

UNUTARĆELIJSKA RAZGRADNJA PROTEINA

• Proteini imaju ograničenu dužinu života (zavisi od tipa proteina) i podložni su različitim oštećenjima.

Razgradnja proteina sprečava nagomilavanje izmenjenih ili nepoželjnih proteina i omogućava ponovno korišćenje amino kiselina. Ova razgradnja proteina može da se dešava u:

- **Lizozomima**- razgradnja membranskih proteina, vanćelijskih i ćelijskih proteina sa dugim poluživotom (nekoliko sati pa i dana)
- **Citosolu**- selektivan ATP zavisni ubikvitin-proteazomalni sistem. Razgrađuje izmenjene proteine ili proteine sa kratkim poluživotom (5-20min).

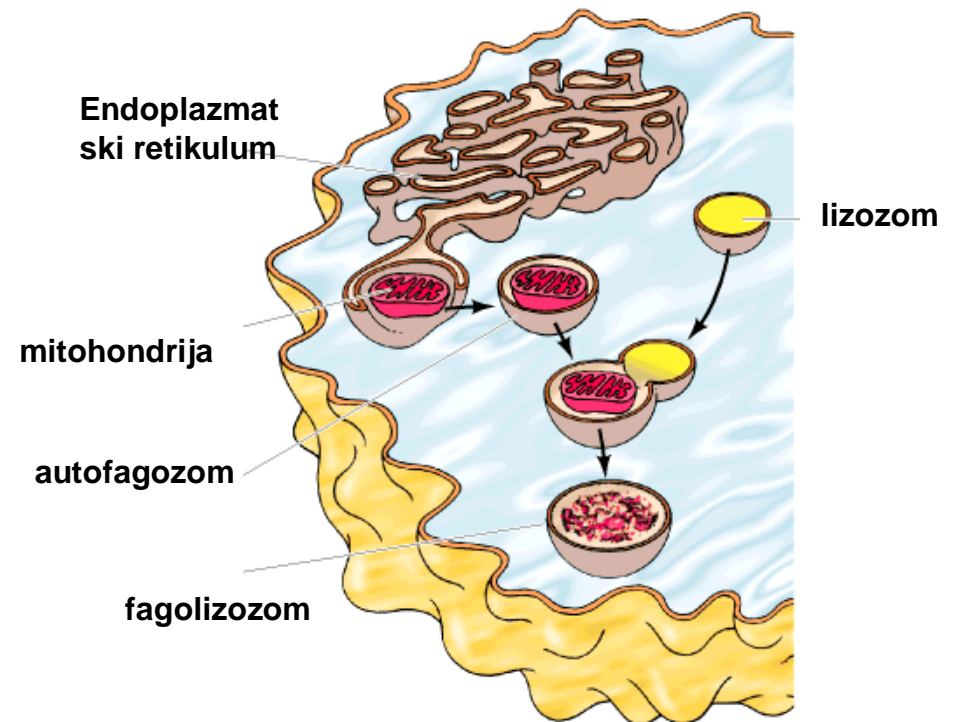
Unutarćelijska proteoliza je kompleksan i veoma kontrolisan proces i predstavlja značajan mehanizam ćelijske regulacije, njene adaptacije, obnavljanja unutarćelijskog pula amino kiselina kao i procesa života i smrti svake ćelije

• Ima prednost u odnosu na druge načine inaktivacije proteina jer je ireverzibilna i dovodi do potpunog gubitka neke ćelijske funkcije.

LIZOZOMALNA RAZGRADNJA

• **Lizozomi** učestvuju u procesu autofagije u kome se unutarćelijske komponente okružuju membranama koje fuzionišu sa lizozomima. Autofagija je kontrolisan proces u kome se citoplazma rasparča na vezikule koje se predaju lizozomima. Unutar lizozoma, familija proteaza-KATEPSINI, razgrađuje unete proteine na pojedinačne amino kiseline. Ove amino kiseline napuštaju lizozom i ulaze u pul amino kiselina, spremne da uđu u sintezu proteina.

Smatra se da je gladovanje ćelije stimulus za autofagiju.



PROTEAZE UKLJUČENE U OBRT PROTEINA I NJIHOVU RAZGRADNJU

klasifikacija	mehanizam	uloga
Katepsini	Cistein proteaze	Lizosomalni enzim
Kaspaze	Cistein proteaze koje deluju iza aspartata	Apoptoza; aktivira se iz pro-kaspaze
Matriks metaloproteinaze	Neophodan im je Zn za katalitičku aktivnost	Komponenta vanćelijskog matriksa; kontroliše je tkivni inhibitor metaloproteinaza
Proteazomi	Veliki kompleksi koji razgrađuju ubikvitinom obeležene proteine	Obrt proteina
Serin proteaze	Sadrže serin u aktivnom mestu, koji formira katalitičku trijadu zajedno sa histidinom i aspartatom	Varenje i koagulacija krvi; aktiviraju se iz oblika proenzima
Kalpain	Ca zavisne cistein proteaze	Mnoge različite uloge u ćeliji

SISTEM UBIKVITIN PROTEAZOM

Ubikvitin (Ub) je protein sastavljen od 76 amino kiselinskih ostataka. Njegova struktura je visoko konzervisana tokom evolucije. Prisutan je u svakoj eukariotskoj ćeliji.

UBIKVITINACIJA – vezivanje molekula Ub za protein koji time postaje obeležen tj postaje ciljani supstrat za proteolizu na proteazomu.

Razgradnja proteina preko sistema ubikvitin-proteazom se dešava u dva koraka:

1. Kovalentno vezivanje većeg broja molekula Ub za protein (supstrat)
2. Razgradnja ovako obeleženih proteina kompleksom 26S proteazoma i oslobađanje slobodnog, ponovno upotrebljivog Ub

- **MONOUBIKVITINACIJA**- vezivanje jednog molekula Ub (ciljni proteini za proces endocitoze, usmeravanje proteina ka membrani, popravke DNK, regulacija funkcije histona)
- **MULTIUBIKVITINACIJA**- vezivanje više pojedinačnih Ub za različite ostatke Liz na proteinu (proteini predodređeni za endocitozu)
- **POLIUBIKVITINACIJA**- formiranje polimernog lanca Ub molekula dodavanjem Ub na već prethodno vezan Ub (ostatak Liz 48) (prvenstveno za proteazomalnu razgradnju)

UBIKVITINACIJA

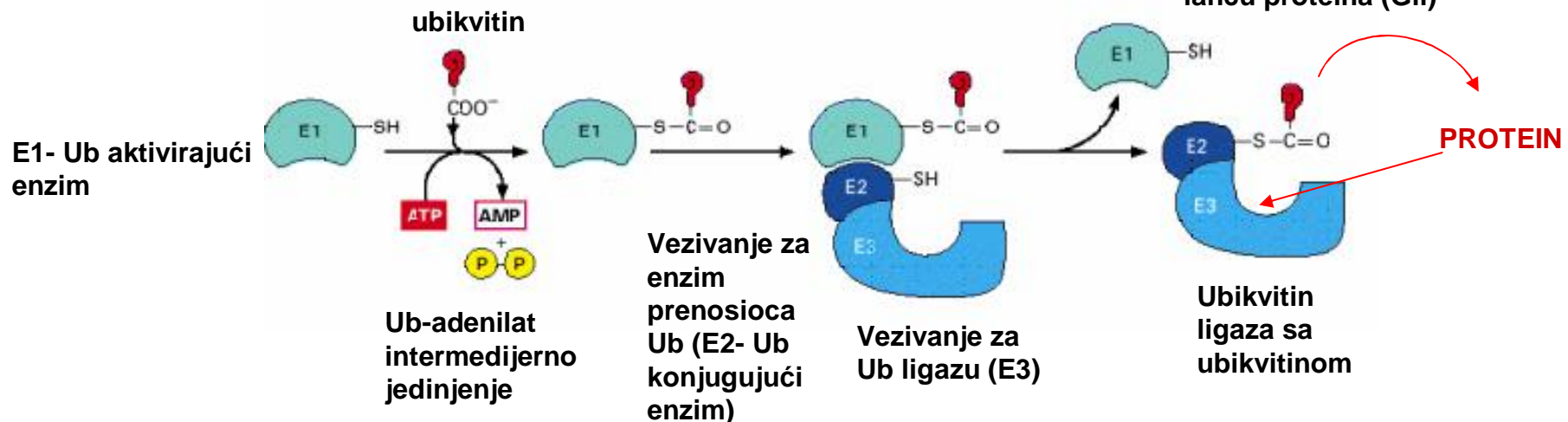
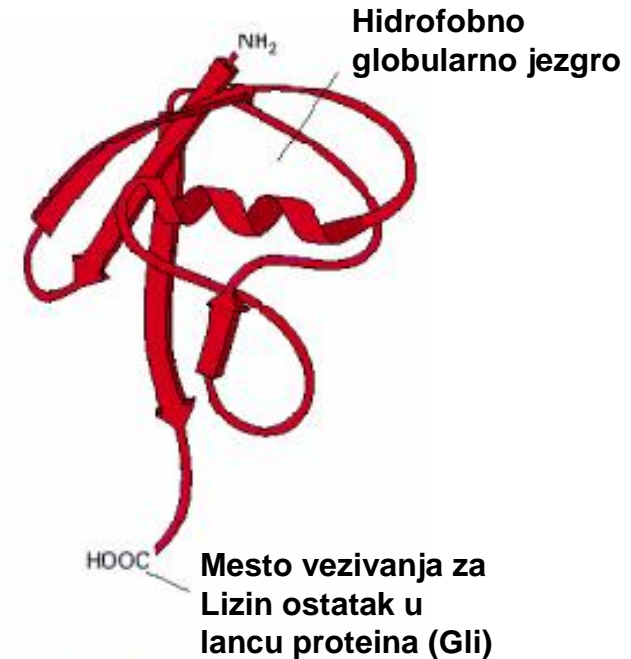
Ciljni proteini se prepoznaju preko **N-terminalnog kraja** (destabilišuće i stabilisuće amino kiseline kao terminalni signali očuvani tokom evolucije i identični u sistemima za razgradnju bakterijskih proteina i proteina u ubikvitin-proteazomskom sistemu. Oni određuju dužinu života proteina).

Oni se isto mogu prepoznati po različitim **elementima postranslacione modifikacije** -fosforilacija, asocijacija sa drugim proteinima npr šaperonima...

Može postojati i tzv **destrukciona sekvenca** koju poseduju neki proteini.

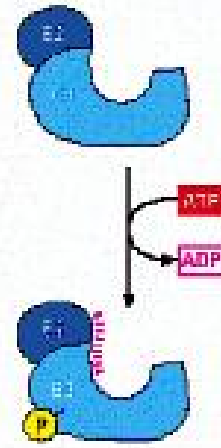
UBIKVITIN I OBELEŽAVANJE PROTEINA SA POLIUBIKVITINSKIM LANCEM

- A) Trodimenzionalna struktura ubikvitina (76AK)
- B) C terminalni kraj Ub se aktivira formiranjem visokoenergetske tioesterske veze sa bočnom grupom cisteina na proteinu E1. Za ovu reakciju je neophodan ATP i kao intermedijer nastaje AMP-Ub. Aktivirani Ub na E1 (Ub aktivirajući enzim) se tada prenosi na cistein E2 molekula. Set E2 postoji kao kompleks sa još većom familijom E3.
- C) Nastali E2-E3 kompleks prepoznaje signal za razgradnju na ciljnom proteinu.

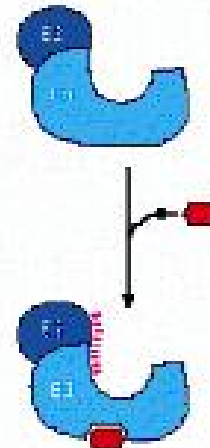


Proteazomi

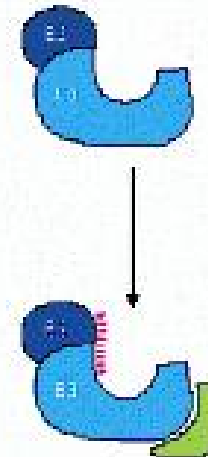
DVA NAČINA INDUKCIJE RAZGRADNJE SPECIFIČNOG PROTEINA



Fosforilacija
protein kinazom

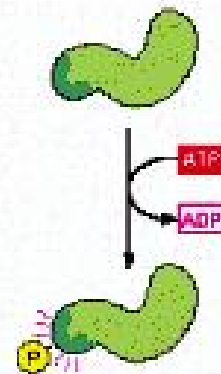


Alosterna modifikacija
uzrokovana vezivanjem
liganda

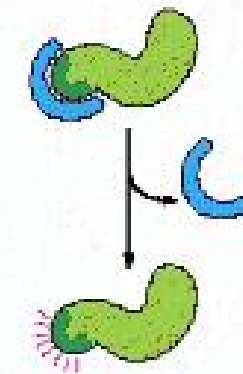


Alosterna modifikacija
uzrokovana adicijom
proteinske subjedinice

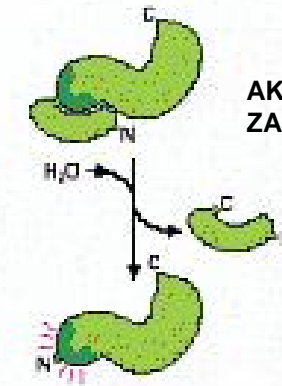
AKTIVACIJA
UBIKVITIN LIGAZE



Fosforilacija
protein kinazom



Demaskiranje
disocijacijom proteina

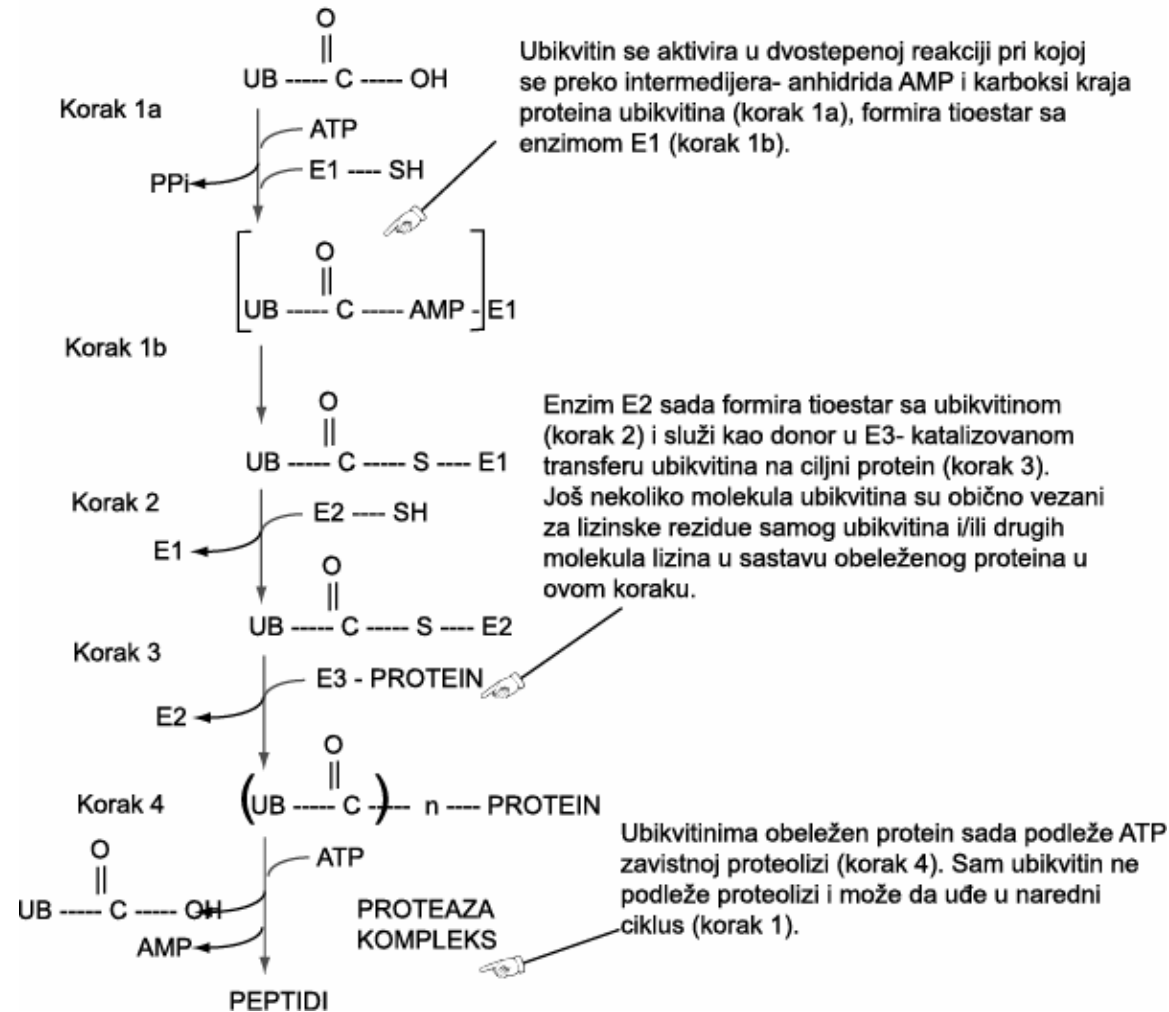


Stvaranje
destabilizujućeg N-kraja

AKTIVACIJA SIGNALA
ZA RAZGRADNJU

Proteazomi

ATP zavisna degradacija proteina obeleženih ubikvitinom

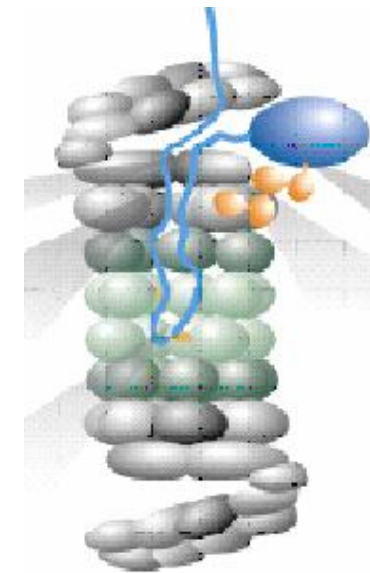


Proteazomi

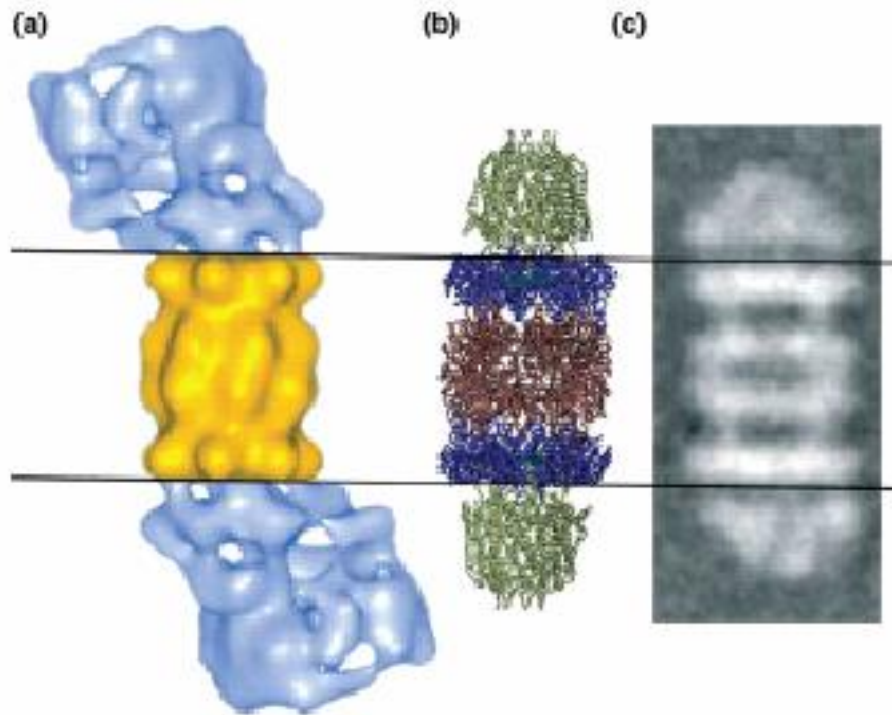
Ø26S proteazom je glavna **ne-lizozomalna proteaza** u ćelijama eukariota. To je kompleks sastavljen iz većeg broja subjedinica i smešten je u citosolu.

Ø26S proteazom je cilindrična proteaza koja se sastoji iz 20S proteolitičkog jezgra (sadrži šest aktivnih mesta) i dve 19S regulatorne čestice (kape) koje su zakačene za oba kraja 20S proteolitičkog jezgra (postavljaju iznad otvora 20S cilindra)

ØSubstrat (Ub-protein) ulazi u 20S proteolitičko jezgro pomoću otvarajućeg mehanizma, koji kontrolišu 19S delovi. Ova kontrola obezbeđuje specifičnost za Ub-proteinske supstrate



Proteazomi



Proteazom aktivirajući kompleks

Horizontalne linije ocrtavaju krajeve 20S proteolitičkog jezgra u ovom kompleksu.

- a) Struktura dobijena na krioelektronskom mikroskopu
- b) kristalna struktura proteazomskog kompleksa
- c) Negativ elektronske mikrografije proteazomskog kompleksa

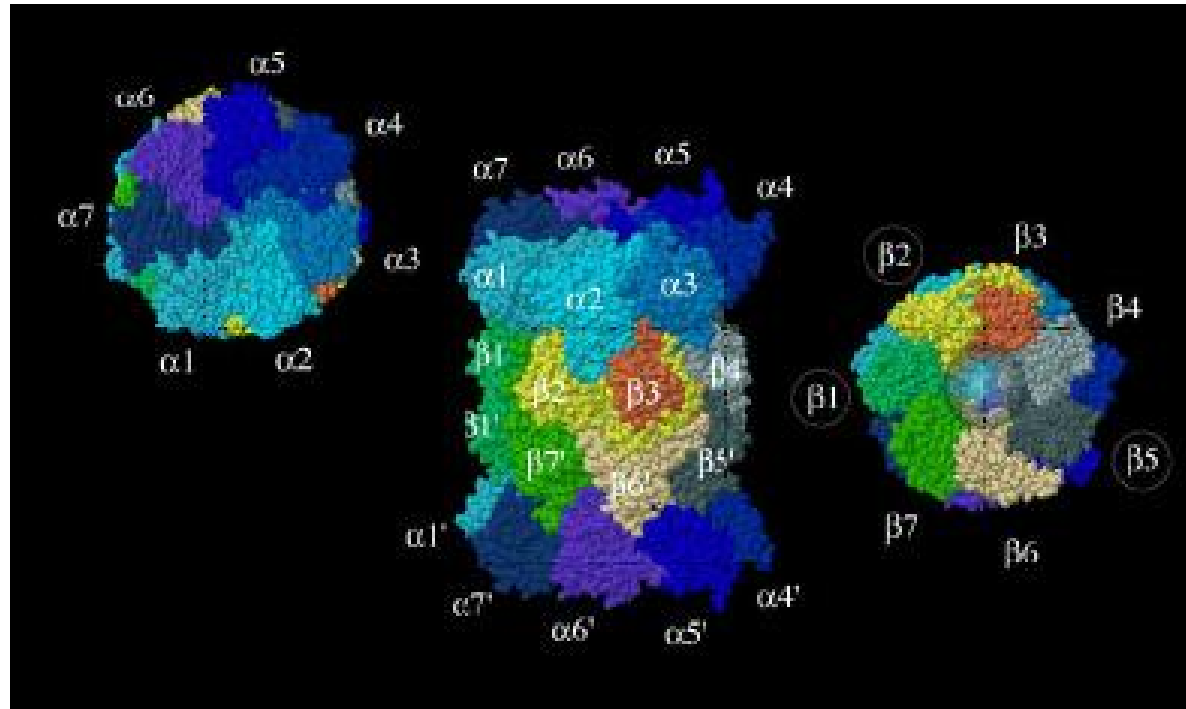
Ove slike pokazuju da je 20S proteolitičko jezgro vezano za aktivatore na oba svoja kraja. Postoji mogućnost vezivanja aktivatora i samo za jedan kraj.

STRUKTURA

20S deo kompleksa proteazoma je uzgrađen od α i β subjedinica. U humanom 20S proteolitičkom jezgru (proteazomu) po dve kopije od svih **sedam različitih α** i **sedam različitih β** tipova subjedinica su povezane i formiraju niz od četiri sedmočlana prstena, dajući **opštu strukturu $\alpha 1-7, \beta 1-7, \beta 1-7, \alpha 1-7$** . Znači, cilindričnu šupljinu 20S kompleksa formiraju ova četiri prstena. Uz pomoć imunoelektronske mikroskopije i hemijskog unakrsnog povezivanja susednih subjedinica, definisan je položaj svake pojedinačne subjedinice u proteazomu.

Cilindar 20S sadrži centralni kanal sa tri velike šupljine: jednom centralnom i dve spoljašnje. Ova centralna šupljina ima proteolitički aktivna mesta (u $\beta 1, \beta 2$ i $\beta 3$ subjedinicama).

Proteazomi



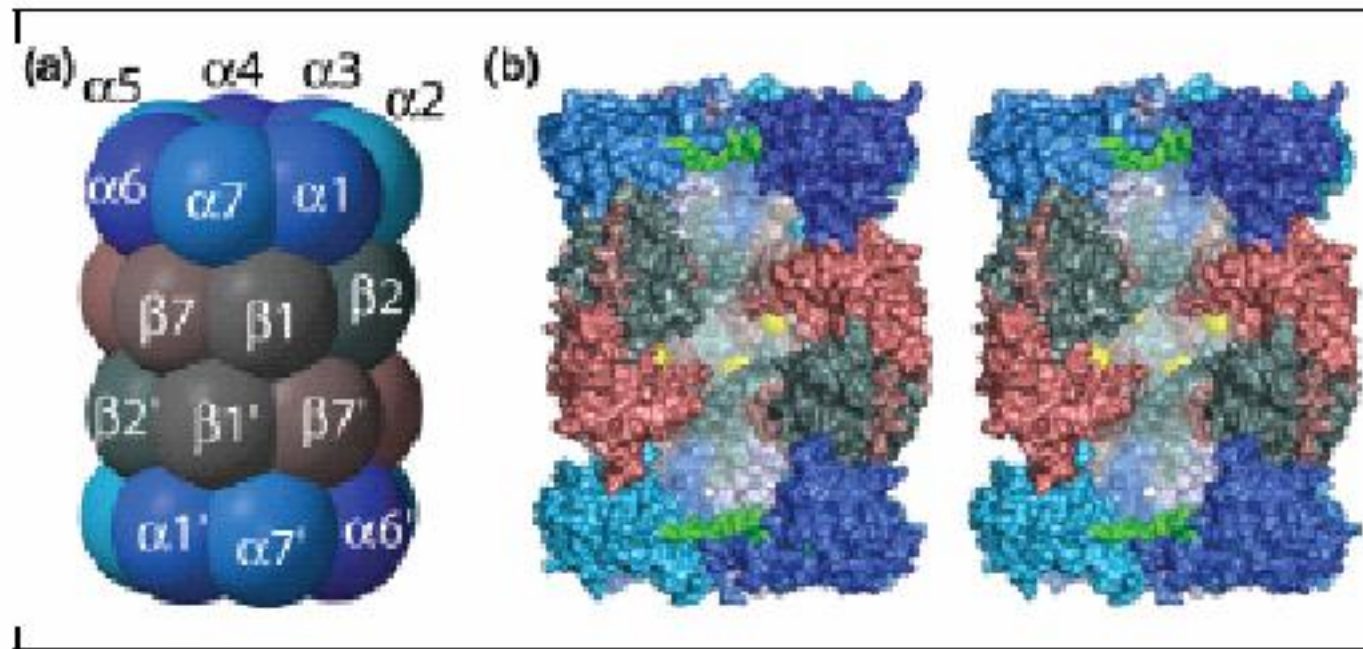
Struktura jezgra 20S kompleksa. 20S proteazom je sastavljen od nanizana 4 prstena pri čemu je svaki sastavljen od 7 subjedinica. Dva spoljašnja prstena su sastavljena od 7 različitih α subjedinica (levi deo slike, pogled odozgo), dok su dva unutrašnja prstena sastavljena od 7 različitih β subjedinica (desni deo slike, pogled iz centra).

Aktivna mesta se nalaze unutar centralnog dela (zasenčeni prsten) proteazoma 20S, na subjedinicama $\beta 1$ /Pre3, $\beta 2$ /Pup 1, i $\beta 3$ /Pre2.

ARHITEKTURA 20S PROTEOLITIČKOG JEZGRA (PROTEAZOMA).

a) predstavlja bočni prikaz proteazoma. Aktivno mesto se formira na N krajevima $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 5$. Afiniteti supstrata prema aktivnim mestima su: $\beta 1$ -PGPH supstrat, $\beta 2$ – tripsin like supstrat, $\beta 5$ –himotripsin like supstrat.

Poprečni presek pokazuje kako su aktivna mesta (žuto) izdeljena (iseckana) unutar centralne katalitičke šupljine. Supstrati i proizvodi prolaze kroz otvor koji se naziva α -prsten (zeleno) kroz sredinu prstena α subjedinice



STRUKTURA

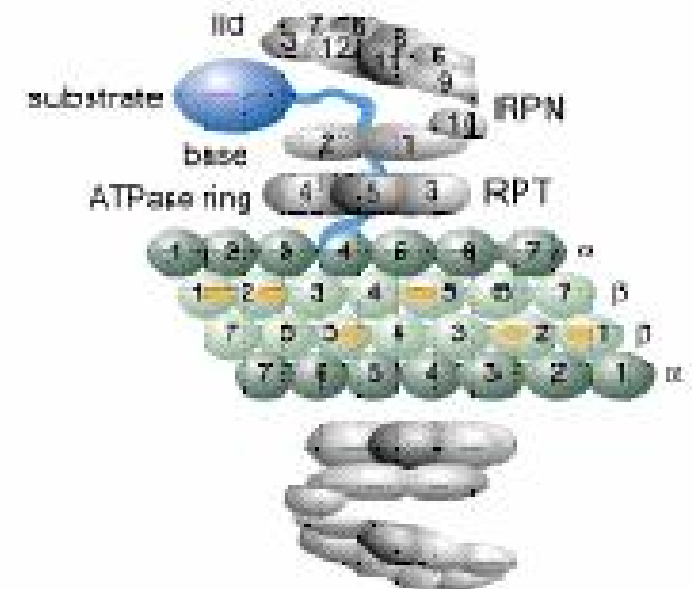
19S deo kompleksa obezbeđuje zavisnost od ATP-a i specifičnost za Ub-proteinske supstrate. Može se razdvojiti na 2 dela: **bazu** i **poklopac**.

Baza se sastoji iz 6 ATP-aznih i ne ATP-aznih subjedinica. Preko ovih regiona 19S kompleks inteeaguje sa 20S čime je omogućen pristup supstrata unutrašnjosti 20S kompleksa. Za razliku od šaperona koji učestvuju u savijanju proteina, baza 19S može da razmotava protein pre nego ga translocira u jezgro 20S.

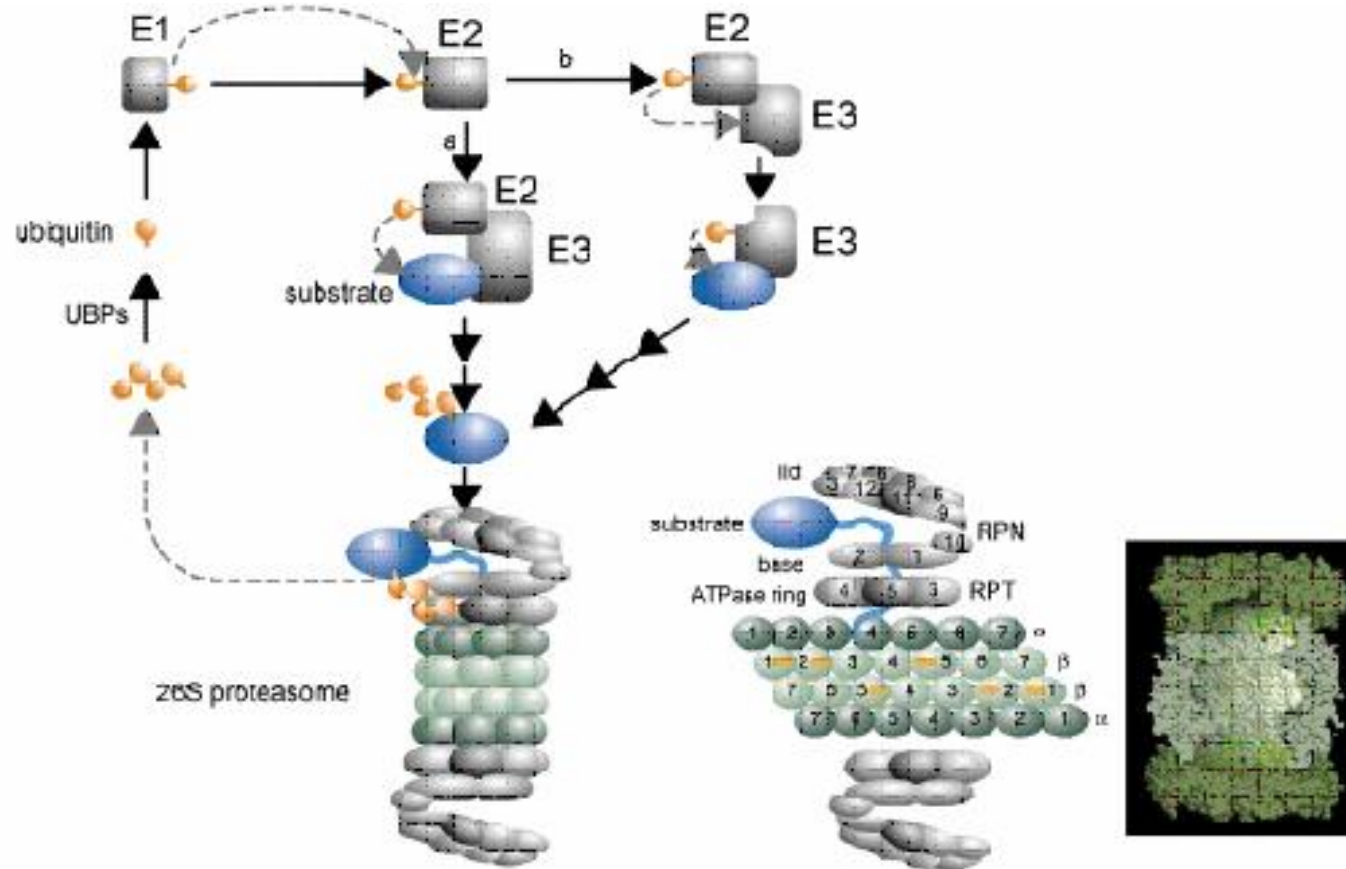
Ne ATP-azna subjedinica n10 (RpnS5) je najznačajnija subjedinica 19S jer je uključena u vezivanje i pokretanje poliUb konjugata u 26S proteazom i za koju je jedino dokazano da vezuje poliUb konjugate proteina.

Tek nakon vezivanja **baze** sa RpnS5a i kompleksom subjedinica koje čine **poklopac** nastaje kompleks koji može da razgradi poliUb supstrate.

Poklopac 19S se sastoji od 8 ne-ATP-aznih subjedinica i povezan je sa bazom preko različitih Rpn subjedinica. Neophodan je za vezivanje poliUb-supstrat kompleksa pre njegove degradacije.

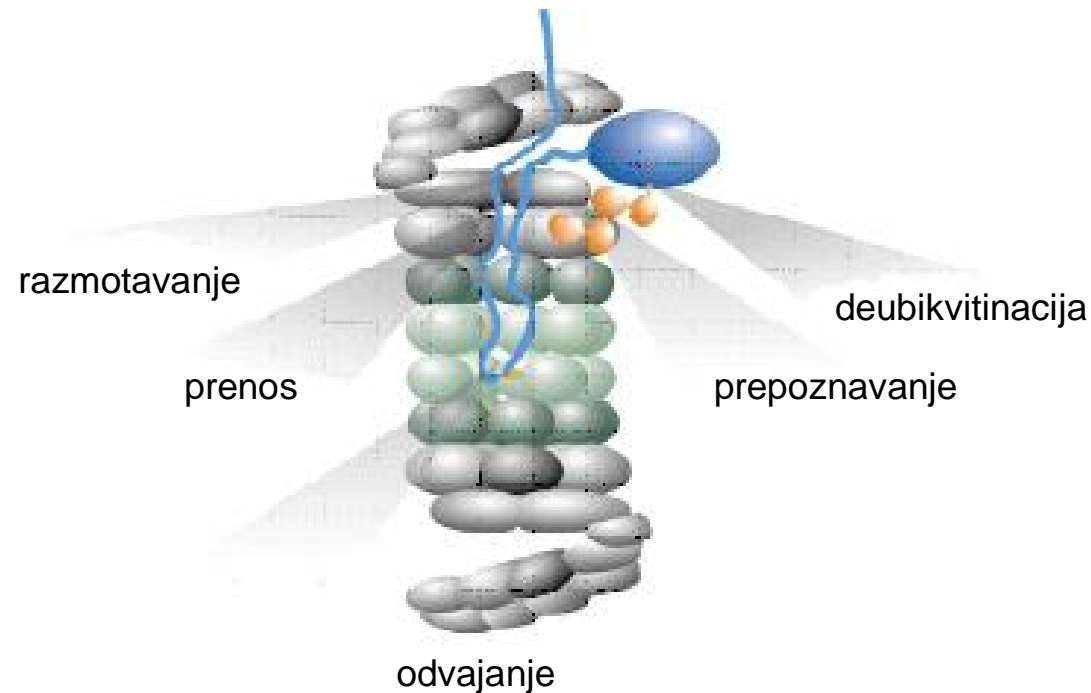


Proteazomi



Ubikvitin-proteazomski sistem. Obeležavanje proteazomskog supstrata se ostvaruje koordinisanom aktivnošću **E1 aktivirajućeg ubikvitinskog enzima**, **E2 ubikvitin konjugujućeg enzima** i **E3 ubikvitin ligaze**. Ovako poliubikvitirani supstrat prepoznaje 19S kraj proteazoma 26S koji može da disocira na poklopac i na bazni deo. 19S deo je sastavljen iz 11-12 RPN i 6 RPT (ATP-aze) subjedinica. Supstrat se definitivno razgrađuje proteolitičkom aktivnošću 20S proteazomskog jezgra koje formira 3 para β različitih subjedinica smeštenih u unutrašnjem prostoru proteazomskog cilindra.

Proteazomi



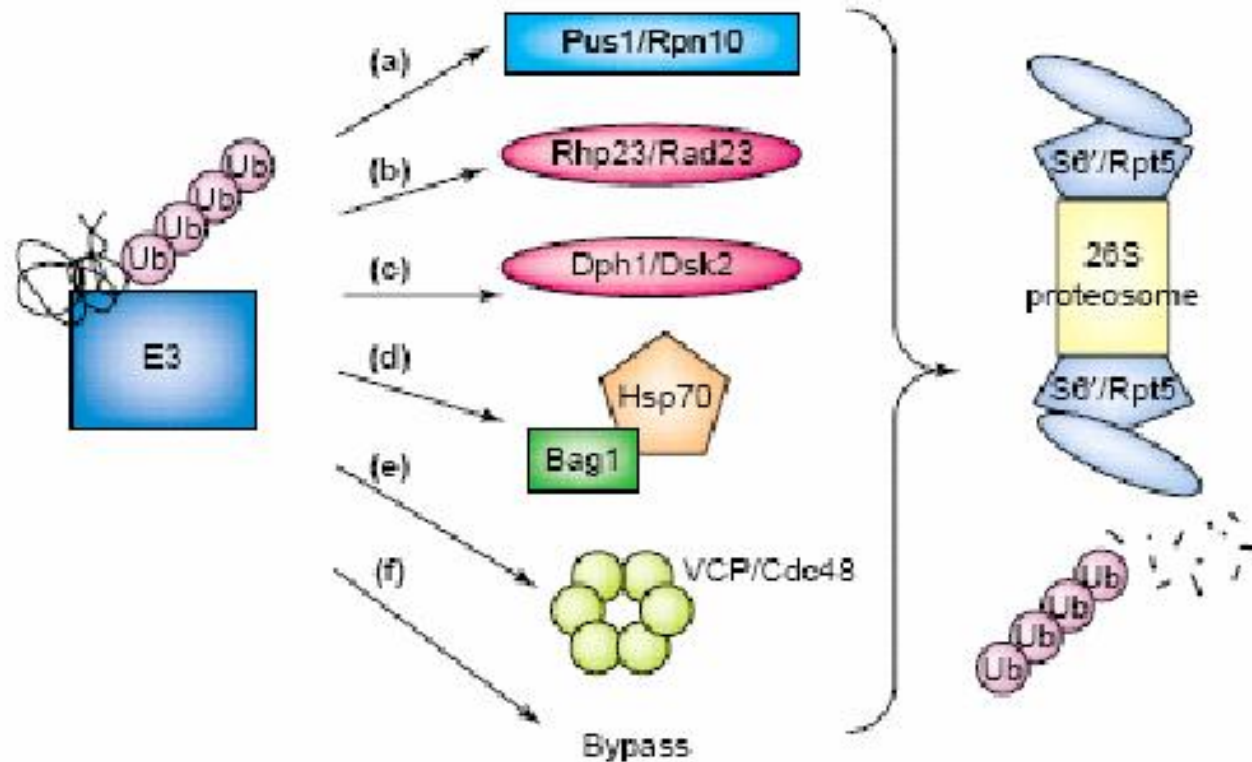
Supstrati se uglavnom prepoznaju poliubikvitinskom modifikacijom i vezuju se za 19S kraj proteazoma 26S. Supstrat se tada razmotava uz potrošnju energije ATP-a (6 ATP-aznih ostataka na osnovici 19S kraja) i tako razmotani supstrat se dalje prenosi u proteolitički prostor 20S jezgra. Tokom procesa prenosa (transmisije) poliubikvitinski marker se odvaja pomoću deubikvitinskih enzima.

ØSelekcija proteina se dešava pre nivoa 26S proteazoma

ØDa bi došao do aktivnog mesta, supstrat se razmotava i obrađuje prolaskom kroz uzane otvore. Po translokaciji polipeptida u proteolitički deo, supstrat se razgrađuje na peptide i proteoliza se nastavlja dok ne nastanu dovoljno mali fragmenti koji mogu difuzijom da napuste česticu (kroz uske pore na krajevima kompleksa). Ub se regeneriše specifičnim enzimima deubikvitinacije (DUB ili E4- C-terminalne hidrolaze ili izopeptidaze koje su delovi 19S kompleksa). Kao i Ubikvitinacija i proteazomima katalisana razgradnja proteina je ATP-zavistan proces.

ØProteazom uglavnom potpuno razgradi supstrate na male peptide, ali u nekim slučajevima prilikom razgradnje mogu nastati biološki aktivni fragmenti proteina. Tako na primer, proteazomalnom obradom odgovarajućeg prekursora nastaju transkripcioni faktori NF- κ B, Spt23p i Mga2p.

Proteazomi



Mogući putevi kontrole prenosa supstrata u 26S proteazom. Kada se poliubikvitirani (Ub) supstrat prenese sa E3 na 26S proteazom da bi se razgradio, on može ući u jedan od mogućih puteva. a) Pus1/Rpn10 direktno prepoznaju supstrat. Alternativno, prepoznavanje supstrata može da bude posredovano multi ubikvitin-proteazom vezujućim proteinom (b) ili (c). d) pogrešno oblikovani supstrati mogu biti ubikvitirani E3 enzimom i pomoću šaperona Hsp70 predati proteazomu preko vezujućeg proteina Bag1. e) Prstenasta struktura ATP-aznog kompleksa može da razbije ubikvitinirani protein i preda ga proteazomu 26S. f) neke E3-ubikvitin protein ligaze vezuju 26S proteazom i mogu da predaju svoj supstrat direktno za razgradnju. Konačno, neki proteini kao što je ornitin dekarboksilaza podležu brzom proteazom zavisnoj ali ubikvitin nezavisnoj hidrolizi što ukazuje da neki proteini mogu biti prepoznati od strane proteazoma na neki drugi, alternativni način.

REGULACIJA AKTIVNOSTI I LOKALIZACIJA 26S PROTEAZOMA

Kontrola brzine razgradnje proteina

Brzina sastavljanja i rastavljanja 26S proteazoma

Regulacija ATP-aznih aktivnosti pojedinih subjedinica kompleksa

U regulaciju aktivnosti i lokalizaciju 26S proteazoma su uključene:

1. Interakcije sa proteinima virusa, jedarnim Receptorima za hormone i transkripcionim faktorima-uključene u regulaciju aktivnosti 26S ili 20S čestica
2. Interakcije sa nekim drugim proteinima-mogu da povećaju koncentraciju 26S čestica u ćelijskim odeljcima bliskih ćelijskim organelama.

ULOGE 26S PROTEAZOMA

Virusi:

Manipulišu sa proteazomalnim sistemom domaćina- šalju proteine ćelije domaćina u proteazomalni sistem, suprimiraju obradu i prezentovanje antigena...

To im omogućava da uspešno kompletiraju svoj životni ciklus (adenovirusi, HIV, paramixovirus, Coxaki, ebola, retrovirus...)

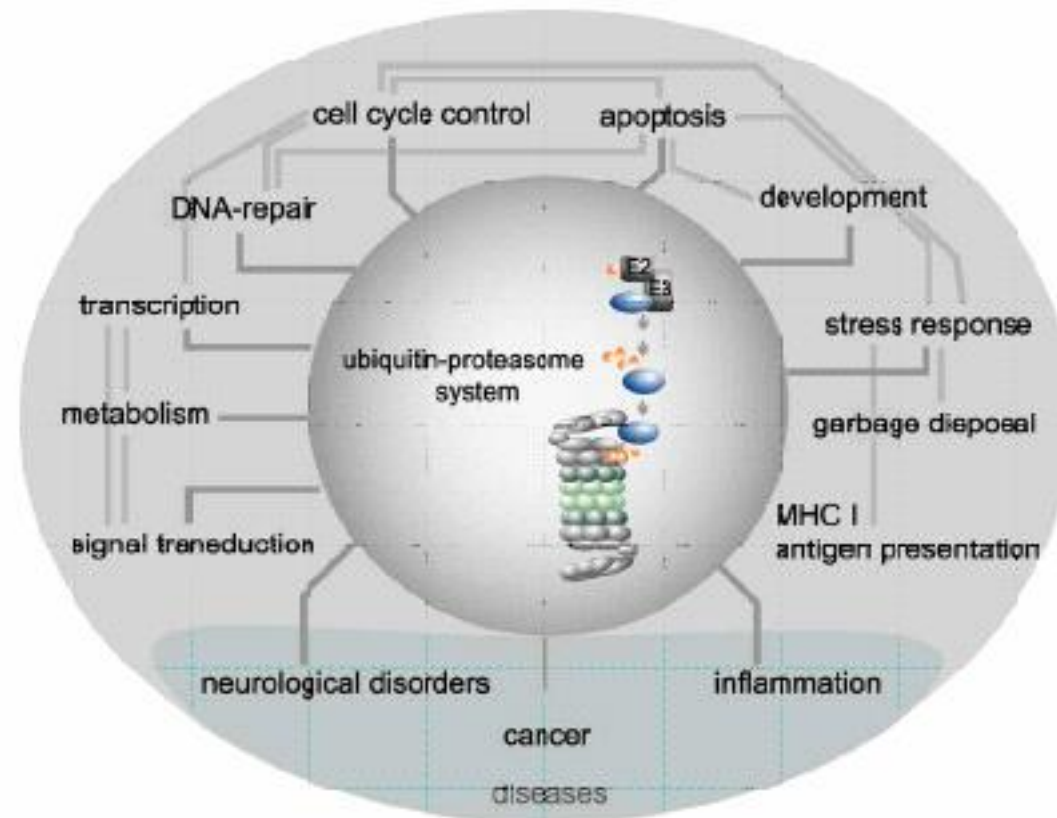
Interakcije sa receptornim proteinima:

Interakcija sa receptorima za hormone reguliše aktivnost proteazoma. Članovi jedarne familije receptora reaguju sa ATP-azom proteazoma. Moguće je da ovo pojačava aktivnost 26S kompleksa u proteolizi proteina regulatora transkripcije koji ćeliji više nisu potrebni. Takođe, ove interakcije doprinose smeštanju 26S u određene ćelijske odeljke: na periferiju jedra, mitotska vretena, unutrašnju stranu plazma membrane...

ULOGE 26S PROTEAZOMA

- Kontrola kvaliteta proteina- sprečava se nagomlavanje štetnih proteina (sintetisani, stari, ili već u toku sinteze). Etiopatogeneza neurodegenerativnih bolesti
- Kontrola ćelijskog ciklusa- pojavljivanje i iščezavanje aktivnih kinaznih kompleksa u toku raznih faza ćelijskog ciklusa je pod kontrolom CIKLINA. Ciklini B tipa kontrolišu fazu S G i M, a ratgrađuju se u Ub-proteazom sistemu
- Prezentacija antigena- virusna infekcija (MHCI klasa)
- Razgradnja proteina u Endoplazmatskom Retikulumu- EPR kontrola kvaliteta

Proteazomi



Uloge ubikvitin proteazomskog sistema u ćeliji. Kontrolisana razgradnja proteina pomoću ubikvitin proteazomskog sistema ima ključnu ulogu u mnogim esencijalnim ćelijskim procesima. Ovi procesi su međusobno visoko povezani tako da greška u proteazomalnoj aktivnosti dovodi do poremećaja celokupne mreže funkcija i procesa u ćeliji. Time su poremećaji u ubikvitin proteazomalnoj aktivnosti uzrok patoloških stanja i bolesti.

POREMEĆAJI FUNKCIONISANJA PROTEAZOMA

Unutarćelijska razgradnja proteina-poljubac smrti: mišićna degeneracija, Alchajmer-ova bolest, Parkinson-ova bolest, Huntington-ova bolest, kancer.

Urođena oboljenja-cistična fibroza (delecija 1AK, fenilalanin na ATP veznom domenu proteina koji je kanal za jone Cl-)

Neurodegenerativna oboljenja- Wilsonova bolest (problem u EPR kontroli kvaliteta), Prionske bolesti

PRIONSKE BOLESTI

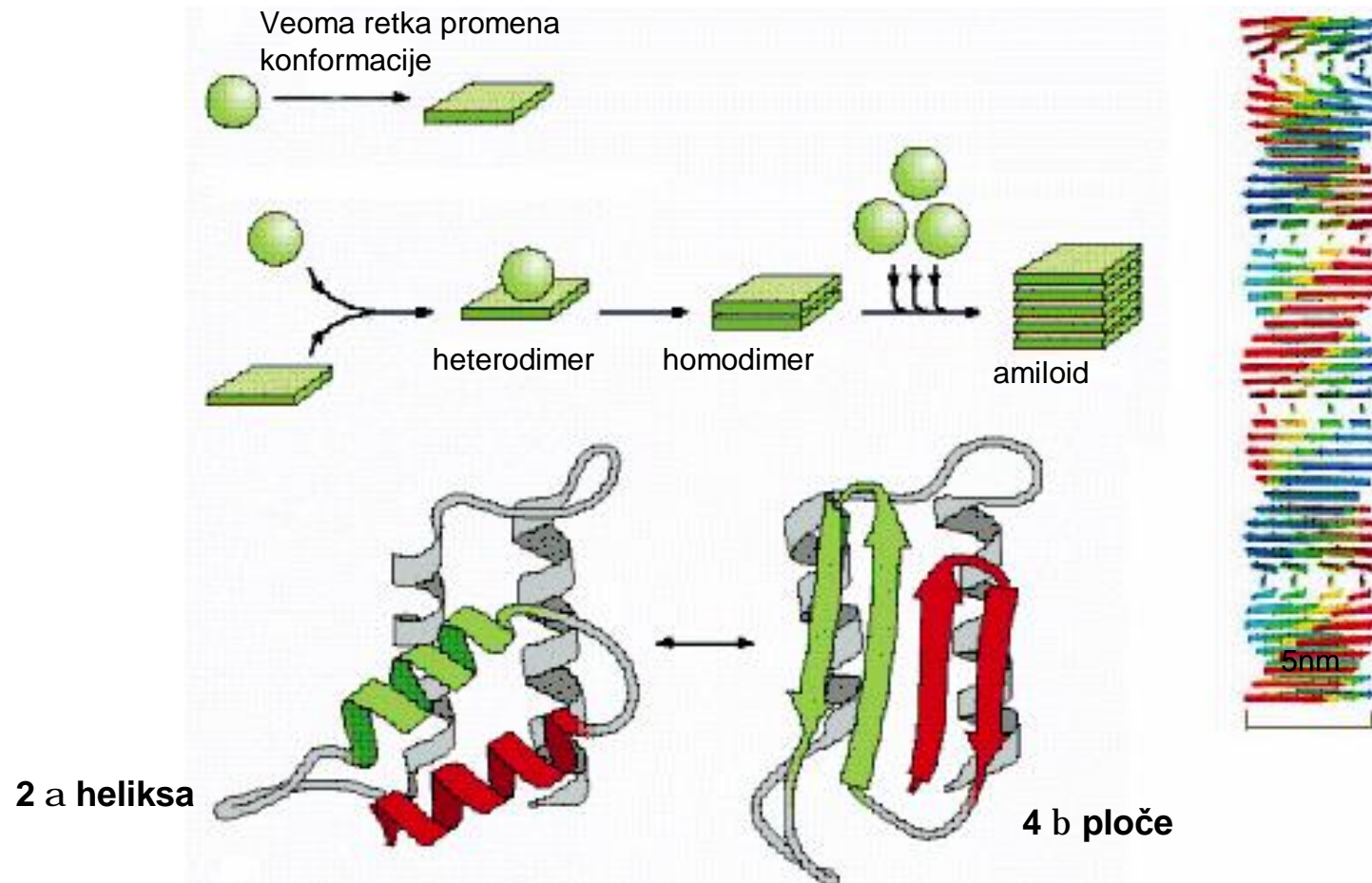
Mogu da se prenose sa jednog organizma na drugi (unošenje ishranom)

Nastaje zbog pogrešno uvijenog proteinskog agregata PrP (Prion Protein) koji se normalno nalazi na spoljašnjoj površini plazma membrane. Funkcija mu je nepoznata.

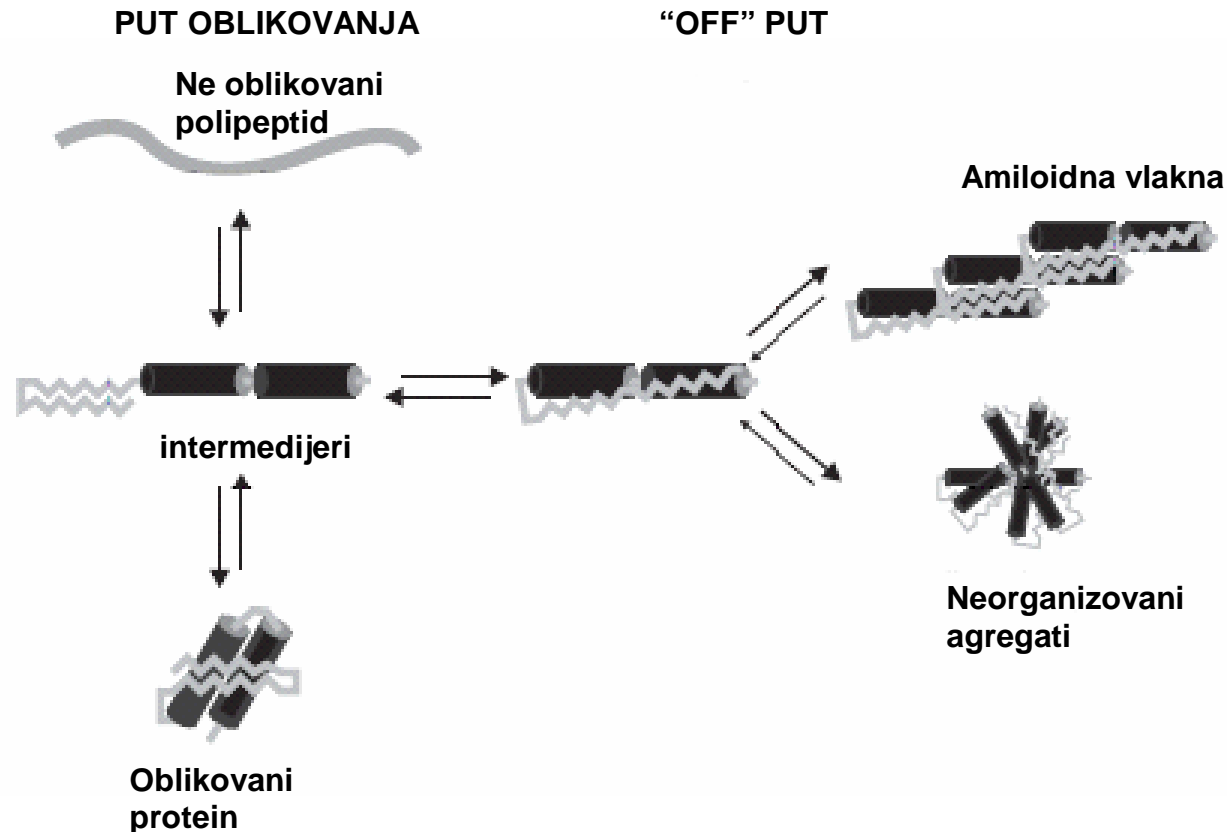
Ali, PrP može da se konvertuje u nenormalan oblik koji je proteaza rezistentan i u obliku beta filamenata unakrsno povezanih. On može da indukuje prevođenje PrP u nenormalnu formu PrP*. Na ovaj način se infekcija širi sa ćelije na ćeliju što na kraju dovodi do smrti.

Na sreću, u odsustvu PrP*, normalan PrP je gotovo nemoguće prevesti u nenormalnu formu.

PROTEINSKI AGREGATI KOJI DOVODE DO BOLESTI



Proteazomi



Oblikovanje i agregacija proteina. Prilikom zauzimanja native konformacije, polipeptidni lanac od osnovne neformirane strukture prelazi kroz intermedijerne oblike do zauzimanja definitivne, zrele konformacije. Kao sporedna reakcija, **nagomilani intermedijeri mogu da se povezuju u nefunkcionalne agregate**. Ova agregacija može da bude predstavljena oligomerizacijom ne-nativnih intermedijera u amiloidne fibrile (vlakna), što se i dešava u mnogim neurodegenerativnim bolestima, ili može da dovede do nastanka amorfnih neorganizovanih agregata.

ZAKLJUČAK

Krajnja destinacija većine proteina u eukariotskim ćelijama koji treba selektivno da se razgrade je **proteazom**, visokosofisticirana nanomašina esencijalna za život. **26S proteazomi** vrše izbor ciljnog proteina njegovom prethodnom modifikacijom sa poliubikvitinskim lancem ili u ređim slučajevima, prepoznavanjem specifičnih motiva. Proteazomi su sačinjeni od različitih subkompleksa, **20S proteazomskog jezgra** koje sadrži proteolitički aktivna mesta skrivena unutar strukture nalik na bure i dva **19S kraja** koji pokazuju regulatornu funkciju. Slični kompleksi koji sadrže PA28 regulatorne subjedinice umesto 19S capa su varijacije koje su specijalizovane za produkciju antigenih peptida koji su neophodni za imuni odgovor.

Analize strukture kao i ekstenzivne biohemijske i genetske studije proteazoma 26S i ubikvitinskog sistema su dovele do osnovnog modela prepoznavanja supstrata i njegove razgradnje. Novi koncept podrazumeva dodatne faktore uključene u sakupljanje supstrata i njegovu predaju proteazomu. Takođe, shvaćena je uloga pojedinačnih subjedinica ili subkompleksa 19S delova u prepoznavanju supstrata, vezivanju i oslobađanju i recikliranju poliubikvitinskog dela.