

PROTEINSKA RAZGRADNJA

- pretvorba številnih encimov poteka v vsaki celici
- razpolovna doba proteinov v celicah jeter: $t_{1/2} = 15 \text{ min} - 100 \text{ ur}$
- mehanizem: preko proteaz - proteoliza
- smiselnost razgradnje v primerjavi s sintezo?
- prilagajanje okolici
- odstranjevanje abnormalnih proteinov
- daljša je življ. doba celice bolj pomembna je pretvorb encimov
 - *E. coli* → celica se deli vsake 20 min
 - Celica jeter → številni encimi se popolnoma zamenjajo v nekaj dnevih
- nivo encima je v ravnotežju: sinteza \rightleftharpoons razgradnja
- mehanizem sinteze bolj poznan kot mehanizem razgradnje

Kinetika encimske pretvorbe

- Pretvorba encima sledi kinetiki prvega reda:
- Proces encimske sinteze sledi kinetiki ničelnega reda.
- V ravnotežju sta obe hitrosi enaki:
- Če se hitrost sinteze ali razgradnje spremeni se spremembe v encimski koncentraciji preučujejo:
- Bolj uporaben izraz za merjenje hitrosti razpada encima:

$$v = k [E]$$

$$\frac{dE}{dt} = k_s - k_d [E] \quad k_s = k_d [E]$$

k_s , hitrostna konstanta encimske sinteze

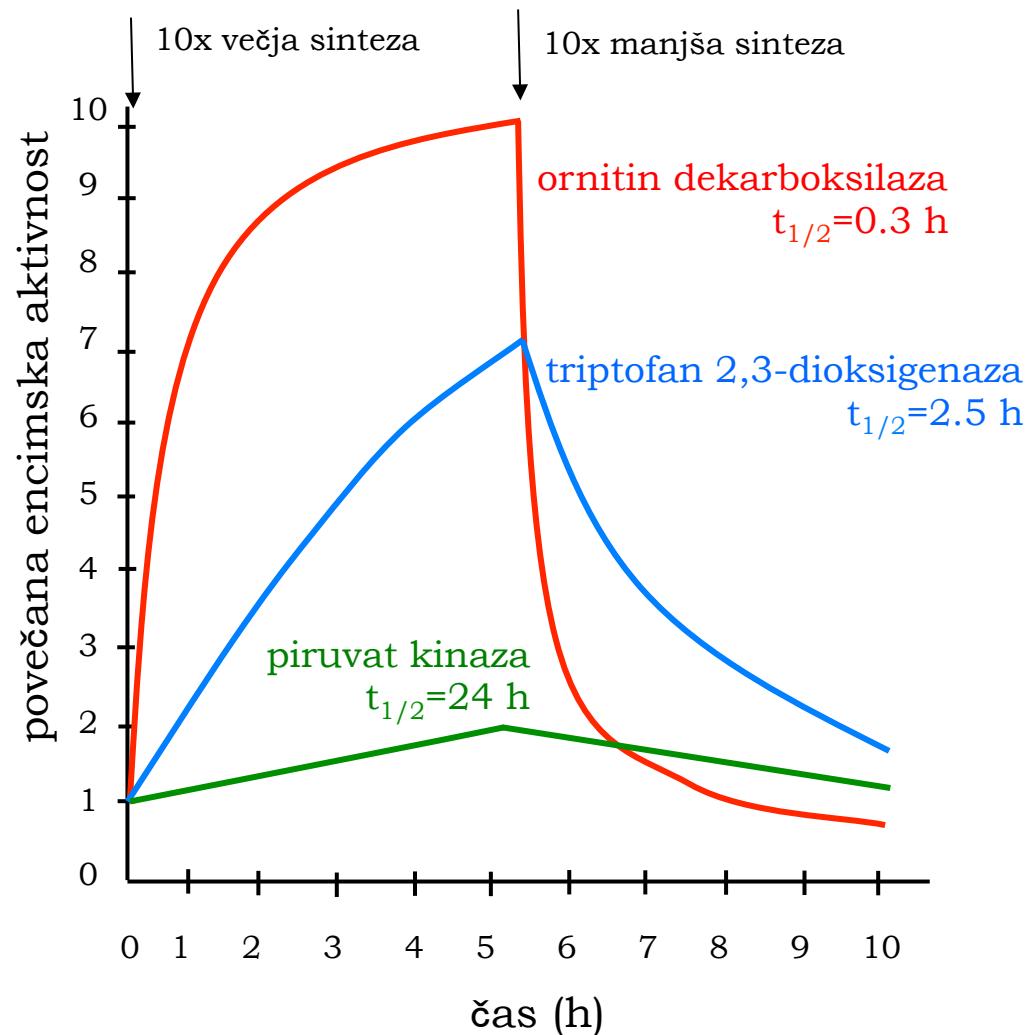
k_d , hitrostna konstanta encimske razgradnje

$$\frac{[E_t]}{[E_0]} = \frac{k'_s}{k'_d [E_0]} - \left(\frac{k'_s}{k'_d [E_0]} - 1 \right) e^{-k'_d t}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} = \frac{0.693}{k_d}$$

Primer razpolovnih časov encima: vzpostavitev ravnotežja

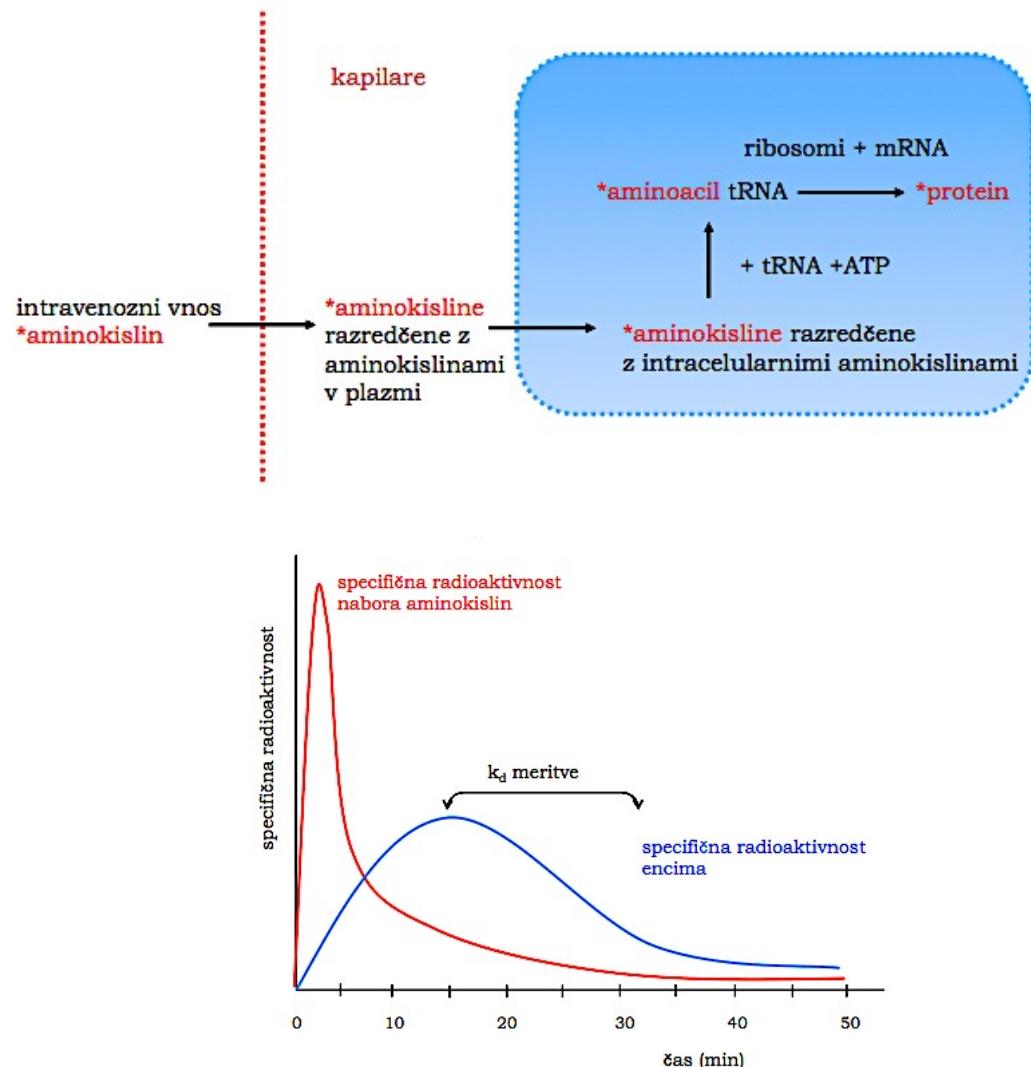
- prikaz vzpostavljanja ravnotežja
 - 10x večja sinteza encima
 - po 10x manjša sinteza
(vračanje v prvotno stanje)
- encim z najkrajšo $t_{1/2}$ se najhitreje odzove
- encimi z daljšo razpolovno dobo se počasneje odzovejo



↓ $t_{1/2} \rightarrow$ hitrejši je odgovor → boljša kontrola novega stanja

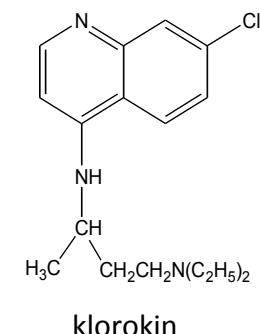
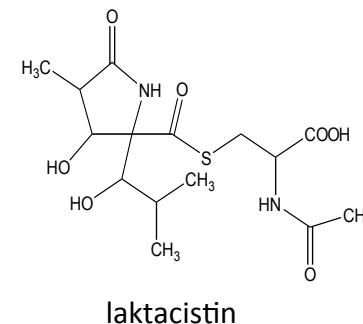
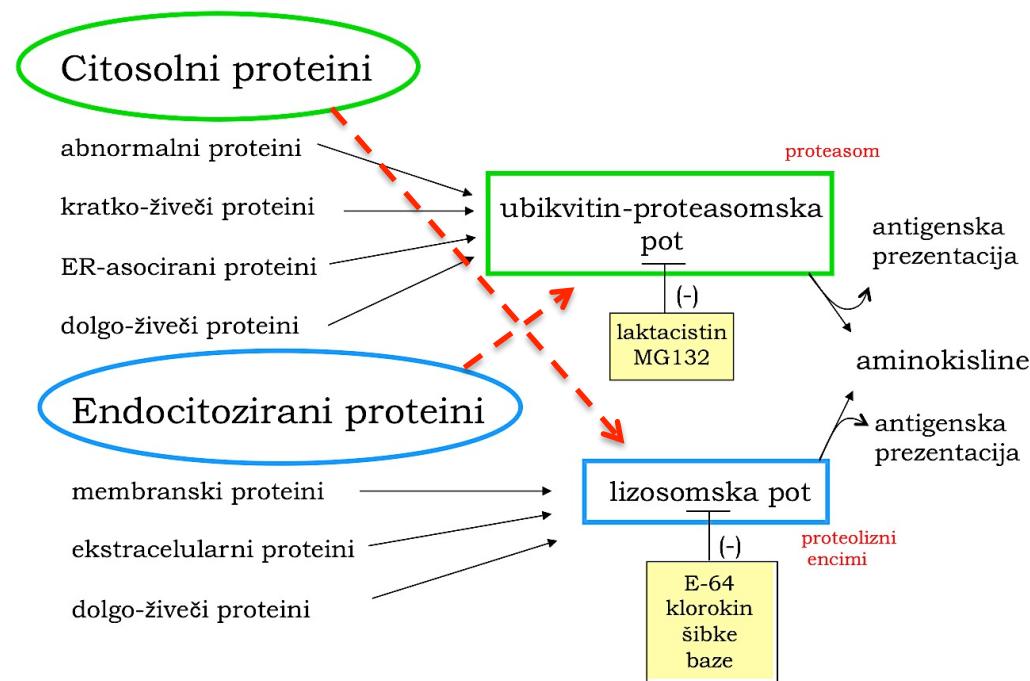
Metode spremljanja hitrosti encimske pretvorbe

- metode, ki so na razpolago omogočajo ugotavljanje spremembe koncentracije encima zaradi sinteze ali razgradnje
- meri se encimska aktivnost
- določanje k_s
 - z **radioaktivno označenimi ak**
 - določitev specifične radioaktivnosti ak ()glede na celotno količino ak
 - merjenje začetnih hitrosti (v krajših časovnih obdobjih)
- določanje k_d
 - tudi preko **radioaktivno označenih prekursorjev**
 - meri specifično aktivnost encima se v daljših časovnih obdobjih
 - **inhibiranje sinteze encima z antibiotikom (puromicin)**



Razgradnja proteinov

- Razgradnja zunanjih proteinov:
 - odvija v lumnu prebavil (Ser)
 - imunski odgovor
 - absorpcija ak
- Razgradnja lastnih proteinov
 - zunajcelični proteini preko nespecifične razgradnje v lizosomih (hormoni, Ig, proteini koagulacije krvi...)
 - lizosomska pot (1974 NN De Duve)
 - znotrajcelični proteini preko specifične razgradnje
 - nelizosomska pot → Ub-proteasomska pot (2004 NN Avram Hershko)
 - specifični inhibitorji obeh poti (laktacistin in klorokin)



Razpolovni časi encimov

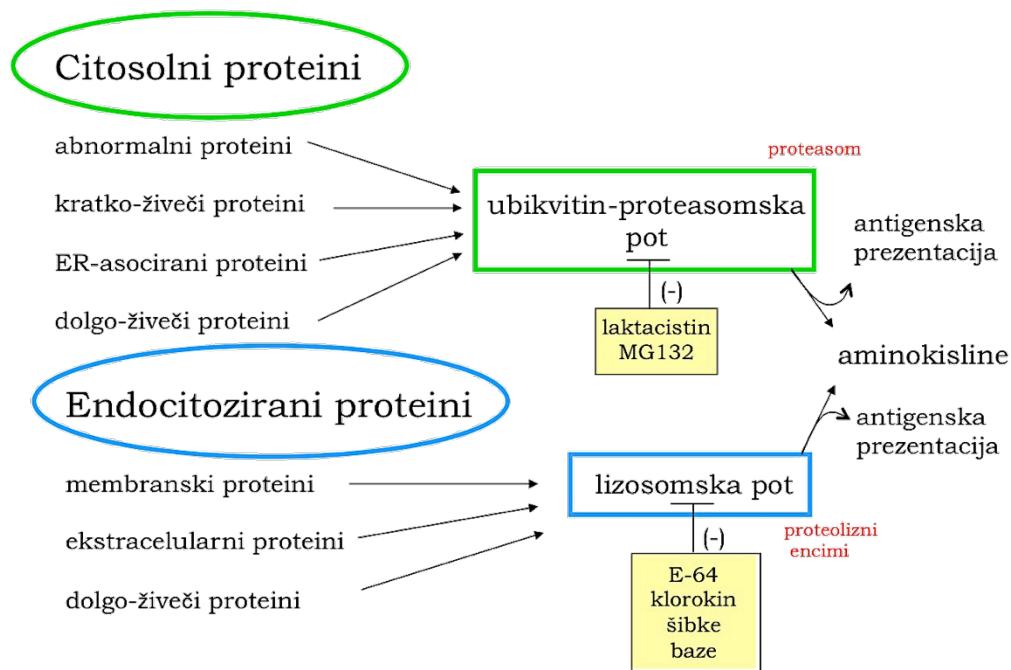
- določene hitrosti pretvorbe številnih encimov
- razpolovni časi variirajo od tkiva do tkiva
- Obstaja korelacija med $t_{1/2}$ in lastnostmi encima?
 - hidrofobnost
 - stabilnost
 - pl
 - S
 - efektor
 - koencim
- Aminokislinsko zaporedje?
- Kemijsko modificirani proteini?
- Mutirani proteini?
- Povezava s transkripcijskimi faktorji?
- Funkcija proteina?

encim	Razpolovni čas (h)
ornitin-dekarboksilaza	0.3
5-aminolevulinat sintaza	1.2
RNA-polimeraza I	1.3
tirozin -aminotransferaza	1.5
triptofan 2,3-dioksigenaza	2.0
timidin-kinaza	2.6
hidroksimetiglutaril-CoA reduktaza	4.0
serin dehidrataza	5.2
fosfoenolpiruvat-karboksikinaza	8.0
RNA-polimeraza II	13.0
glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza	24
glukokinaza	30
katalaza	33
acetil CoA-karbokislaza	50
gliceralehid-3-fosfat-dehidrogenaza	74
piruvat -kinaza	84
arginaza	108
fruktoza-bifosfat-aldolaza	117
laktat-dehidrogenaza	144
6-fosfofruktokinaza	168

encim	jetra	srce	skeletne mišice	ledvice	možgani
piruvat-kinaza	3.5	4.2	21.6	-	-
laktat-dehidrogenaza	1.8-3.8	3.7-9.9	3.0-8.5	3.0-5.0	3.0-7.2
ornitin-aminotransferaza	0.95	-	-	4.0	-
maščobne kisline - sintaza	6.4	-	-	-	2.8

Razpolovni časi encimov

- dolgoživeči encimi
 - $\uparrow t_{1/2}$ in so t.i. house keeping encimi
 - ne določajo hitrosti reakcije
 - razgradijo se v lizosomih.
- kratkoživeči proteini
 - prisotni v mnogo ↓ konc
 - razgrajujejo se po ekstralizosomalni poti
- ključni odkritji na tem področju
 - 1980 Hershko: ATP odvisna hidroliza vključuje konjugacijo proteinov z ubikvitinom (selektivna razgradnja)
 - 1980 Wilk&Orlowski: izolirala velik multikatalitični kompleks proteasom (neselektivna razgradnja)
- razgradnja proteinov je v resnici kontroliran proces

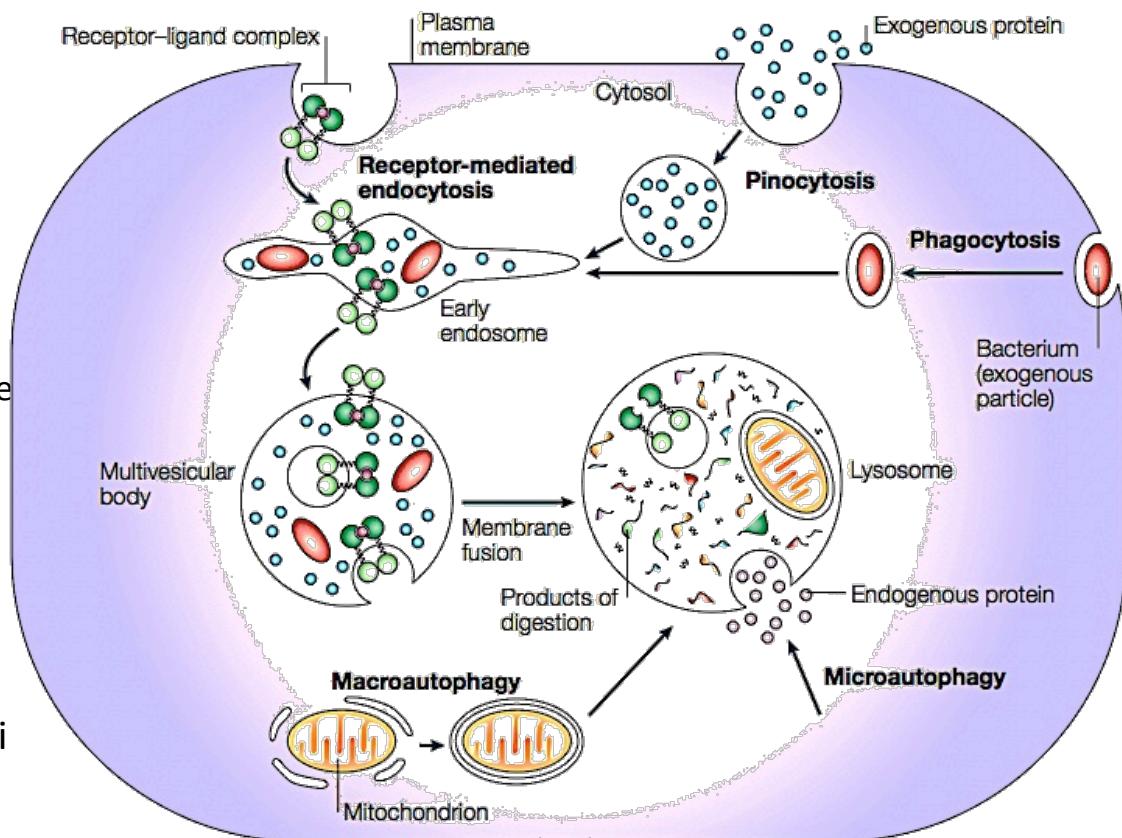


Lizosom

- vloga lizosomov
 - razgradnja makromolekul in poškodovanih c. komponent
 - sodeluje pri signalni transdukciji
 - sodeluje pri antigenski prezentaciji
- energija pri razgradnji proteinov
 - sinteza proteinov je energijsko zahtevna
 - proteoliza z energijskega stališča težko razumljiva
 - eksergoni proces
 - sproščeno energijo ne uporabijo encimi
 - indirektna uporaba sproščene energije
 - transport do lizosomov
 - vzdrževanje nizkega pH v lizosому
- vnos substrata v lizosom glede selektivnosti
 - neselektiven (mikroavtofagija)
 - selektiven
 - prepoznavni motiv KFERQ
 - endocitoza preko receptorjev
 - fagocitoza
 - memb. proteini označeni z Ub

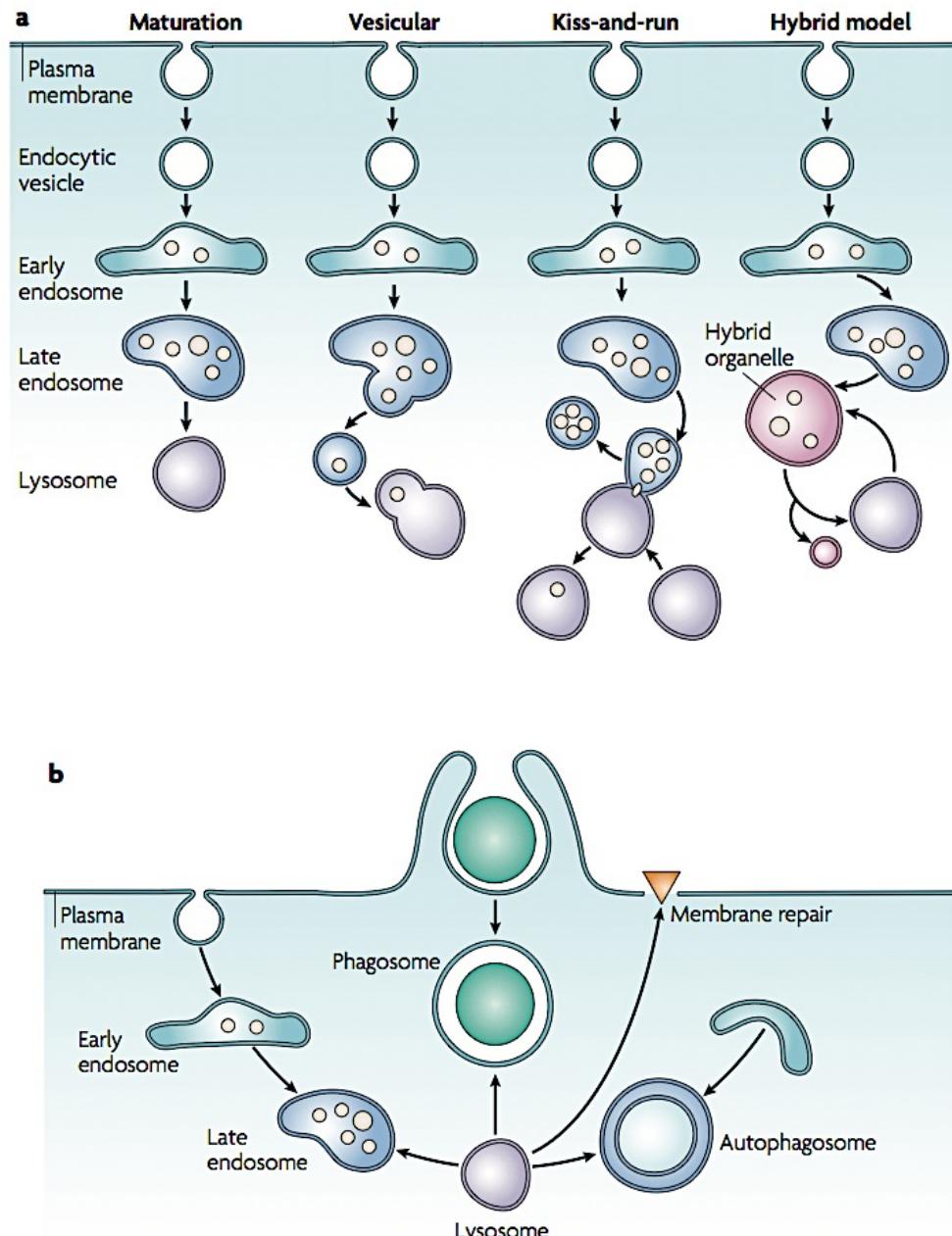
Lizosom - vnos proteinov

- razgradnja proteinov v lizosomu je dinamični proces
- način vnosa substratov v lizosom
 - endocitoza
 - autofagija
 - fagocitoza
- vnos ic proteinov
 - mikroavtofagija
 - invaginacija lizosomske membrane
 - direkten vstop
 - makroavtofagija
 - sekvestracija citopl. organel in dolgoživečih proteinov
- vnos eksogenih proteinov
 - endocitoza, pinocitoza, receptorski vnos
 - oblike vesiklov še brez proteaz
 - recikliranje prisotno
 - nastanek hibridnega organela



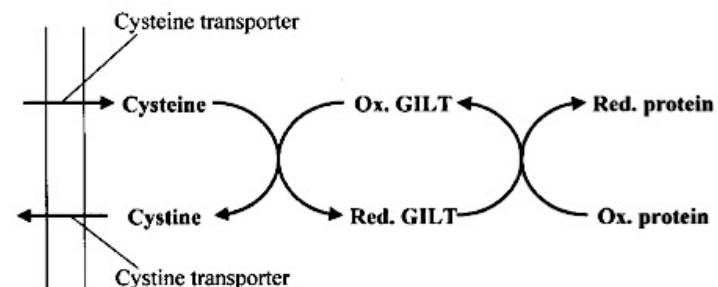
Lizosom – dostava in fuzija

- faze vesikularne dostava substrata
 - vesikel
 - zgodnji endosom
 - pozni endosom
- različni modeli prehoda v lizosom
 - model zorenja do zrelega lizosoma (postopno dodajanje komponent v pozni lizosom)
 - vesikularni model (vsebina se preko v dostavlja v lizosom)
 - model "kiss-and-run" izmenjava vsebine
 - model hibridnega organela (permanentno združenje obeh)
- lizosomi se lahko združijo z različnimi membranami
 - endosomi
 - fagosomi
 - plazemsko membrano



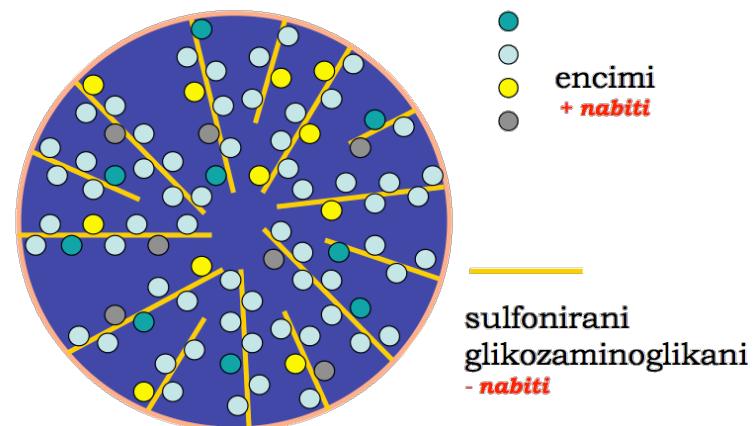
Lizosom - encimi

- Hidroliza poteka v
 - pozinem endosomu
 - lizosomu
 - hibridnih organelih
 - fagosomu
- v lizosому se nahaja:
 - 50 različnih hidrolaz
 - 2 MPR - manoza-6-fosfatna receptorja z različnima afinitetama do S
 - 275 kDa, od kationa neodvisen receptor
 - 46 kDa, od kationa odvisen receptor
 - LAMP (Lysosomal associated membrane proteins)
 - zaščita memb. komponent
 - cisteinski (notri) in cistinski (ven) transporter
 - vzdržujejo redox potencial
 - cistein fiziološki reducent
 - GILT (γ -interferon – inducible lysosomal thiol reductase) deluje podobno kot PDI
 - V-ATP protonska črpalka
- Proteolizni encimi
 - **katepsini B, H, D, L, S...**
 - elastaza, katepsin G
 - kolagenaza
- Glikozidaze
 - β -D-glukoronidaza
 - β -N-acetyl-D-heksoaminidaza
 - hialuronoglukozaminidaza
 - lizocim
 - neuraminidaza
- Esteraze
 - deoksiribonukleaza II
 - ribonukleaza II
- Lipaze
 - fosfolipazi A1 in A2
 - holesterol-esteraza
- Drugi
 - kisla-fosfataza
 - aril-sulfataza



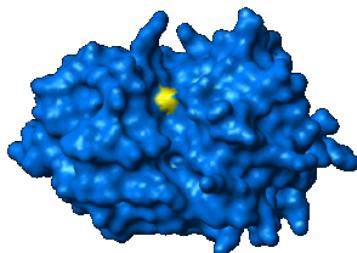
Lizosom – proteolizni encimi/sinteza in aktivacija

- encimi se sintetizirajo kot pre-proencimi
- signalni peptid se ko-translacijsko odcepi
- prekursor se modificira
 - glikozilacija na Asn (zaščita)
 - dodatek manzo-6-fosfat oznake
- vnos v lizosom preko membransko vezanih receptorjev (MPR)
- vezani na glikozaminoglikane
- aktivirajo se z odcepitvijo proregije
- pH 4.6-5.0 (protomska črpalka ATPaza)

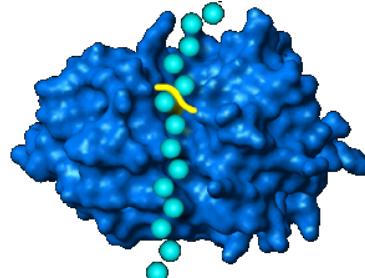


Lizosom – proteolizni encimi

- cisteinske proteaze najbolj zastopane
- serinska proteaza katG izjema
- Cys, His katalitična diada

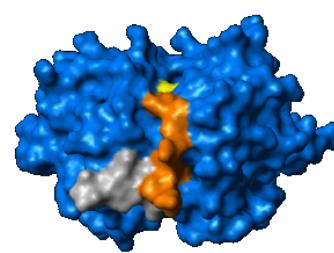


katepsin L
Cys, aktivno mesto

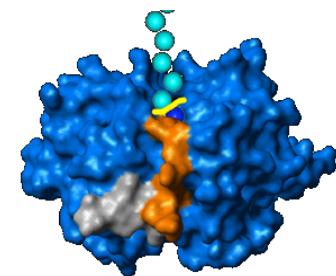


katepsin L
endopeptida

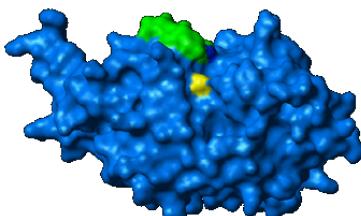
Name	Catalytic group	M_r	Operating pH*	pI	Distribution
Cathepsin B	Cys	27	5–6.5	5.4	Ubiquitous
Cathepsin D	Asp	42	2.8–5.0	5.5–6.5	Ubiquitous
Cathepsin E	Asp	100	3–3.5	4.1–4.4	Restricted
Cathepsin G	Ser	30	7.5	10	Neutrophils
Cathepsin H	Cys	28	5.0–6.5	7.1	Ubiquitous
Cathepsin L	Cys	29	4.5–6.0	5.8–6.1	Ubiquitous
Cathepsin N	Cys	34	3.5	6.2	Ubiquitous
Cathepsin S	Cys	24	5.0–7.5	6.3–6.9	Restricted
Cathepsin T	Cys	34	6.9	?	Restricted
Cathepsin K	Cys	27–29	6.0–6.5	?	Osteoclasts
Legumain	Cys	31	4–6	?	Ubiquitous



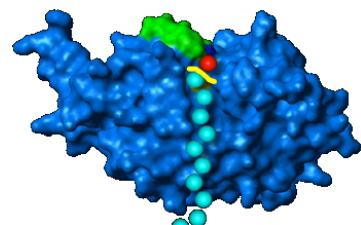
katepsin H
mini veriga, oranžno



katepsin H
aminopeptidaza



katepsin X
zanka, zeleno



katepsin X
karboksipeptidaza

- mehanistično delujejo kot endo (Cys, Asp) in eksopeptidaze (Cys, Ser-katG)

Lizosom – pogoji v lizosому

- pogoji v lizosому glede pH (\downarrow) in redoks potenciala (redukcijski)
 - denaturirajo substrate
 - povečajo aktivnost proteaz
 - encimi stabilni v teh denaturacijskih pogojih
 - encimi obstojni proti proteolizi ($t_{1/2}=1$ teden)
- pogoji najbolj primerni za CP in AP
- kot encimi so široko specifični
- aktivno mesto je v primerjavi z aktivnim mestom SP veliko bolj nespecifično
- CP in AP so nestabilne v nevtralnem in alkalnem
- regulacija aktivnosti CP v lizosому
 - inhibitorji
 - inhibitorjev CP ni ne v lizosomih, ne v endosomih
 - AP inhibitorjev nimajo
 - redoks potencial
 - direkten vpliv na aktivno mesto CP
 - potrebna prosta tiolna skupina
 - pri zelo nizkem pH se aktivnost CP zmanjša
 - pH odvisnost nastanka tiolatnega iona ($RS \leftrightarrow RSH$)
 - se pa aktivira AP katepsin D
 - acidifikacija
 - direktno vpliva na aktivnost številnih encimov

Proteasom/ubikvitin -

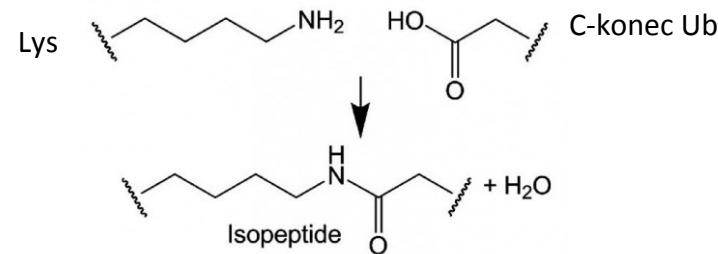
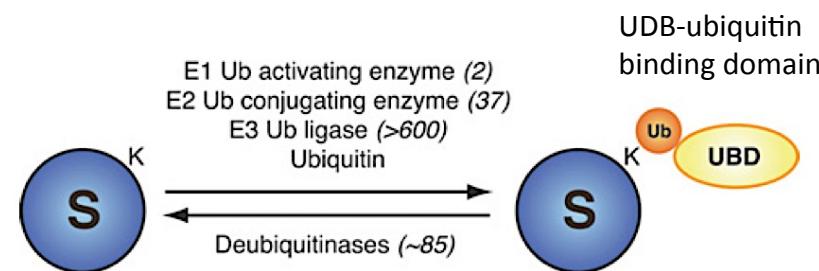
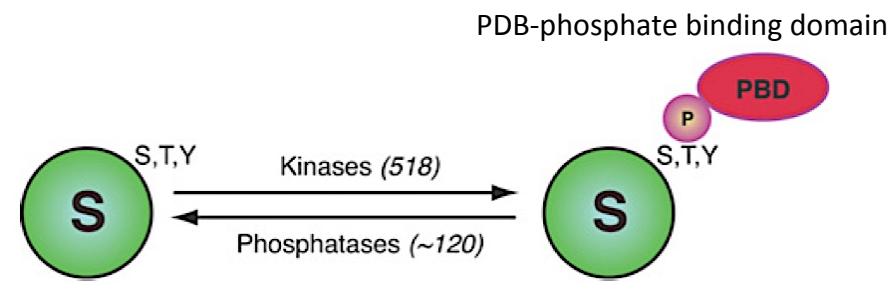
- fosforilacija/ubikvitinacija dve osnovne reverzibilne posttranslacijske modifikacije

- fosforilacija proteinova

- Ser/Thr, Tyr
 - regulacija encimske aktivnosti
 - alosterična regulacija
 - omogoča interakcijo s proteinimi
 - kinaze/fosfataze

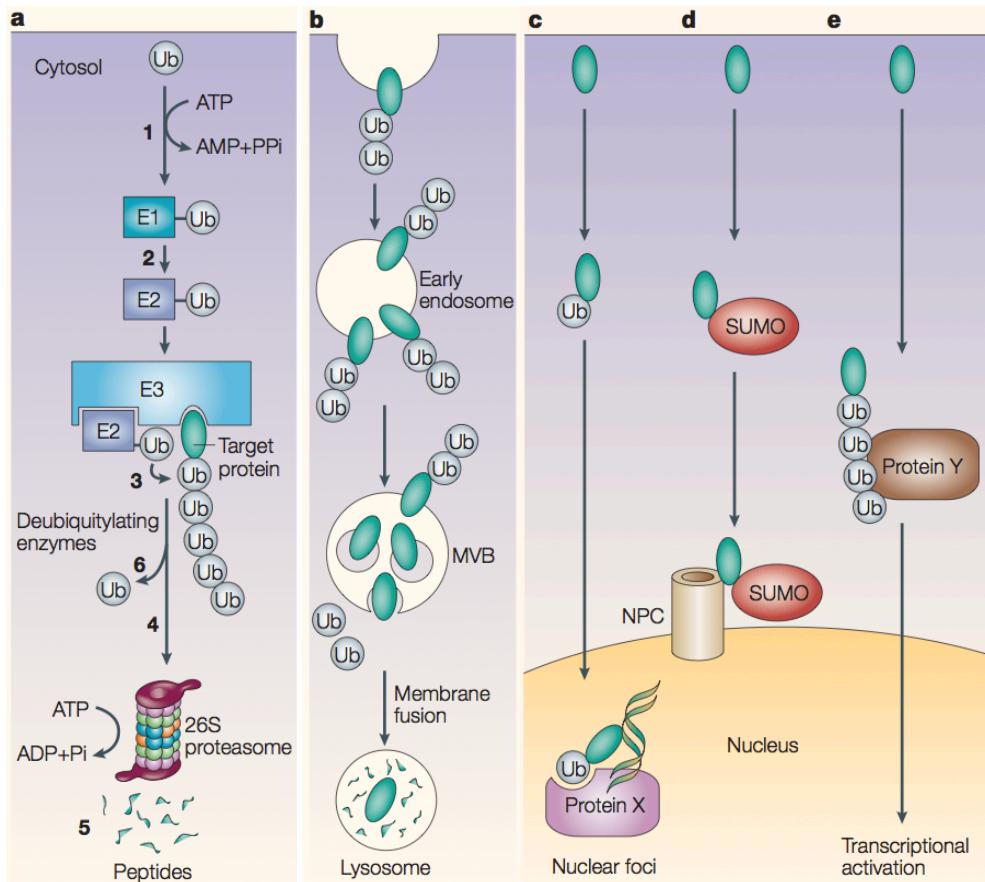
- ubikvitinacija

- Ubique (povsod)
 - Lys
 - ubikvitin (76 ak, 8,5 kDa)
 - kovalentno vezan na protein signal za razgradnjo v proteasomu
 - aktivacija poteče s tremi encimi
 - E1 Ub aktivirajoč encim
 - E2 Ub konjugirajoč encim
 - E3 Ub-protein ligaza
 - izopeptidna vez med
 - C-koncem Ub in ε -skupino Lys
 - C-koncem Ub in α -skupino N-konca p



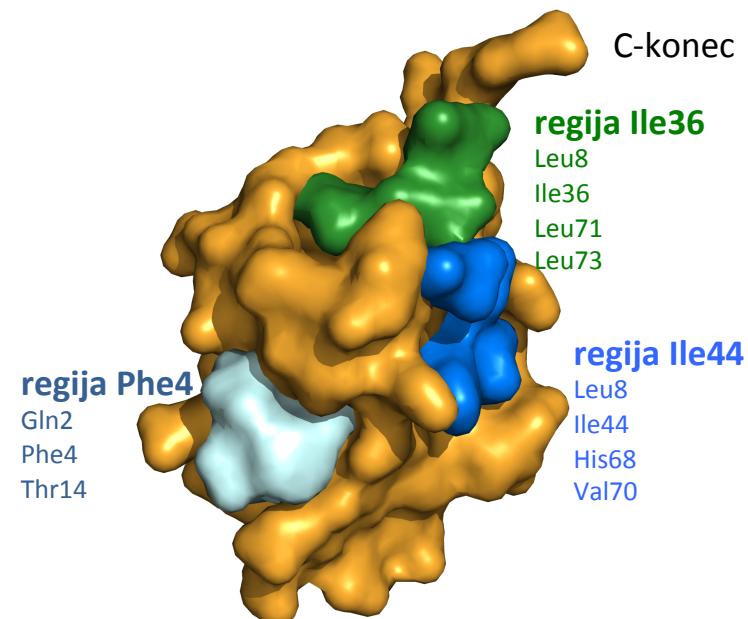
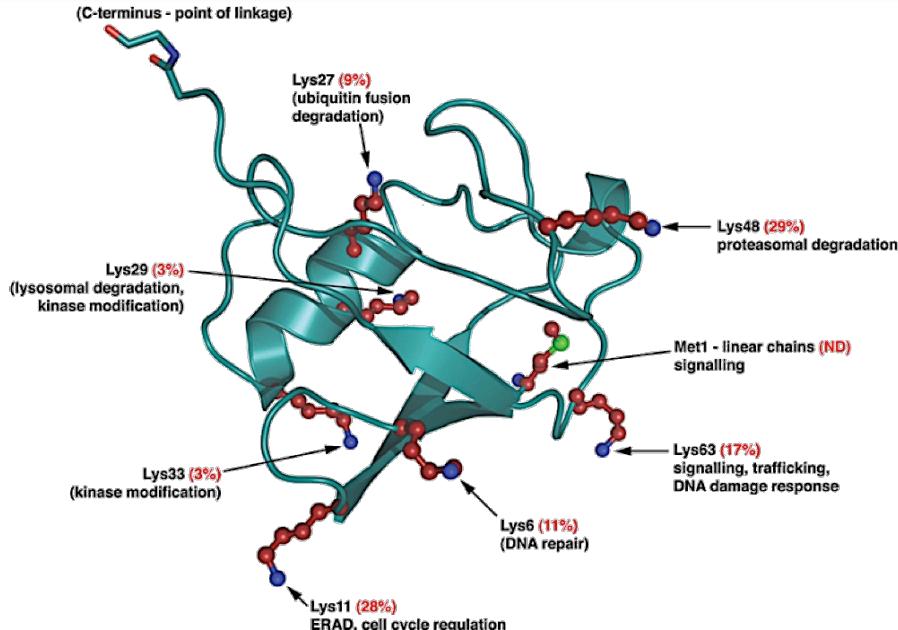
Proteasom/ubikvitin - ubikvitin

- različna vloga ubikvitinacije
 - signal za razgradnjo (proteasom)
 - endocitoza in sortiranje (lizosom)
 - popravljanje DNA po replikaciji
 - kontrola transkripcije
 - signalna transdukacija
 - regulacija proteinskih interakcij
 - regulacija proteinske aktivnosti



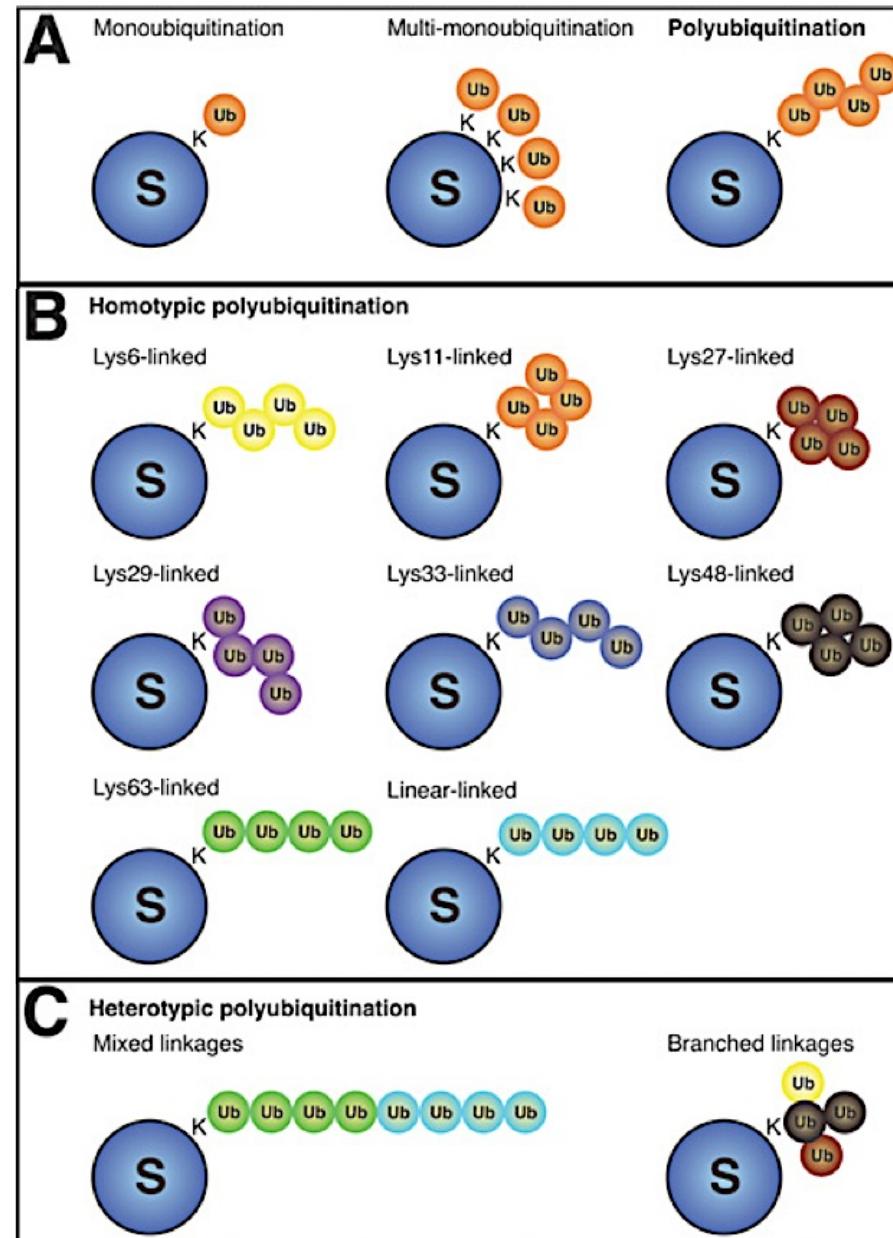
Proteasom/ubikvitin – strukturne lastnosti ubikvitina

- majhen, kompakten bazičen protein
- evolucijsko zelo ohranjen
(prepoznavanje z UBD-Ub binding domain)
- ~50 % vezan na proteine
- 7 Lys
- štrleč C-konec
- značilne hidrofobne regije za prepoznavanje
 - regija Ile 44
 - veže na proteasom
 - UBD
 - regija Ile 36
 - HECT domene
 - DUB (deubikvitinaza)
 - UBD
 - regija Phe 4
 - USP (ubiquitin-specific domain) domena
 - DUB



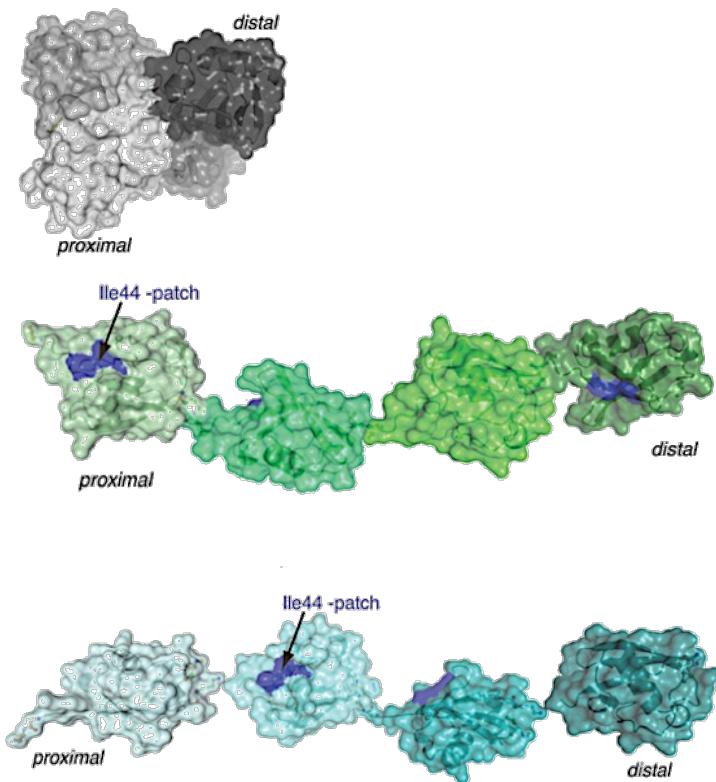
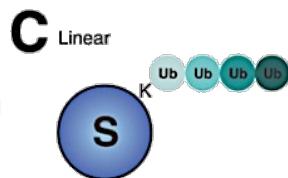
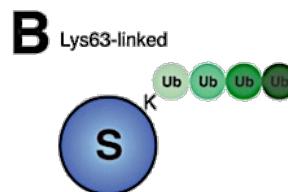
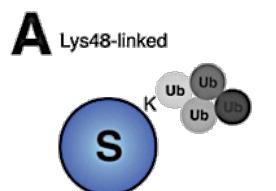
Proteasom/ubikvitin – oblike proteinske ubikvitinacije

- podobno kot pri fosfatazah (518/120) je pri ubikvitinaciji 5x več encimov za pripenjanje kot odstranjevanje
- ubikvitinacija ima še nadgradnjo glede kompleksnosti
 - 7 Lys
 - polimerizacija
- trije splošni načini pripenjanja Ub
 - monoubikvitinacija
 - histoni
 - multi-monoubikvitinacija
 - na površinskih receptorjih → internalizacija → lizosomi
 - poliubikvitinacija
- homotipična poliubikvitinacija
 - preko vseh Lys
 - vezava "head to tail"
 - C-Ub/N-protein - peptidna vez
- heterotipična poliubikvitinacija
 - mešane vezave
 - razvijane vezave



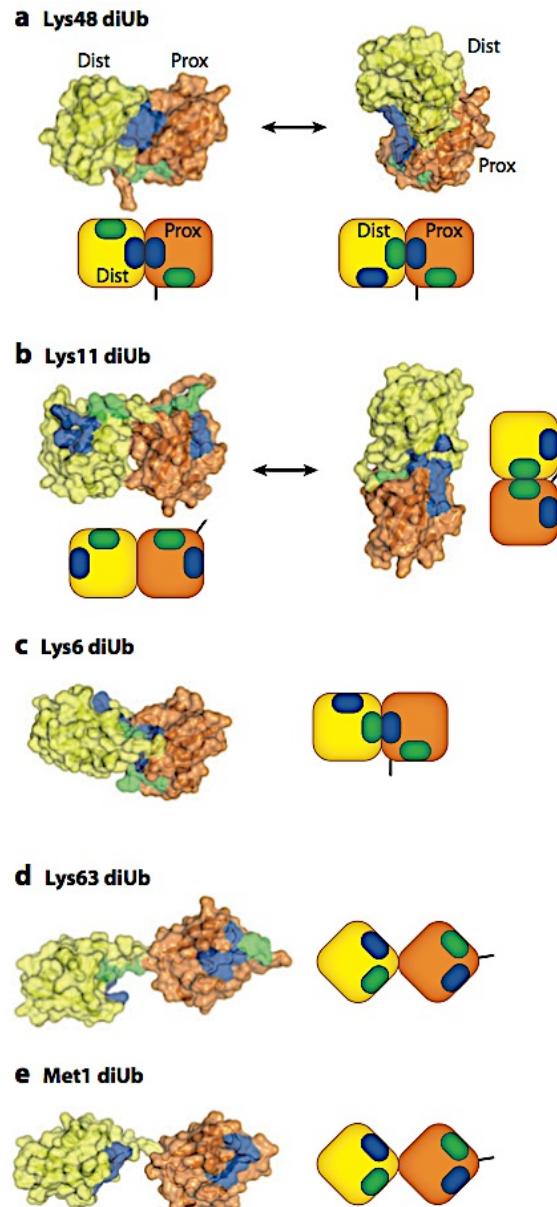
Proteasom/ubikvitin – oblike proteinske ubikvitinacije

- veliko encimov specifično sestavlja in razstavlja takšne povezave
- kako proteini razlikujejo med polimeri?
- vezava preko izopeptidne vezi da vedno dimer (isti naboj, ista masa)
- značilnosti molekule Ub:
 - globularna oblika
 - fleksibilnost C-konca (motiv Leu-Arg-Gly-Gly)
 - hidrofobne regije (Ile, Phe)
 - vsi Lys razporejeni vse naokrog
 - različna usmerjenost
- nadstruktura Lys48- in Lys63-povezanih verig zelo različna (tetragonalna vs. iztegnjena)
- strukturna podobnost samo pri linearinem polimeru in Lys63-povezavi
- pri različnih razporeditvah je pomembna izpostavljenost/dostopnost hidrofobnih regij (vezavne regije)



Proteasom/ubikvitin – 3D konformacija diubikvitinov

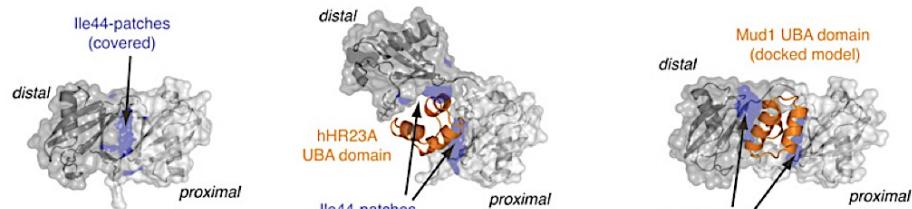
- povezave Lys48, -6 in -11 tvorijo kompaktne strukture
- povezave Lys63 in Met1 tvorijo odprte konformacije, konformacijska fleksibilnost
- razdalje in orientacija med hidrofobnimi regijami se pri zaporednih Ub pri različnih povezavah razlikujejo
- vse te konformacije omogočajo veliko možnosti za vezavo partnerjev
- pomenijo različne vloge v celici



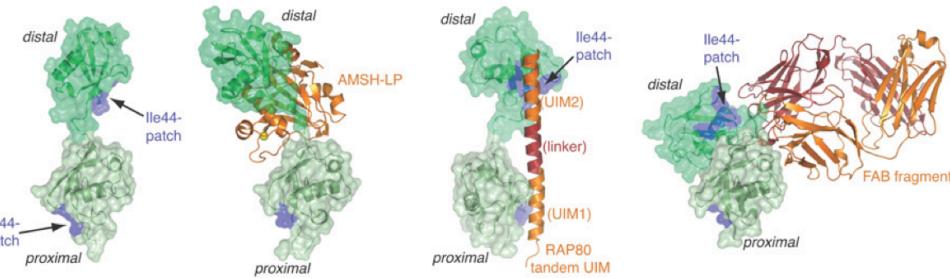
Proteasom/ubikvitin – konform. spremembe di-Ub po vezavi

- nekaj struktur z interakcijskimi partnerji je poznanih
- kaže se velika intrinsična konformacijska fleksibilnost
- Lys 48
 - interakcija z Ile44 regijo
 - interakcija na dva različna načina
 - UBA (Ub-associated domain)
 - umestitev med domnevno tesno pakiranima Ub molekulama
 - Ub molekuli ostaneta tesno povezani
- Lys 63
 - DUB (deubikvitinaza AMSH-LP) in RAP80 interagirata z iztegnjeno obliko
 - Ab → drastično prelomi iztegnjeno obliko
- linearni kompleks
 - iztegnjena oblijae se skrči ob vezavi NEMO
 - v kristalni strukturi simetrični dimer

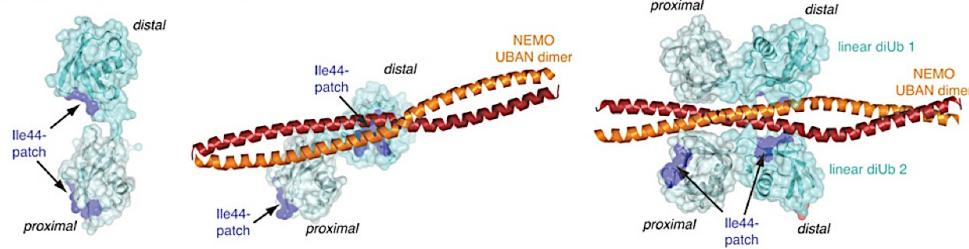
A Lys48 diubiquitin complex



B Lys63 diubiquitin complexes



C Linear diubiquitin complex

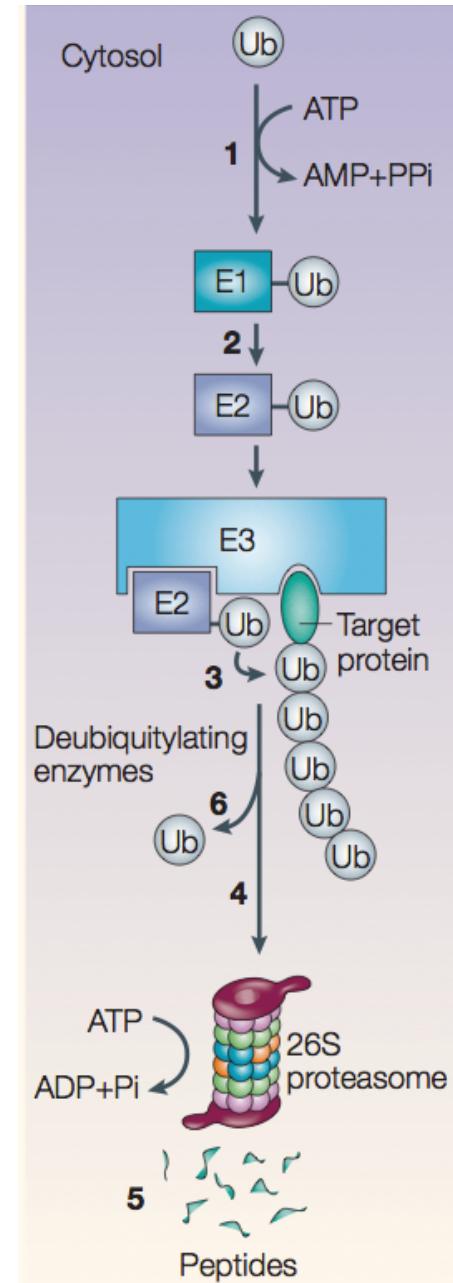


Proteasom/ubikvitin – fiziološka vloga ubikvitinacije

- Lys48
 - dolgo časa veljala kot edina povezava
 - tetramer je najkrajša oblika, ki jo prepozna proteasom
 - prepoznajo jo DUB (deubikvitinaze) in ligaze na proteasomu
 - poliUb se ne razgradi, se reciklira
- Lys11
 - malo znanega
 - močan signal za proteasomsko razgradnjo
- Lys63
 - poli-Ub ni signal za razgradnjo (za razliko monoUb → internalizacija)
 - odgovor na poškodbo-DNA
 - signalizacija preko citokinov (TNF α) → aktivacija kinaz, ta pa je odvisna od Lys63 Ub-polimera
 - sodeluje pri Wnt signalizacijski poti
- Lys6
 - fiziološka vloga še ni poznana
- Lys27
 - vloga v celici še ni poznana
- Lys29/Lys33
 - asociacija z HECT E3 ligazo
 - AMPK (AMP-activated kinase) se poli ubikvitinirajo preko Lys29/33
- linearna veriga
 - na RING domeni proteinov
- mešana in razvezjana vriga
 - procesiranje take oblike v proteasomu ni uspešno

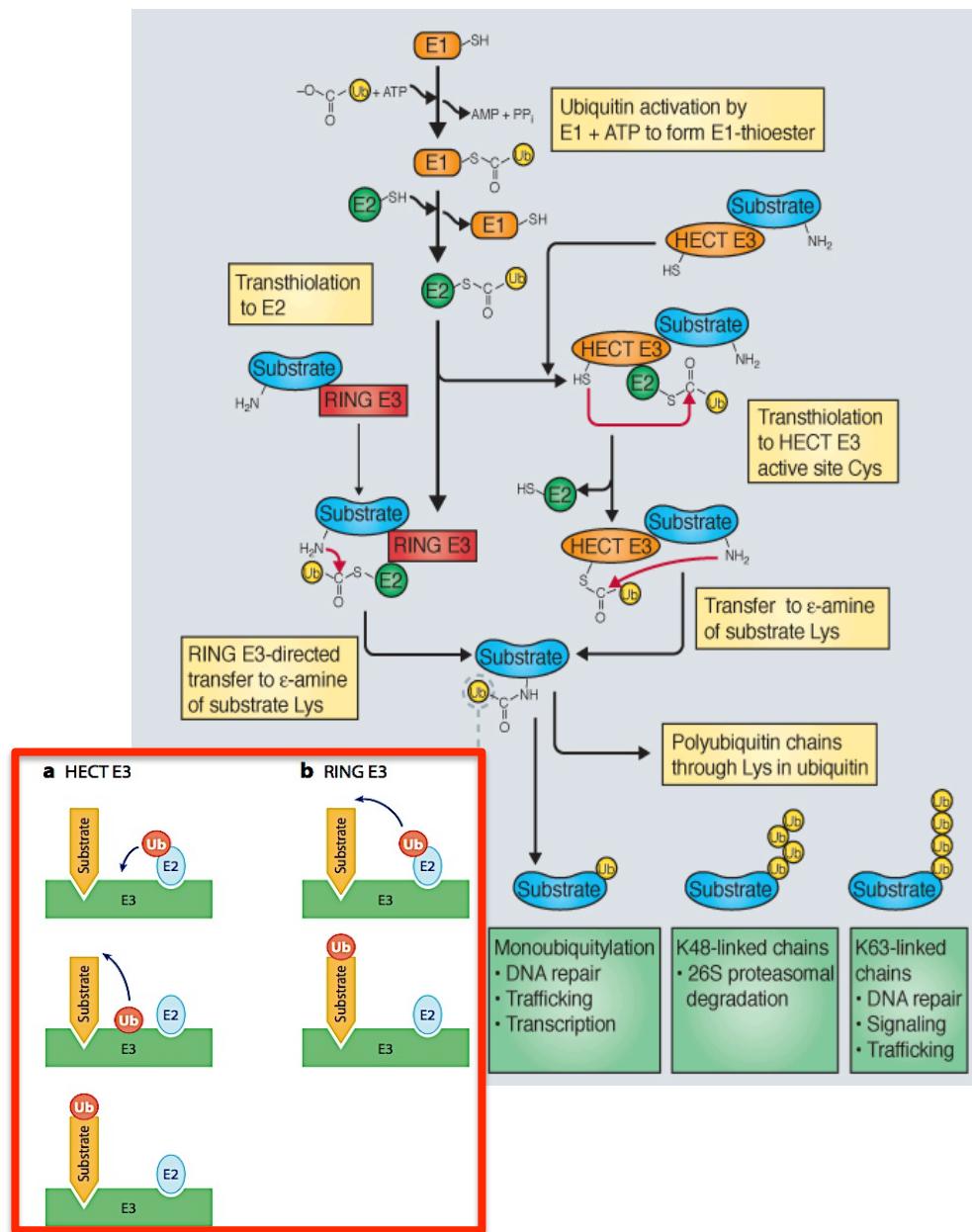
Proteasom/ubikvitin - kaskadna reakcija ubikvitinacije

- nastanek kompleksa med Ub in substratom katalizira delovanje treh encimov v zaporedju
 - E1 Ub aktivirajoč encim (2)
 - od ATP odvisna prva stopnja
 - E2 Ub konjugirajoč encim (~40)
 - E3 Ub ligaza (>600)
 - dve vrste ligaz
 - RING
 - HECT
 - delujejo kot adapterji za E2-Ub in substrat
 - mehanizem tvorbe izopeptidne vezi med Ub in substratom ni poznan
- proces ubikvitinacije je reverzibilen proces (~ 85 deubikvitinaz (DUB))
- ubikvitinirane proteine prepozna vsaj 20 specializiranih Ub-vezavnih domen



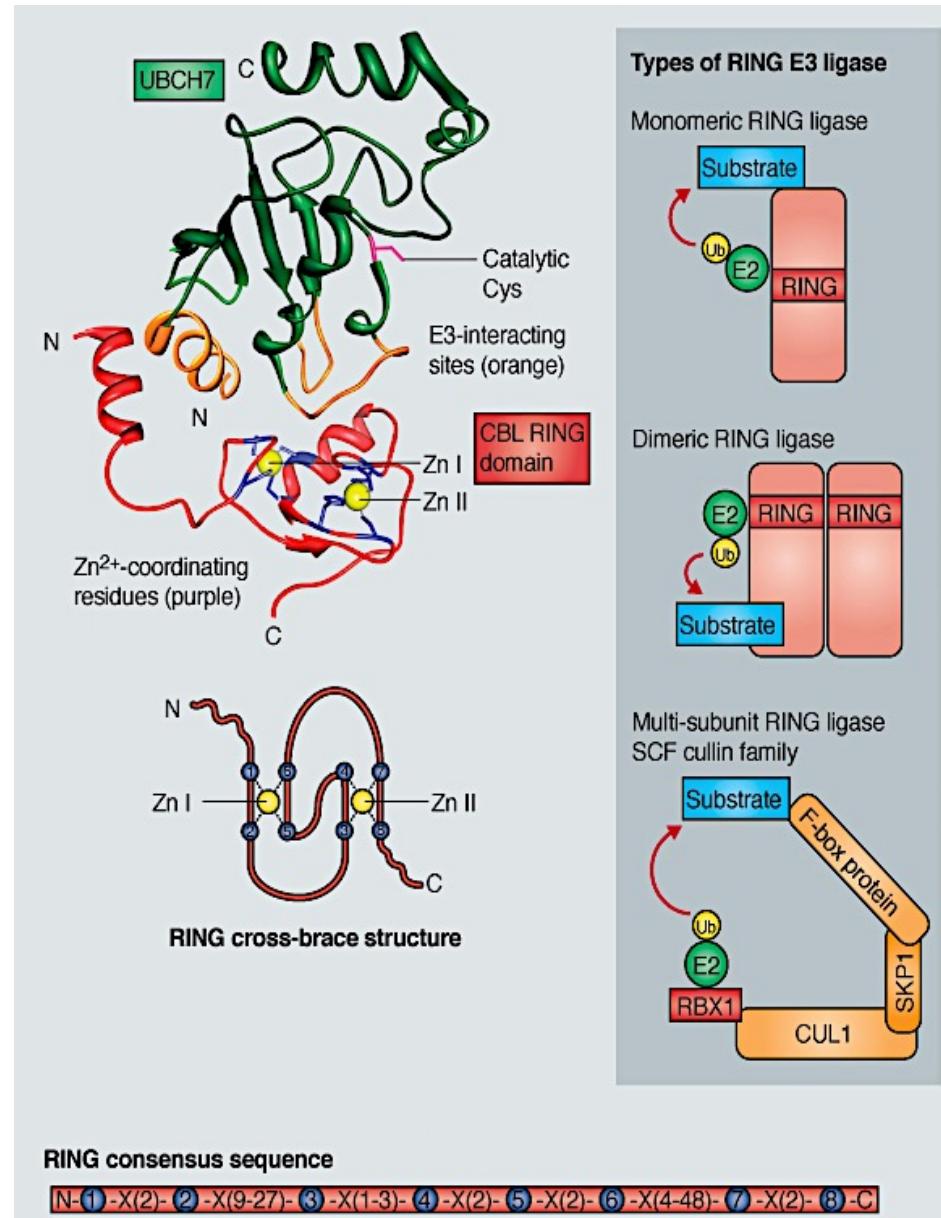
Proteasom/ubikvitin – mehanizem vezave Ub na substrat

- Aktivacija Ub z E1
 - nastanek visoko-energijske vezi med C-koncem Ub in SH-skupino v aktivnem mestu E1
 - od ATP odvisen proces
- Transthiolacija na E2
 - prenos Ub na SH skupino aktivnega mesta E2
- Prenos Ub iz E2 na S vezan na E3
 - dve družini E2 ligaz
 - značilna HECT domena (prenos Ub preko vezave na E3 do S)
 - značilna RING domena (Really Interesting New Gene) (direkten prenos Ub iz E2 na S)
 - reakcijo prenosa katalizira E3 ligaza
 - vezava na ε-amino skupino Lys na S
- poli-Ub veriga se gradi z zaporednim dodajanjem Ub
- ubikvitinacija je kompleksen proces in poteka izjemno specifično (časovno in prostorsko)
- >600 različnih E3



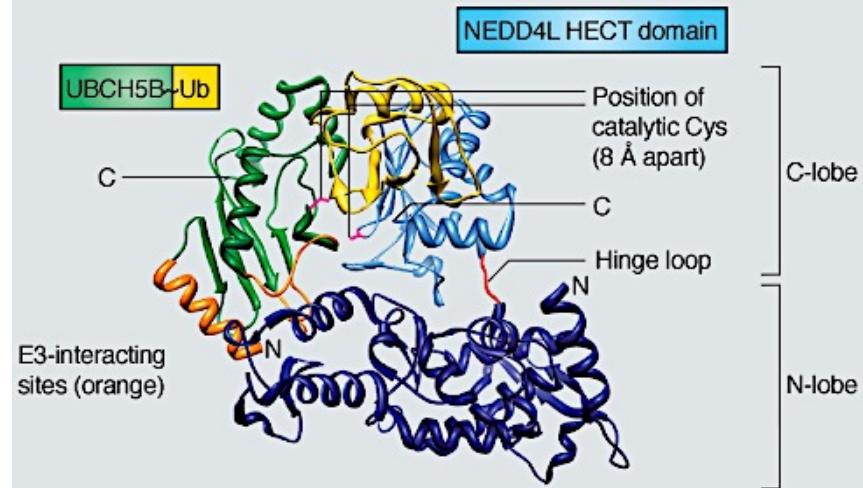
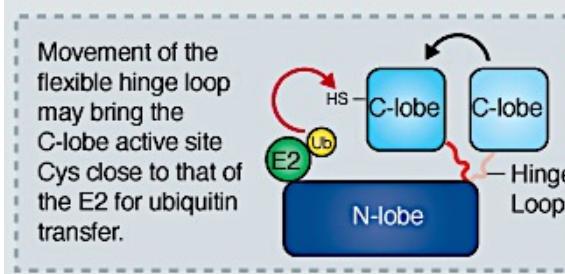
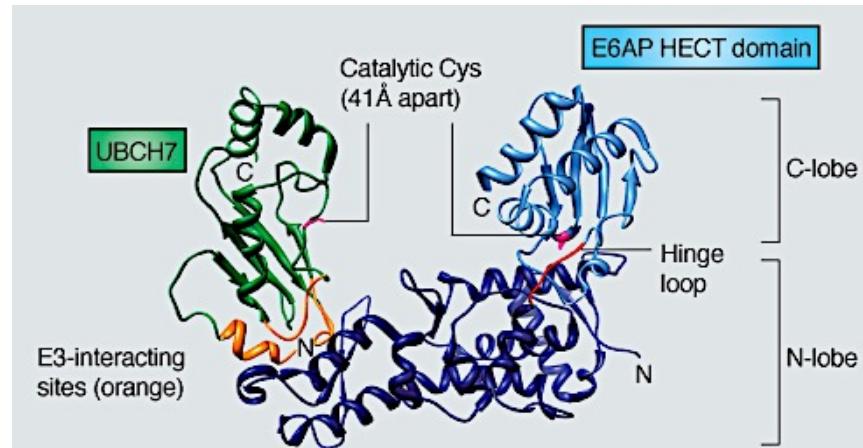
Proteasom/ubikvitin – Ub-ligaza / RING domena

- UB ligaza z RING domeno (<600) deluje kot
 - monomer (dva Zn²⁺)
 - dimer (preko RING domene)
 - homodimer
 - heterodimer
 - kompleks z več podenotami
- za razliko od Ub ligaze s HECT domeno, ne tvori katalitičnega intermediata z Ub
- RING domena je namenjena, da pripelje E2 in S v neposredno bližino



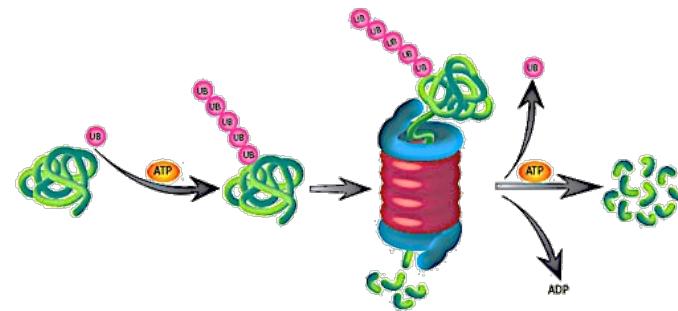
Proteasom/ubikvitin – Ub-ligaza / HECT domena

- UB ligaza
 - N-konec, različen namenjen vezavi S
 - na C-koncu locirana HECT domena (390 ak)
- ~30 HECT domen pri sesalcih
- različne vloge
 - signalizacijska
 - transportna
 - imunski odgovor
 - regulacija celične rasti
- strukturno razdeljen na dva režnja
 - C-reženj (aktivno mesto)
 - N-reženj (za interakcijo z E2)
- kristalna struktura HECT domene
 - vezan samo E2 (41 Å razdalja med katalitičnima Cys)
 - vezan Ub-E2 (8 Å razdalja med katalitičnima Cys)
 - fleksibilna zanka (rdeče) omogoča zblížanje obeh katalitičnih mest za prenos Ub



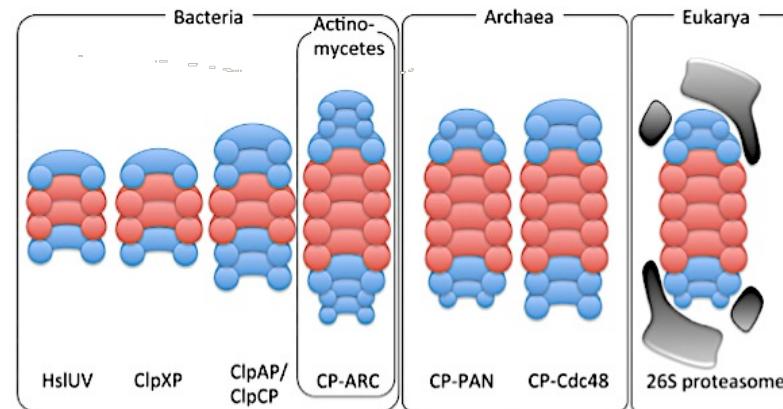
Proteasom/ubikvitin – proteasom

- je proteaza Ub-proteasomske poti
- pomembna za celični metabolizem
- vsaka celica 20.000 -30.000
- izvaja regulirano razgradnjo proteinov v citosolu in jedru
 - narobe zviti
 - defektni
 - kratkoživeči proteini
- kot encim je nespecifičen, cepi proteine do kratkih peptidov
- edina proteaza, ki deluje v odvisnosti od ATP
- deluje v fazah
 - prepozna z Ub-označene proteine
 - odstrani Ub
 - substrat razvije
 - translocira do aktivnega mesta
 - razgradi
- prisoten
 - evkariotih
 - arhejah
 - nekaterih bakterijah
- cilindrična oblika osrednjega dela ~700 kDa
CP (core particle) → **20S proteasom**
- pokrov na obeh straneh ~700 kDa
RP (regulatory particles) 19S



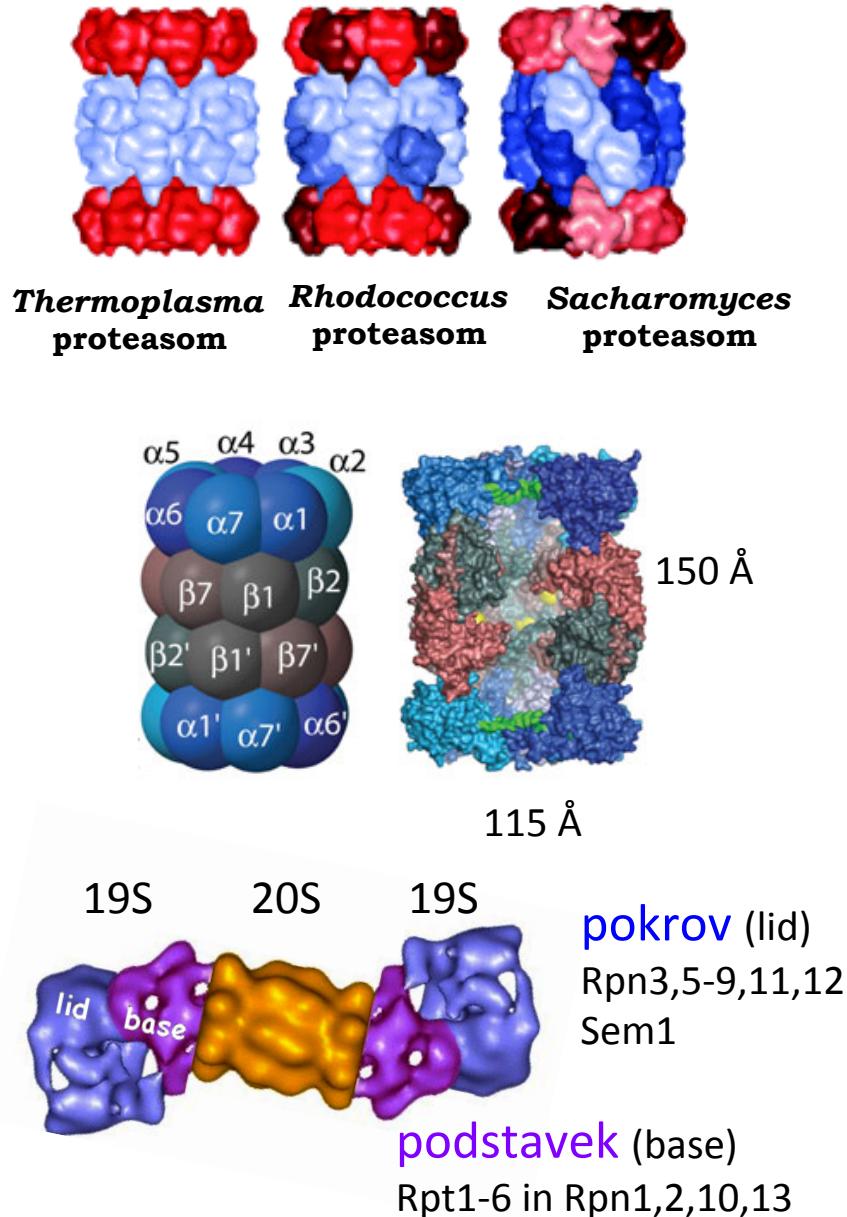
26S
funkcionalni
proteasom z
AAA-ATPazno
aktivnostjo

}



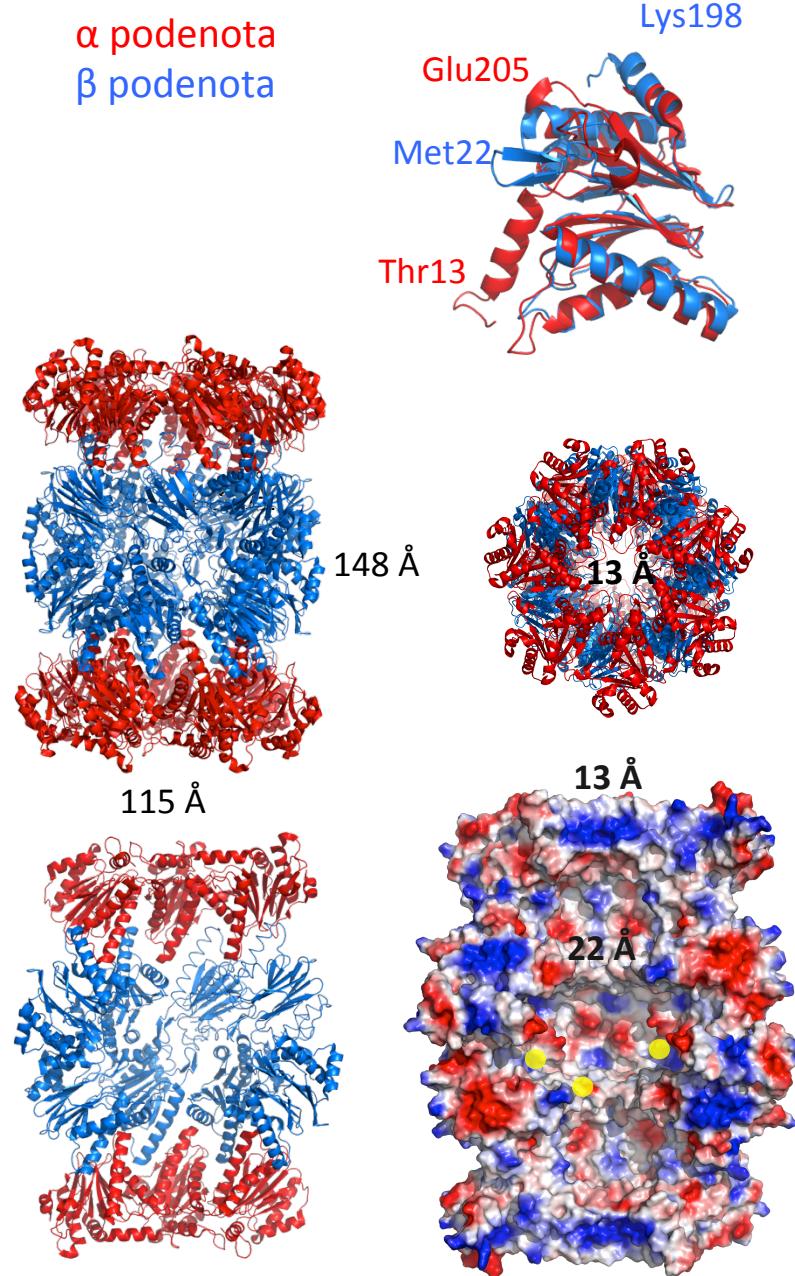
Proteasom/ubikvitin – proteasom struktura

- Zgodovina
 - 1980 izolirani
 - 1995 določena funkcija
 - 2013 določena struktura
- osrednji del CP
 - 2 genska produkta α - in β
 - vsak v 14 kopijah
 - štirje heptamerni obroči
 - zunanjega obroča α -podenote (neaktivna)
 - notranja obroča β -podenote (proteolizno aktivne)
 - arheje ena vrsta α - in β -podenot
 - evkariontski proteasom, *Saccharomyces cerevisiae*
 - 7 različnih vrst α - in sedem β -podenot
- pokrov, regulatorna enota
 - 19 podenot



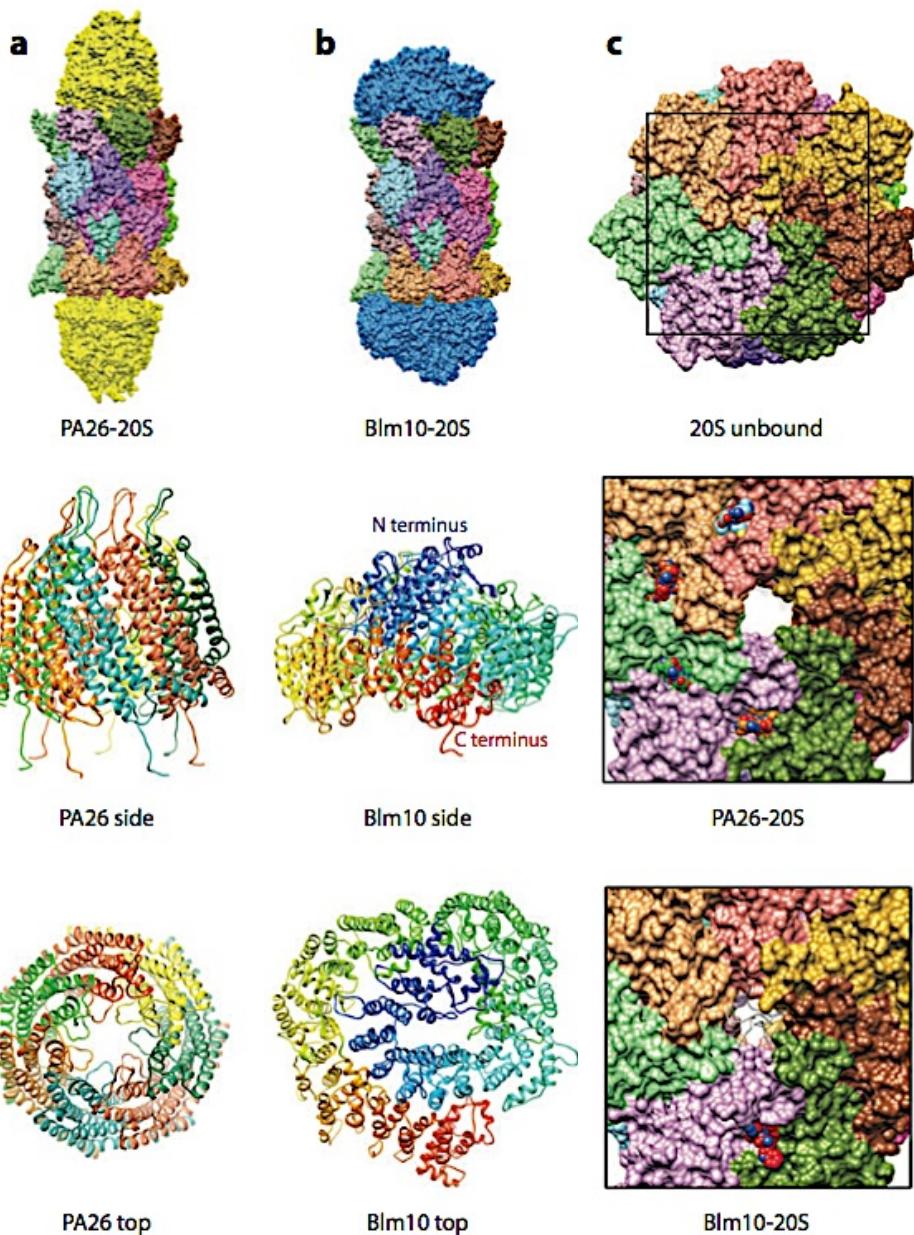
Proteasom/ubikvitin – struktura 20S proteasoma

- struktura osrednjega dela *Thermoplasma acidophilum*
- α - in β - podenoti homologni z nekaj strukturnimi razlikami
- zloženi v heptamerne obroče
- vstop S v 20S proteasom
 - vrh zaprt z N-konci α -podenot (13 Å)
 - potrebne konformacijske spremembe preko RP
- katalitični center je na β - podenoti
 - bakterije vse β - podenote aktivne
 - evkarionti, aktivne $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$
 - 20S oblika razgrajejo samo majhne peptide in razvite proteine
 - velikih in z Ub označenih proteinov ne razgradi
 - aktivnost ostalih β -podenot ni poznana
 - nukleofil je N-končni Thr1
 - specifičnost
 - kimotriptična (Tyr, Phe)
 - triptična (Arg, Lys)
 - postglutamilna (Glu)
- višji organizmi kombinacija drugih β - podenot
 - homologi podenot $\rightarrow \beta 1$ (LMP2), $\beta 2$ (MECL1), $\beta 5$ (LMP7)
 - podenote se selektivno inducirajo s citokini (γ -interferon)
 - pri sestavljanju zamenjajo $\beta 1$, -2, -5- podenote
 - imajo drugačno aktivnost kot konstitutivne podenote
 - imunoproteasom – pomen pri antigenski prezentaciji
- proteasom višjih organizmov deluje vedno v povezavi z regulatornimi proteini (RP)-aktivatorji

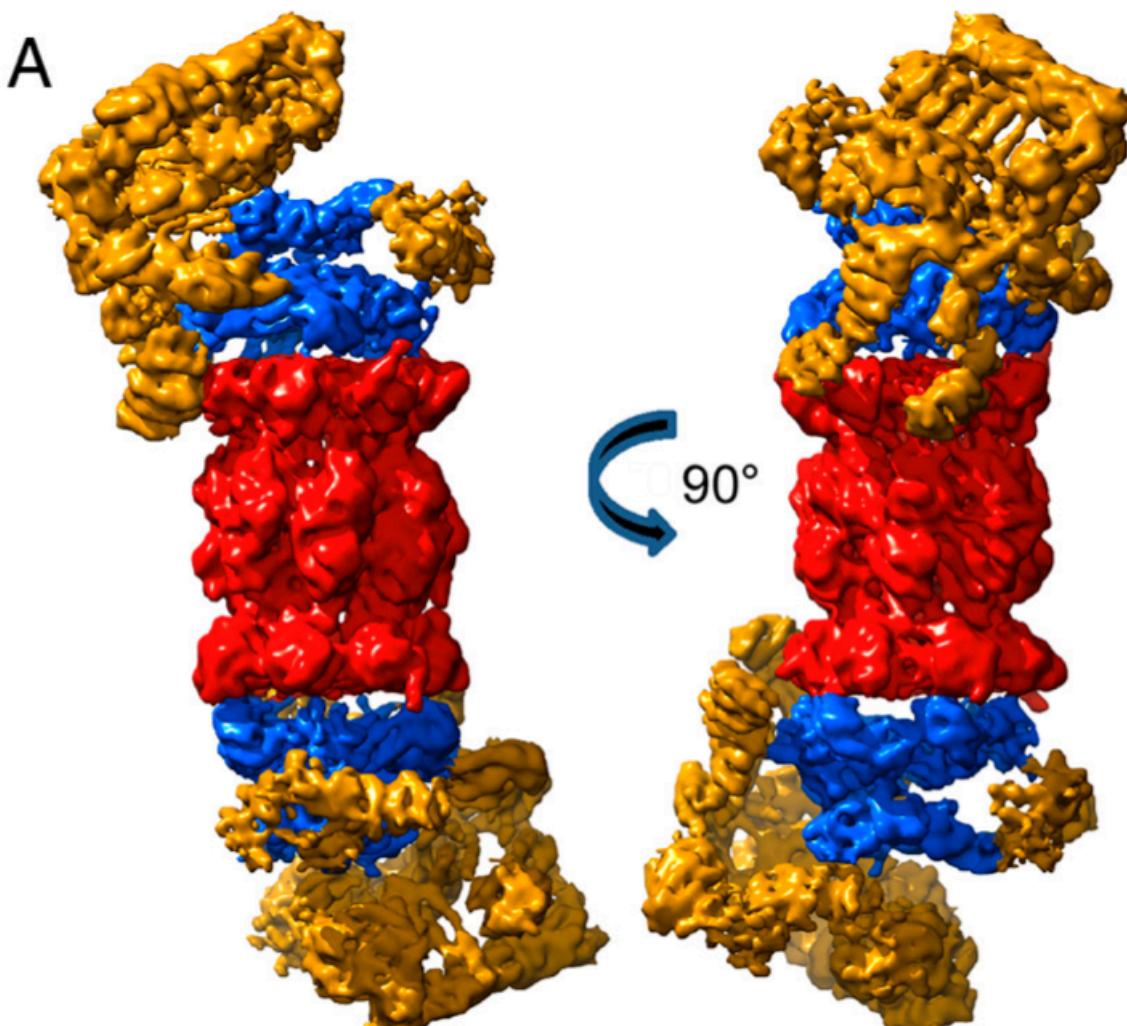


Proteasom/ubikvitin – od ATP-neodvisni aktivatorji

- 11S (PA28 ali homolog PA26) aktivator
 - heptamerna oblika
 - na 20S se veže s C-konci in sproži konformacijske spremembe
 - odpre se odprtina na 20S
 - ne izkazuje ATP-azne aktivnosti
 - razgrajuje krajše peptide
- PA200 (Blm10) aktivator
 - strukturno drugačen kot 11S
 - enojna veriga ~250kDa
 - s C-koncem se veže med $\alpha 5$ in $\alpha 6$ podenoto
 - v žepu vzpostavi solni most z Lys na $\alpha 6$

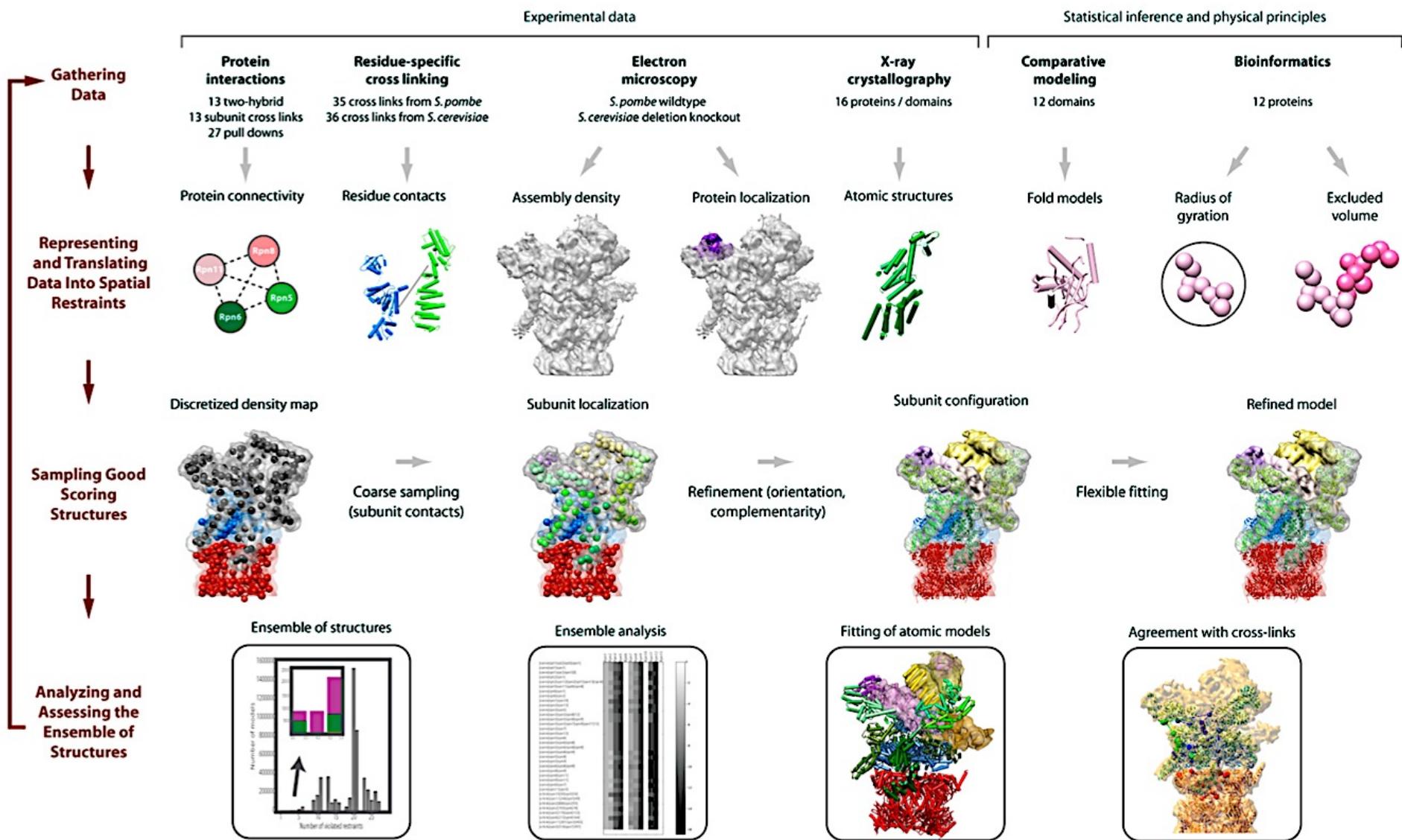


Proteasom/ubikvitin – od ATP-odvisni aktivatorji (metode)



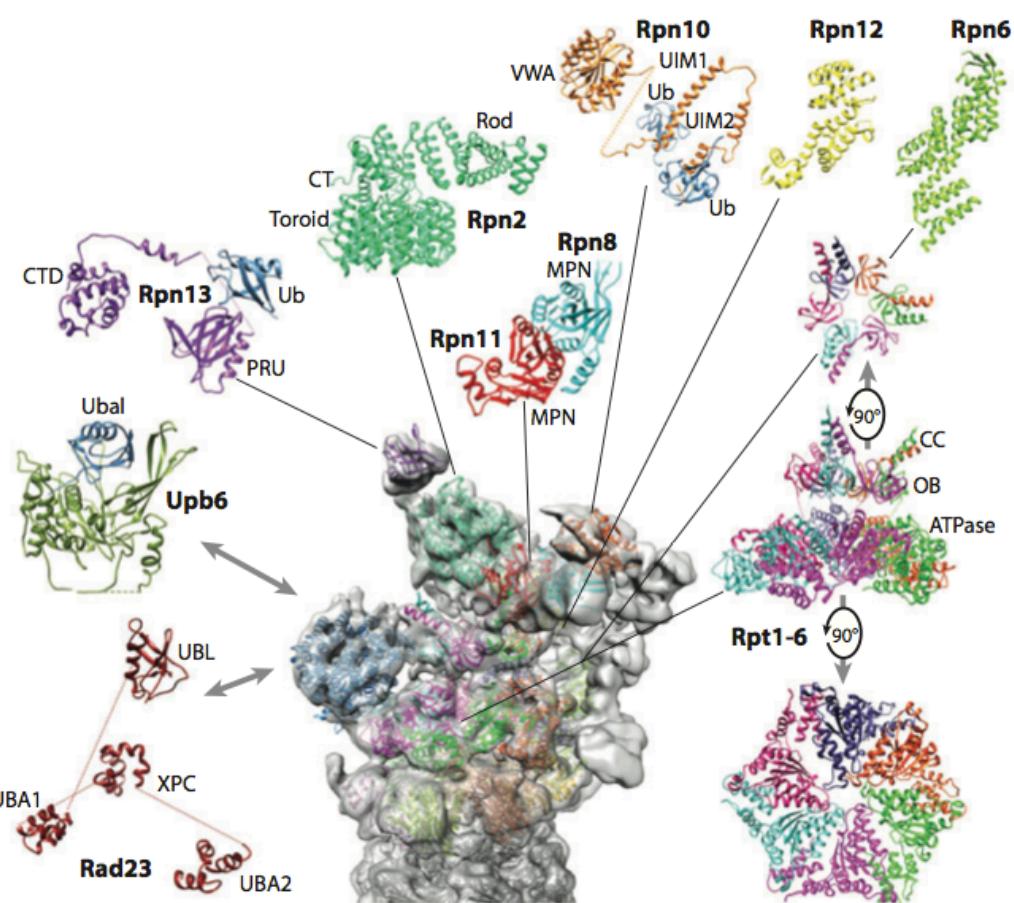
cryo-electron microscopy

Proteasom/ubikvitin – od ATP-odvisni aktuatorji (metode)



Proteasom/ubikvitin – od ATP-odvisni aktivator 19S

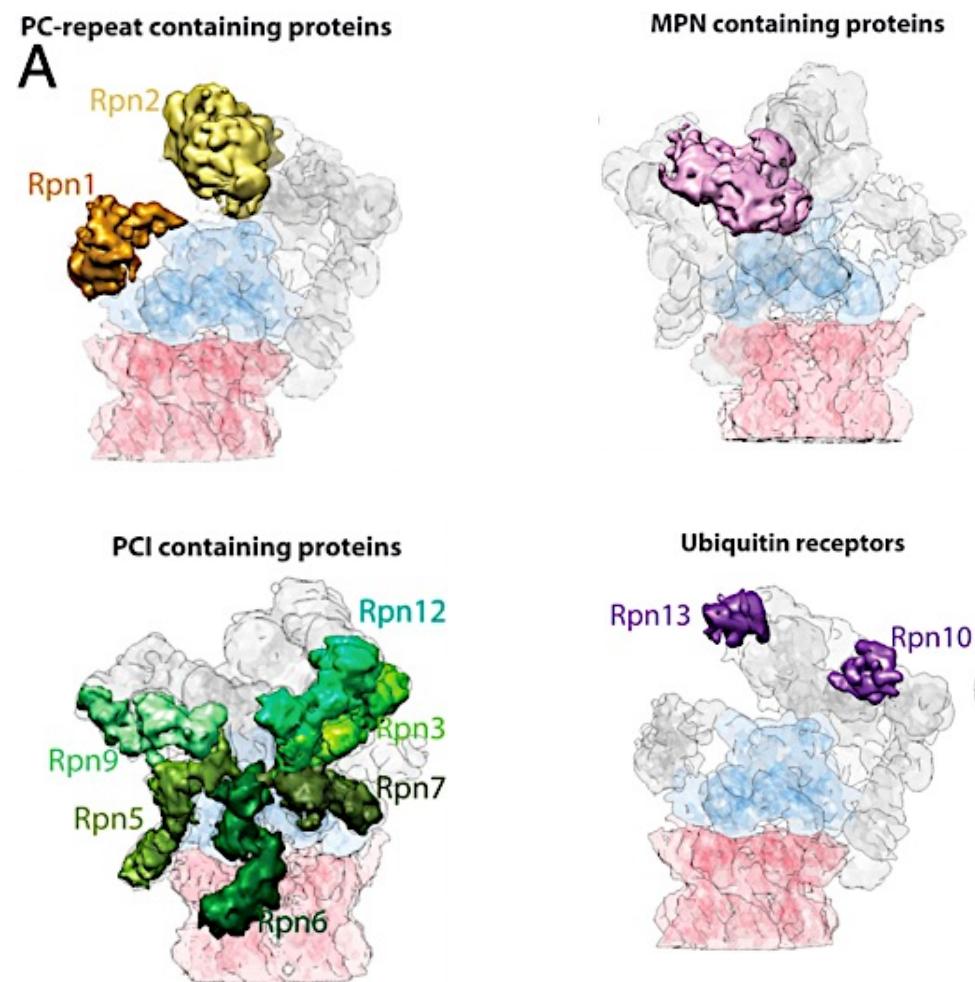
- 19S podenota
 - podstavek
 - 6 ATPaz (Rpt1-6)
 - Rpn1, Rpn2
 - Ub receptorji Rpn10 in Rpn13
 - pokrov
 - Rpn3, 5-9, 11, 12, 15
- Rpt podenote 19S RP
 - spadajo v družino AAA-ATPaz
 - hidroliza ATP za konform. spremembe
 - tvorijo heksamer
 - heksamer Rpt1-6
 - locirani blizu N-koncev α-podenot
 - vloga pri razvijanju proteinov, da vstopijo v ozek, 13 Å kanal
 - omogočijo translokacijo proteina



Proteasom/ubikvitin – od ATP-odvisni aktivator 19S

- 19S podenota
 - podstavek
 - 6 ATPaz (Rpt1-6)
 - Rpn1, Rpn2
 - Ub receptorji Rpn10 in Rpn13
 - pokrov
 - Rpn3, 5-9, 11, 12, 15

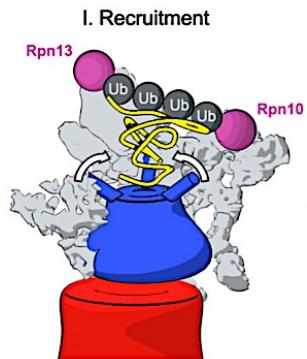
- Rpn podenote 19S RP
 - Rpn1 in Rpn2 največji
 - PC ponovitve
 - struktturna vloga
 - Rpn8, 11
 - MPN domene
 - metalo encim (Zn)
 - heterodimer
 - **deubikvitinazna aktivnost**
 - Rpn3, 5-9, 12
 - vsi enako zvitje
 - medsebojni kontakt preko PCI domen
 - prekrivajo AAA ATPazni heksamer
 - Rpn10 in Rpn13
 - strukturno nesorodna
 - prepoznata Ub



Proteasom/ubikvitin – mehanistični model razgradnje 26S

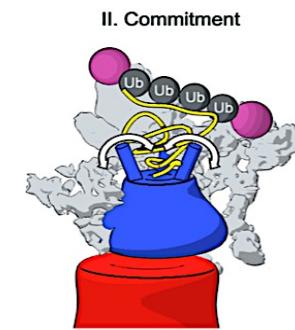
Rekrutiranje

- rekrutiranje z Ub označenega substrata
- vezava na Rpn 10 in Rpn13
- razdalja odgovarja 4 Ub
 - razlog, zakaj je signal za proteasom najmanj 4 Ub
 - razlika v afiniteti med 2 Ub in 4 Ub 100x
 - nad 4 Ub ni bitvene razlike



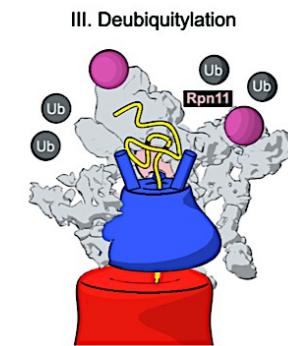
Vezava substrata

- bolj tesna vezava substrata
- Rpt1/2 in Rpt4/5 dimera zanihata/zarotirata (40°)



Deubikvitinacija

- veriga se izpostavi Rpn11 še preden se razvije v AAA-ATPazni votlini (hidroliza za energijo razvijanja)
- odcepi se Ub
- sledi translokacija do CP
- razgradnja substrata



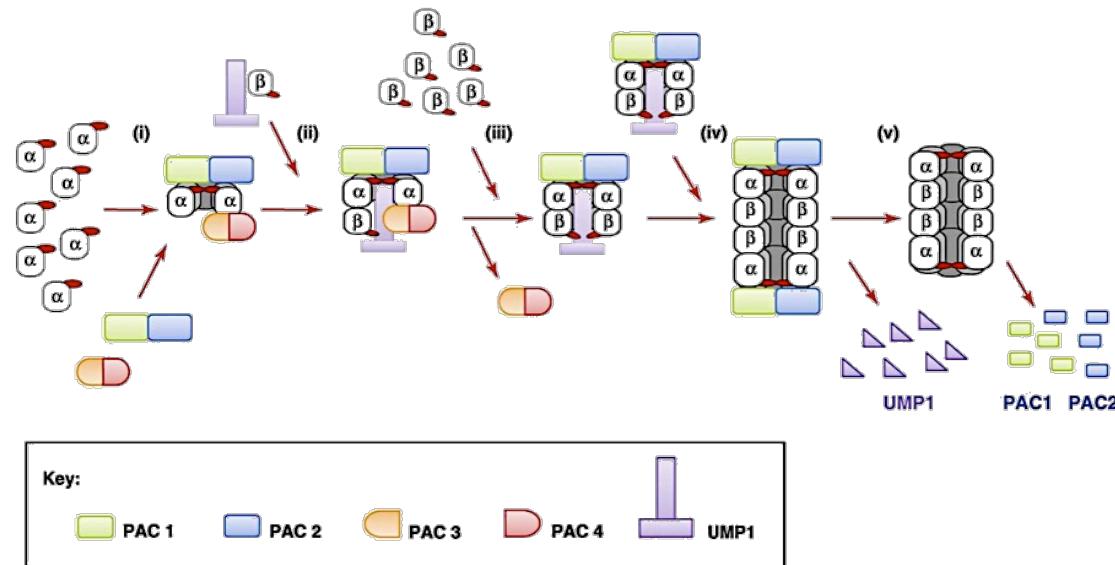
- modeli razgradnje se en clanek
- Functions of the 19S complex in
- proteasomal degradation
- Chang-Wei Liu and Andrew D. Jacobson

Proteasom/ubikvitin – sestavljanje proteasoma

Asociacija CP

Prokarioti

- poteka po urejeni poti/stopnjah
- obroč α -podenot se spontano sestavi
- β -podenote se naložijo na že sestavljen obroč α -podenot
- β -podenote se sintetizirajo kot propeptidi, ki se aktivirajo med sestavljanjem
- končna sestavitev iz dveh polovic, poteče aktivacija β -podenot

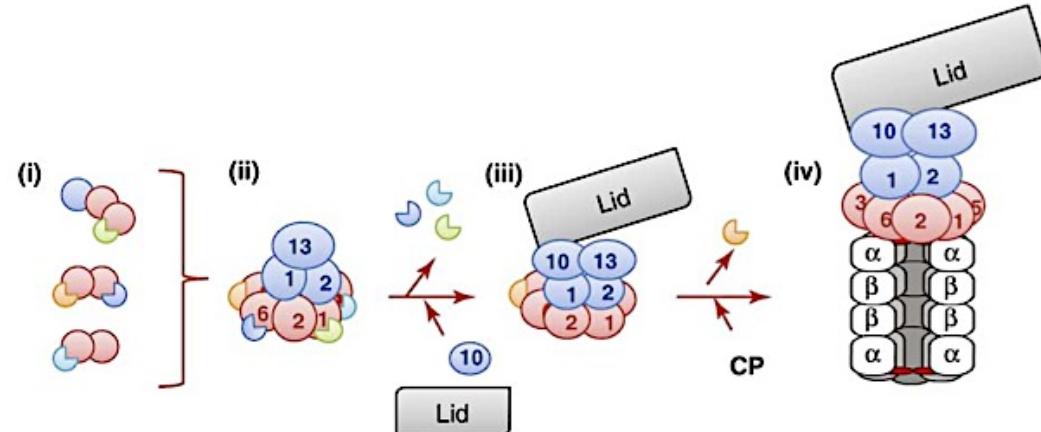


Evkarioti

- sestavljanje je bolj kompleksno, v osnovi enako
- vključuje številne faktorje, šaperone

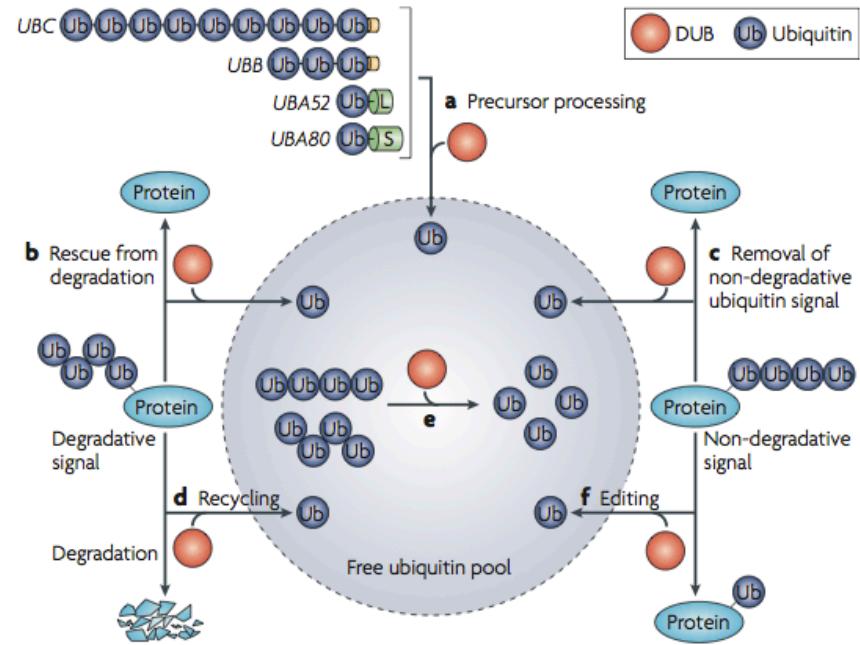
Asociacija RP

- ni veliko poznanega
- sestavljanje pokrova preko dveh večjih kompleksov
 - Rpn5-Rpn6-Rpn8-Rpn9
 - Rpn3-Rpn7-Rpn15
 - Rpn11 in Rpn12
- vključuje številne faktorje, šaperone



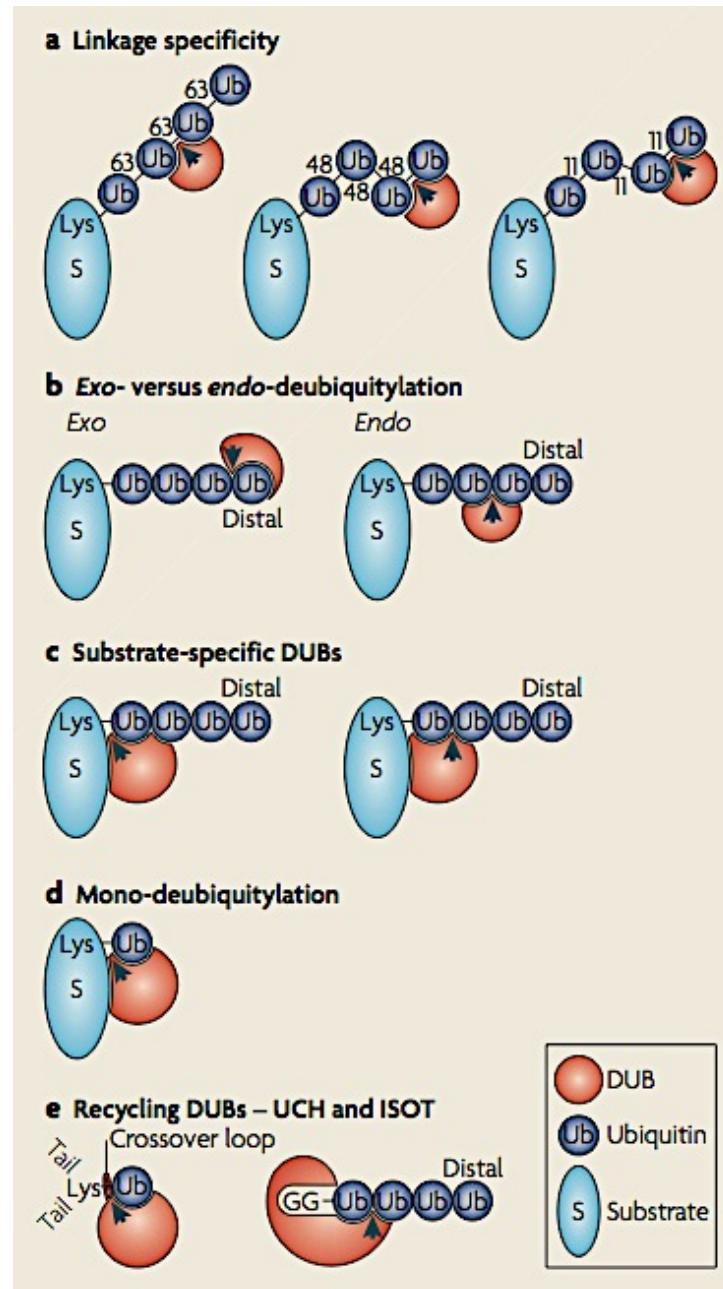
Proteasom/ubikvitin – deubikvitinacija

- človeški genom
 - 600 E3 ligaz
 - 79 deubikvitinaz (DUB)
- najbolj proučene povezave preko Lys48 in Lys63
- deubikvitinaze so zelo raznolike
- razdeljene v 5 razredov
 - ubiquitin C-terminal hydrolase (UBH)
 - ubiquitin specific protease (USP)
 - ovarian tumor protease (OTU)
 - Josephins
 - JAMMS
- vsi razen JAMMS (metaloproteaza) so cisteinske proteaze
- 3 glavne aktivnosti DUB
 - linearna fuzija Ub molekul do prostega Ub
 - odstranjevanje s posttranslacijsko modificiranih proteinov
 - s signalom za razgradnjo
 - brez vloge signala za razgradnjo



Proteasom/ubikvitin – specifičnost deubikvitinacije

- DUB izkazujejo specifičnost na več nivojih
 - različno povezane Ub-verig
 - mestna specifičnost (endo/ekso)
 - substratna specifičnost
 - mono/poli ubikvitinacija
 - Ub za recikliranje
 - izopeptidne vezi/linearni peptid
 - Ub-podobne molekule



Degradacijski signali (degron)

1. Pravilo N-zaporedja - prepozna E3

- E3 prepozna tri vrste N-končnih zaporedij:
 - substrate z bazičnimi a.k. na N-koncu
 - substrate s hidrofobnimi a.k. na N-koncu
 - prepoznavanje substratov po drugem sistemu (N- α -acetilacija- hitreje se razgradijo prosti N-konci)
- proteini s kratko življensko dobo (< 3min) imajo najpogosteje Arg, Lys, Phe, Leu ali Trp
- proteini z dolgo življensko dobo (>30 ur) imajo najpogosteje Cys, Ala, Ser, Thr, Gly, Val ali Met

2. Fosforilacija substratov in/ali encimov za ubikvitinacijo

- Fosforilacija je lahko signal za razgradnjo ali pa prepreči razgradnjo

3. Nenormalni/mutirani/narobe zviti proteini

- Kotranslacijska razgradnja (30%) → hidrofobni signal?

4. Značilna zaporedja

D-predel razgradnje (D=destruction)

R-(A/T)-(A)-L-(G)-X(D)-(I/V)-(G/T)-(N) (R in L sta ednina nespremenljiva ak preostanka)

PEST elementi

- območja bogata z Pro (P), Glu (E), Ser (S), Thr (T)
- pogosto vsebujejo tudi fosforilacijsko mesto potrebno pri razgradnji
- začetne stopnje se odvijajo preko protein kinaze, temu pa sledi prepoznavanje z E3 Ub ligazo

KFERQ

za vnos v lizosom

SSSTDSTP

prisotno pri transkripcijskih faktorjih

5. Specifični faktorji