokušao razjasniti funkcionalni učinak p.A16V mutacije u ljudskom kationskom tripsinogenu za koju je opaženo da je povezana s kroničnim pankreatitisom. Inicijatorski metionin je smješten uzvodno od mini – inteina dugačkog 154 aminokiseline koji je potom fuzioniran s ljudskim kationskim tripsinogenom (232 aminokiseline). N – terminalni cistein mini – inteina je mutiran u alanin kako bi se onemogućilo cijepanje na N – terminusu (Slika 4). Nativna N – terminalna sekvenca izolirana iz gušteračinog soka je Ala^{16}-Pro^{17}-Phe^{18}, dok je za tripsinogen eksprimiran u *E. coli* očekivana sekvenca Met- Ala^{16}-Pro^{17}-Phe^{18} (Kiraly i sur. 2011).



Slika 4. Primarna struktura intein – tripsinogen fuzijskog proteina. Preuzeto iz Kiraly i sur. 2011.

3.3. EKSPRESIJA PEPTIDA, TOKSIČNIH PROTEINA I PROTEINA IZ JEDNOG OKVIRA ČITANJA

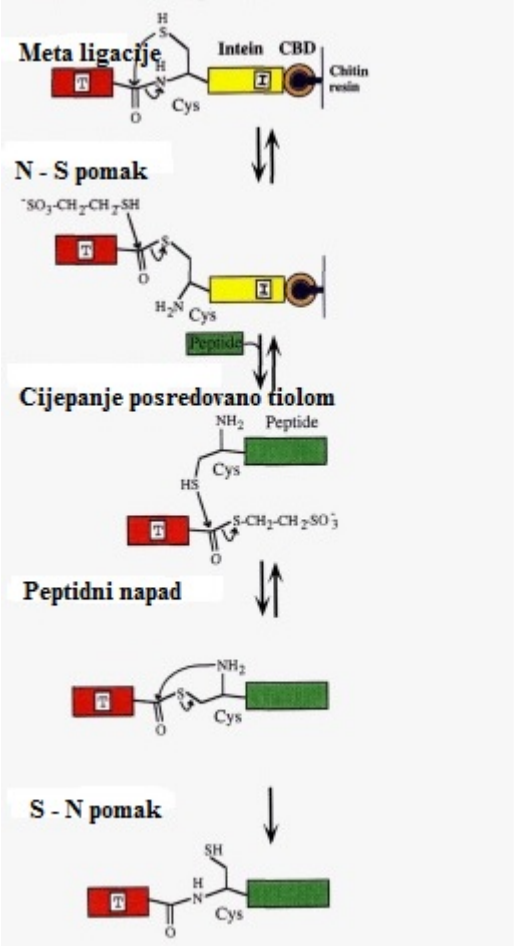
Uz pomoć inteinske tehnologije, proteini se mogu eksprimirati iz jednog otvornog okvira čitanja, mali peptidi kao dio pravilno smotanih proteina s afinitetnim domenama, a toksični proteini u inaktivnom obliku.

Inteini olakšavaju dobivanje peptida tijekom posttranslacijskog procesiranja te omogućuju razlikovanje peptida dobivenih cijepanjem neuređenih, defektnih ribosomskih produkata (defective ribosomal products, DRiPs) od onih dobivenih iz pravilno smotanih proteina. Primjerice, smatralo se da se MHC I peptidi dobivaju cijepanjem krivo smotanih proteinskih fragmenata. Međutim, cijepanje ili Mtu RecA ili Pch PRP8 mini – inteina također je dalo MHC I epitope. Budući da prekursor inteina mora imati stabilnu konformaciju kako bi se olakšalo izrezivanje, to upućuje na to da se MHC peptidi dobivaju iz stabilnih i pravilno savijenih proteina (Topilina i sur. 2014).

Inteini mogu olakšati i povećanu ekspresiju toksičnih proteina. Na primjer, *Sca* VMA intein se koristi u semi – sintezi aktivnih citotoksičnih enzima iz inaktivnih fragmenata EPL metodom. Kao što je već rečeno, reakcije izrezivanja inteina započinju nukleofilnim napadom N – terminalnog cisteina dok je otpuštanje inteina iz prekursora posredovano ciklizacijom C – terminalnog asparagina. Mutacija reaktivnog asparagina u alanin blokira izrezivanje inteina. Međutim, takav mutant još uvijek ima N – terminalni cistein kojim može izvršiti nukleofilni napad.

Ovaj princip je korišten za proizvodnju goveđe RNaze A i restrikcijske endonukleaze iz *Haemophilus parainfluenzae* (*HpaI*). U *E. coli* eksprimirani su njihovi krnji i inaktivni

oblici kao fuzijski proteini koji se sastoje od ciljnog proteina, inteina i hitin - vezne domene (CBD). CBD služi za njihovu izolaciju budući da se veže na kolonu koja sadrži hitinska zrnca. Tiol – inducirano cijepanje fuzijskog proteina rezultira otpuštanjem ciljnog proteina s C – terminalnim tioesterom. Dodatkom sintetskih peptida koji sadrže aminokiseline koje nedostaju krnjim proteinima i N – terminalni cistein, stvaraju se produkti normalne duljine (Slika 5). Ti proteini imaju katalitičku aktivnost karakterističnu za proteine divljeg tipa za razliku od krnjih fragmenata RNaze A i *HpaI* koji nemaju nikakvu enzimsku aktivnost (Evans i sur. 1998). Razlika je samo u tome što ligirana RNaza A zahtjeva renaturaciju za svoju potpunu katalitičku aktivnost, dok *HpaI* odmah nakon ligacije pokazuje svoju aktivnost.

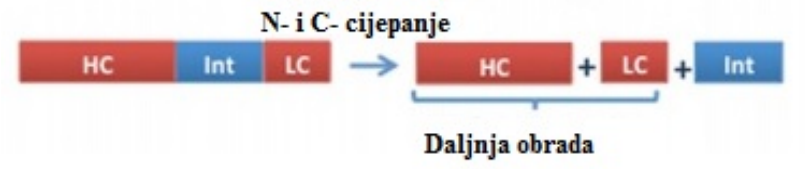


Slika 5. Ligacija peptida posredovana inteinom. Preuzeto i prilagođeno iz Evans i sur. 1998.

Drugi pristup je stvaranje netoksičnog proteinskog prekursora umetanjem inteina u toksični protein prilikom čega se dobije ciljni protein čija aktivnost ovisi o uvjetima CPS – a

inteina (Topilina i sur. 2014). Na primjer, I-TevI endonukleaza se inaktivira umetanjem modificiranog *Mtu* RecA inteina koji je aktivan samo pri određenim pH vrijednostima. Prilikom insercije inteina potrebno je pronaći odgovarajući cistein u ciljnom proteinu gdje bi ugradnja inteina ublažila toksičnost (Wu i sur. 2002).

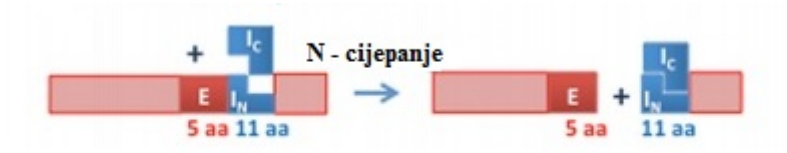
Fuzijom inteina s genima za laki i teški lanac antitijela može se postići ekspresija antitijela iz jednog okvira čitanja. Takav fuzijski protein je uspješno i eksprimiran i procesiran u stanicama sisavaca reakcijama N – i C – terminalnog cijepanja inteina. To je rezultiralo antitijelima koja imaju ispravne sekvence i za teški i za laki lanac (Slika 6).



Slika 6. Stvaranje antitijela koje se eksprimira iz jednog okvira čitanja. Preuzeto i prilagođeno iz Topilina i sur. 2014.

3.4. INTEINSKE PROTEAZE

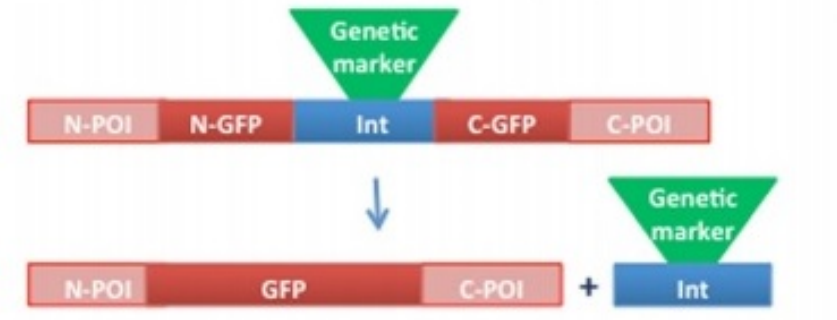
Podijeljeni inteini se primjenjuju i za mjesno – specifično cijepanje proteina. N - terminalni fragment *Ssp* DnaB S1 split inteina se može ubaciti između dvije ciljne sekvence i koristiti kao mjesto cijepanja koje prepoznaje C – terminalni inteinski fragment. Taj fragment se ponaša kao inteinska proteaza te se prilikom njegovog spajanja s N – terminalnim dijelom ciljni protein pocijepa (Slika 7). Inteinske proteaze imaju prednost nad ostalima jer omogućuju kontrolu proteinskog cijepanja unutar živih stanica budući da njihova aktivnost rezultira minimalnom staničnom toksičnošću (Topilina i sur. 2014).



Slika 7. Primjena inteina kao visoko specifične proteaze. Preuzeto i prilagođeno iz Topilina i sur. 2014.

3.5. INTEINI KAO GENETIČKI MARKERI

Inteini mogu poslužiti i u *in vivo* modifikaciji gena. Primjerice, *Pch* PRP8 intein može tolerirati mnoštvo genetičkih markera te i dalje zadržati visoku efikasnost izrezivanja. Genetički obilježeni intein se može koristiti za inserciju GFP-a unutar ciljnog proteina *in vivo*. Primjer je označavanje kalmodulina GFP-om u kvascu. Ti inteini služe kao selektivni markeri za ekspresiju proteina unutar kojeg su ugrađeni. Nakon izrezivanja nisu više dio zrelog proteina (Slika 8). Ova metoda se može proširiti i na druge proteinske privjeske te prilagoditi i drugim organizmima. Također, može naći primjenu i u nekim drugim sustavima kao što je recombineering (Ramsden i sur. 2011).



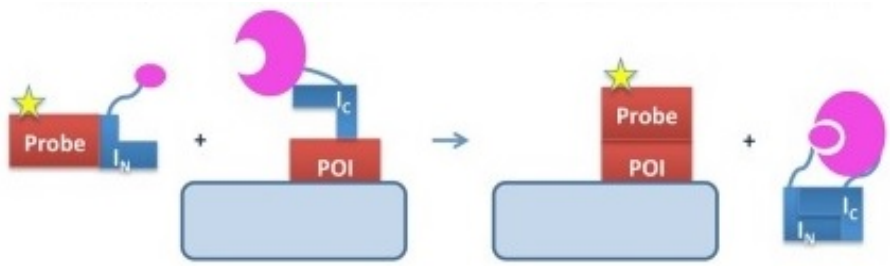
Slika 8. Primjena inteina kao genetičkog markera. Preuzeto iz Topilina i sur. 2014.

4. PROCESIRANJE I OZNAČAVANJE PROTEINA POSREDOVANO INTEINIMA

Trans dorada proteina se primjenjuje u *in vivo* modifikaciji proteina, uključujući semi – sintezu na površini stanice te označavanje proteina unutar stanice.

4.1. SEMI – SINTEZA PROTEINA NA POVRŠINI STANICE

Semi – sinteza započinje označavanjem C – terminusa nekog proteina odnosno receptora na površini stanice fluorescentnom grupom kao što je 5 – karboksi-fluorescein uz pomoć podijeljenog inteina. Podijeljeni inteini omogućuju odvijanje reakcije između tog proteina i peptida koji nosi neku željenu oznaku. PTS se odvija prilikom ligacije endogenog polipeptida s membranskim proteinom na površini stanice (Slika 9). Kako bi se nadvladao slabi vezni afinitet između intenskih fragmenata, potrebna je pomoćna interakcija receptor – ligand (Topilina i sur. 2014). Dakle, ta interakcija omogućuje povezivanje podijeljenih inteinskih fragmenata i njihovo izrezivanje prilikom čega na površini stanice ostane fuzionirani protein. Uz pomoć fluorescentne skupine može se pratiti njegovo smatanje, kretanje po stanici te lokalizacija proteina (Volkmann i sur. 2009).

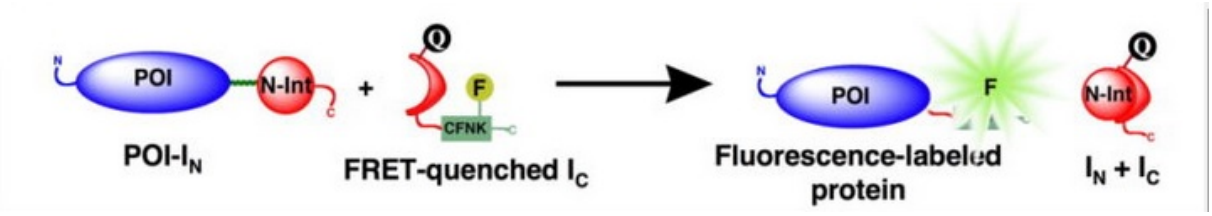


Slika 9. Označavanje proteina koji se nalaze na površini stanice. Preuzeto iz Topilina i sur. 2014.

4.2. OZNAČAVANJE PROTEINA U STANICI

Razvijeno je nekoliko metoda temeljenih na inteinima za selektivno označavanje proteina unutar živih stanica. Sve te metode uključuju podijeljene inteine s jako malim N- ili C- inteinskim fragmentima, od 6 do 15 aminokiselina. Kraće inteinske fragmente je lakše sintetizirati, a i veća je vjerojatnost da će ući u stanicu. Za razliku od drugih metoda, *in vivo* označavanje proteina temeljeno na inteinima ima nekoliko prednosti. Primjerice, označavanje se bazira na prepoznavanju inteinskih fragmenata.

Prilikom *trans* dorade proteina, intein je podijeljen u dva fragmenta, C- intein i N-intein koji se međusobno vežu sa visokom specifičnošću. Na taj način omogućuju stvaranje funkcionalne domene koja može ligirati N- i C- eksteinske segmente. *Ssp* DnaE intein ima relativno mali I_C fragment što olakšava njegovu kemijsku sintezu. To omogućuje upotrebu sintetskih I_C fragmenata koji mogu nositi različite probe u svom C – eksteinskom segmentu. Dakle, uvođenje prigušivača u isti I_C polipeptid gasi fluorescenciju koja potječe od te fluorescentne probe lokalizirane u C – eksteinskom segmentu. Tako I_C koji ne reagira, ne pokazuje fluorescenciju. Tek nakon *trans* reakcije, kad se C – ekstein prenese na akceptorski protein, fluorescentna proba će se aktivirati jer se više ne nalazi u blizini prigušivača (Slika 10). To rezultira fluorescencijom te označavanjem ciljnog proteina (Borra i sur. 2012).



Slika 10. Mjesno – specifično obilježavanje i fluorescencija ciljnog proteina. Preuzeto iz Borra i sur. 2012.

5. REGULACIJA AKTIVNOSTI PROTEINA UZ POMOĆ UVJETNE DORADE PROTEINA (CPS)

Kako bi se mogla regulirati aktivnost proteina *in vivo*, njegovo izrezivanje mora biti uvjetno, ili in *cis* ili in *trans*. To znači da se aktivira uz pomoć nekog okidača kao što su male molekule, svjetlost, temperatura, pH ili promjena redoks stanja.

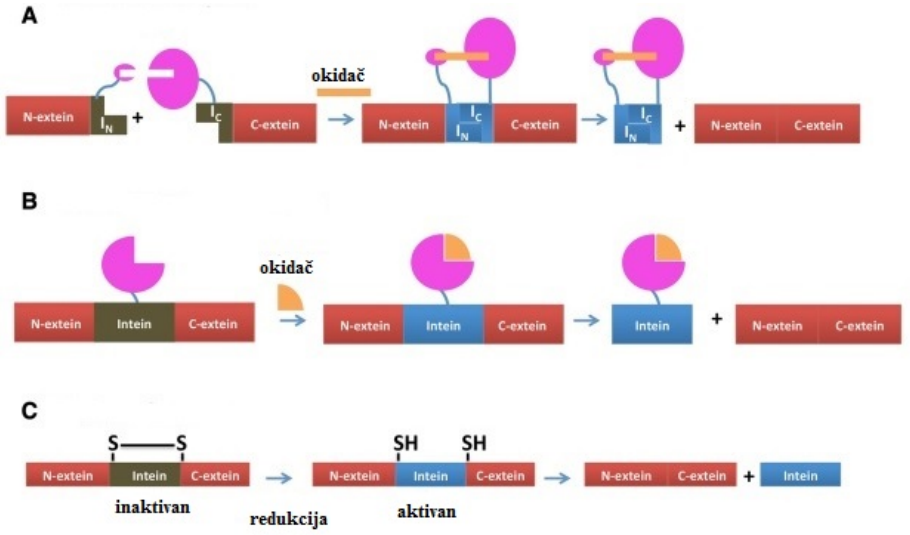
5.1. UVJETNA DORADA PROTEINA INDUCIRANA MALIM MOLEKULAMA

Domene čija je dimerizacija inducirana ligandom omogućuju aktivaciju PTS – a. Na primjer, intein *Sce* VMA je pocijepan na N- i C- fragmente koji su fuzionirani s rapamicin veznim domenama FKBP12 i FRB. Dodatkom rapamicina potiče se dimerizacija tih domena što inducira reasocijaciju inteina i aktivciju PTS-a (Slika 11 A). Ovaj pristup je našao primjenu u kontroliranom stvaranju luciferaze krijesnice u mušici *Drosophila melanogaster* te stanicama u kulturi. Također, dizajnirani su i inteni koji kontroliraju *cis* doradu proteina. Na mjestu endonukleazne domene inteina, umetnuta je ligand vezna domena humanog estrogenskog receptora. Dodatak odgovarajućeg liganda potiče izrezivanje inteina (Slika 11 B). Dakle, moguće je dizajnirati inteine koji se mogu ili uključiti ili isključiti u prisutnosti određene molekule (Topilina i sur. 2014).

5.2. UVJETNA DORADA PROTEINA AKTIVIRANA TEMPERATUROM

Razvijena je temperaturno – osjetljiva verzija *Sce* VMA inteina koja omogućuje kontrolu cijepanja proteina u ovisnosti o temperaturnim promjenama i u kvascu i u *D. melanogaster*. Intein kontrolira aktivaciju transkripcijskih faktora Gal4 i Gal80 koji pak omogućuju temperaturno – ovisnu aktivaciju ili represiju transkripcije ciljnih gena. Na taj način se uz pomoć CPS – a može postići općenitija kontrola aktivnosti proteina budući da je ta kontrola povezana s transkripcijskom aktivacijom koja kontrolira bilo koji gen. CPS je obećavajuća metoda za stvaranje temperaturno – osjetljivih mutanata.

Uz temperaturu, CPS može biti potaknut i svjetlošću te promjenom pH vrijednosti. Fotoaktivacija se može postići ili fuzijom inteina s fotodimerizacijskom domenom ili dodatkom zaštitnih skupina koje se cijepaju pod utjecajem svjetlosti (Topilina i sur. 2014).



Slika 11. Prikaz uvjetne dorade proteina (CPS). A. Uvjetna dorada proteina potaknuta djelovanjem male molekule na *trans* inteine. B. Uvjetna dorada proteina potaknuta djelovanjem male molekule na *cis* intein. C. Uvjetna dorada proteina inducirana redukcijom. Preuzeto i prilagođeno iz Topilina i sur. 2014.

5.3. UVJETNA DORADA PROTEINA INDUCIRANA REDUKCIJOM

CPS se može kontrolirati i redoks stanjem disulfidnih veza. Kada se disulfidna veza između C- i N- eksteina nalazi u oksidiranom stanju, intein nije aktivan. Primjenom nekog reducirajućeg sredstva kao što je ditiotreitol, disulfidna veza se reducira što inducira aktivnost inteina te dolazi do njegovog izrezivanja (Slika 11). Kako bi se kontroliralo preuranjeno cijepanje *cis* inteina, na određenim položajima u inteinu ili eksteinu se uvode cisteini između kojih se formira disulfidna veza.

6. ZAKLJUČAK

Otkrićem inteina je značajno porasla njihova primjena u polju molekularne biologije. Zamijenili su mnoge kemijske metode, bilo da se koriste prirodni ili pak umjetni inteini. Samo 20 godina nakon njihovog otkrića, oni se već koriste za pročišćavanje, manipuliranje pa čak i proizvodnju proteina koje je teško dobiti korištenjem tradicionalnih metoda. Zbog svoje autokatalitičke reakcije, inteini nisu ovisni niti o domaćinskom proteinu niti o bilo kojem drugom supstratu. To ih čini pogodnima za *in vivo* i *in vitro* primjene. Njihovom upotrebom je pokazano da oni ne povećavaju samo mogućnosti posttranslacijskog procesiranja, nego isto tako mogu poslužiti i u industrijske svrhe, odnosno u biotehnologiji. Najvažniji inteini koji se primjenjuju u biotehnologiji su podijeljeni inteini.

Zahvaljujući inteinima, moguće je razvijati lijekove na bazi peptida. No, potrebno je dodatno optimizirati metode posredovane inteinima kako bi one postale što ekonomičnije i primjenjivije u biotehnologiji.

Inteini su također zanimljivi i u evolucijskoj biologiji budući da zbog svojih katalitičkih svojstava mogu poslužiti kao dokaz prvobitnih enzima odnosno mogu dati uvid u neke od najranijih enzima. Također, pretpostavlja se da inteini u početku nisu imali endonukleaznu domenu koja im omogućuje skakanje između genoma te da su je „dobili“ tek kasnije u evoluciji što im je omogućilo da postanu sebični genetički elementi. Međutim, potrebna su još brojna istraživanja kako bi se točno utvrdilo na koji način inteini funkcioniraju te na temelju toga zaključiti jesi li to samo sebični genetički elementi ili su doista u pitanju „ostaci“ prošlosti.

7. LITERATURA

Aboye TL, Camarero JA: Biological synthesis of circular polypeptides. J Biol Chem 2012, 287:27026–27032

Berrade L, Camarero JA: Expressed protein ligation: a resourceful tool to study protein structure and function. Cell Mol Life Sci 2009, 66:3909–3922

Borra R, Dong D, Elnagar AY, Woldemariam GA, Camarero JA: In-cell fluorescence activation and labeling of proteins mediated by FRET-quenched split inteins. J Am Chem Soc 2012, 134:6344–6353

Elleuche S, Poggeler S. 2010. Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 479–489

Evans TC Jr, Benner J, Xu MQ: Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. Protein science 1998, 7:2256–2264

Kiraly O, Guan L, Sahin-Toth M: Expression of recombinant proteins with uniform N-termini. Methods Mol Biol 2011, 705:175–194

Novikova O., Topilina N., Belfort M. (2014) Enigmatic distribution, evolution, and function of inteins. J. Biol. Chem. 289, 14490–14497

Ramsden R, Arms L, Davis TN, Muller EG: An intein with genetically selectable markers provides a new approach to internally label proteins with GFP. BMC Biotechnol 2011, 11:71

Topilina N. I., Mills K. V. (2014) Recent advances in in vivo applications of intein-mediated protein splicing. Mob. DNA 5, 5

Volkmann G, Liu XQ: Protein C-terminal labeling and biotinylation using synthetic peptide and split-intein. PLoS One 2009, 4:e8381

Wu W, Wood DW, Belfort G, Derbyshire V, Belfort M: Intein-mediated purification of cytotoxic endonuclease I-TevI by insertional inactivation and pH-controllable splicing. Nucleic Acids Res 2002, 30:4864–4871

8. SAŽETAK

Dorada proteina je posttranslacijski proces tijekom kojega intervenirajuća regija odnosno intein katalizira vlastito izrezivanje iz polipeptida te ligaciju preostalih eksteina. Neki inteini su eksprimirani kao dva razdvojena fragmenta te olakšavaju *trans* doradu proteina. Neki se pak mogu podvrgnuti uvjetnoj doradi proteina, dok se uz pomoć EPL – a mogu uvoditi mjesno – specifične modifikacije u protein. Metode temeljene na inteinima su postale glavni alat u modernoj biotehnologiji. Napredak u razumijevanju strukture i katalitičkih svojstava *cis*- i *trans*- inteina je doveo do razvoja modificiranih inteina koji omogućuju pročišćavanje proteina, njihovu ligaciju te ciklizaciju. Koriste se za ekspresiju i modifikaciju proteina, posttranslacijsko procesiranje i označavanje te regulaciju proteina.

9. SUMMARY

Protein splicing is a post-translational process by which an intervening sequence, called an intein, catalyses its own excision from the polypeptide as well as ligation of the flanking sequences, called exteins. Some inteins are expressed as two separate fragments and facilitate protein *trans* splicing. Some of them can undergo conditional protein splicing whereas expressed protein ligation (EPL method) can incorporate site – specific protein modifications. Intein – based methods have become an essential tool in modern biotechnology. Progress in understanding the structure and catalytic properties of *cis*- and *trans*- inteins has led to the development of modified inteins that allow for protein purification, ligation and cyclization. They have been used in protein expression and modification, post – translational processing and labelling and protein regulation.