

Razgradnja proteinov

Voet 3: poglavje 32.6

Razgradnja proteinov (proteoliza)

- razgradnja v prebavilih
- razgradnja v celici
- *in vitro*

Proteolitični encimi (proteinaze)

- Sistematika na osnovi mehanizma (oz. AK v aktivnem centru): serinske, cisteinske (tiolne), aspartatne, glutamatne, treoninske, metalo~, mešanega tipa, z neznanim mehanizmom
- Klasifikacija MEROPS: razdelitev na klane in družine glede na mehanizem in evolucijsko sorodnost

Switch to
Inhibitors

Peptidase

Name

Identifier

Gene name

Organism

Substrates

Family

Clan

SEARCHES

BLAST
MEROPSBATCH
BLAST

SUBMISSIONS

Other
information

What's New

About

Images

EST cell lines

Unsequenced

Genomes

Statistics

Distribution

PepList

Download

Community

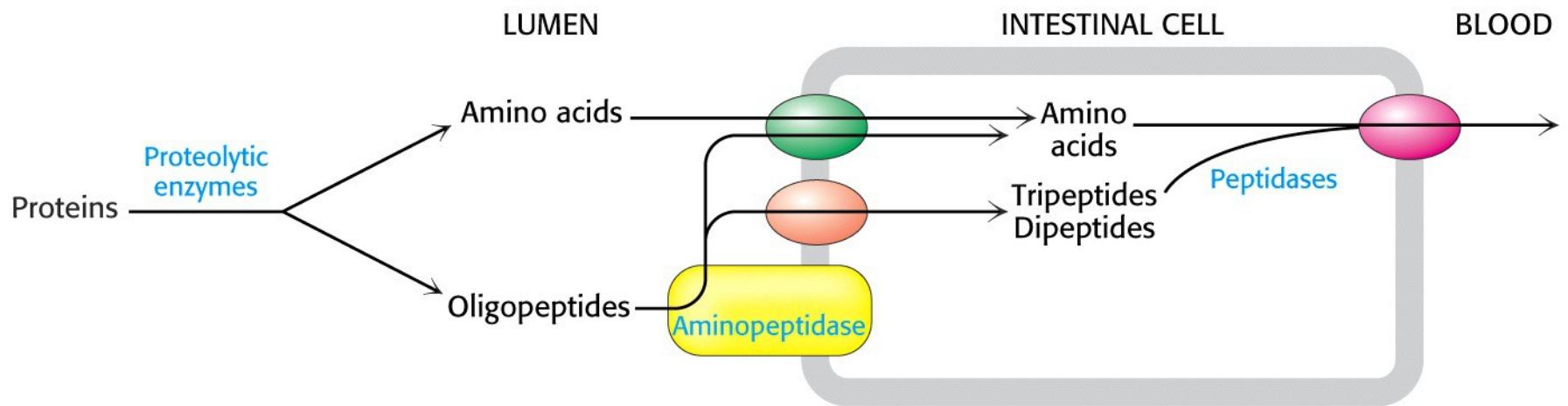
MEROPS blog

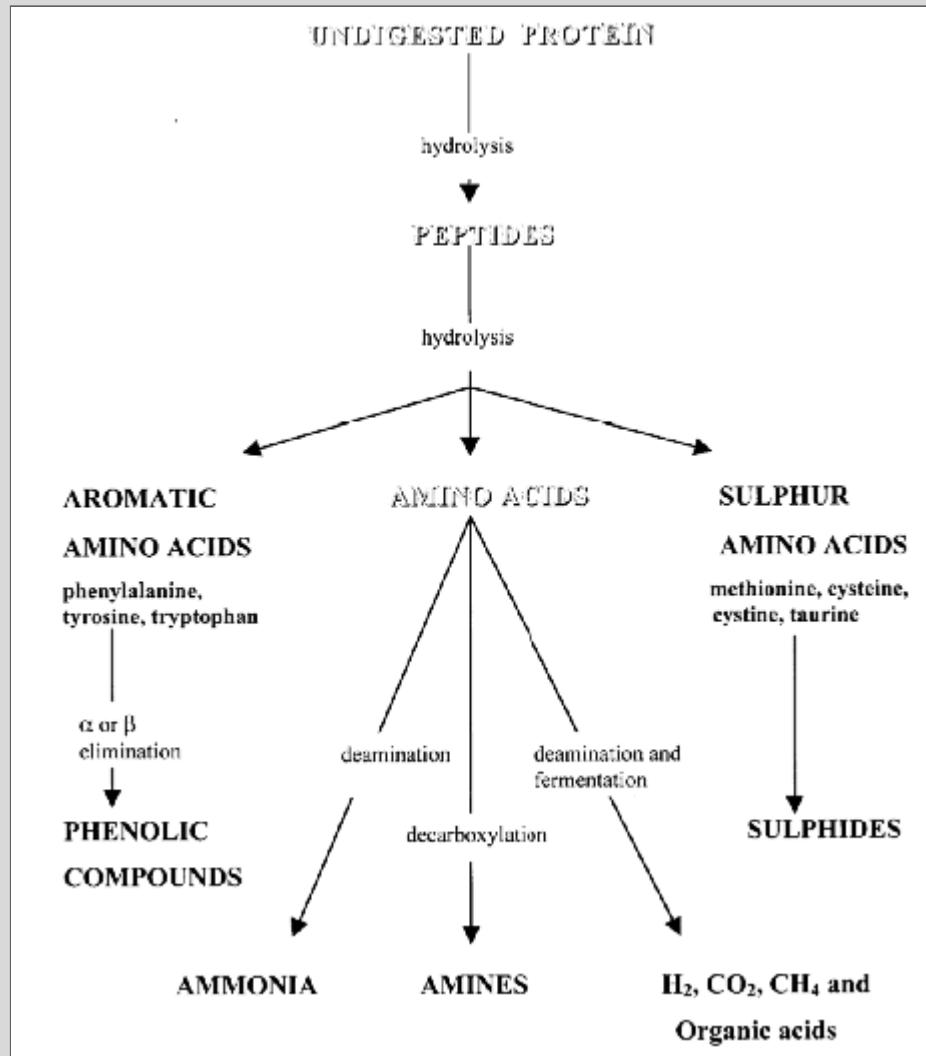
Clans of Peptidases

A clan contains all the modern-day peptidases that have arisen from a single evolutionary origin of peptidases. It represents one or more families that show evidence of their evolutionary relationship by their similar tertiary structures, or when structures are not available, by the order of catalytic-site residues in the polypeptide chain and often by common sequence motifs around the catalytic residues. Each clan is identified with two letters, the first representing the catalytic type of the families included in the clan (with the letter "P" being used for a clan containing families of more than one of the catalytic types serine, threonine and cysteine). Some families cannot yet be assigned to clans, and when a formal assignment is required, such a family is described as belonging to clan A-, C-, M-, S-, T- or U-, according to the catalytic type. Some clans are divided into subclans because there is evidence of a very ancient divergence within the clan, for example MA(E), the gluzincins, and MA(M), the metzincins.

[Aspartic](#), [Cysteine](#), [Glutamic](#), [Metallo](#), [Asparagine](#), [Mixed](#), [Serine](#), [Threonine](#), [Unknown](#),

Clan of Aspartic Peptidases			
CLAN	FAMILY	TYPE PEPTIDASE	STRUCTURE
AA	A1	pepsin A (<i>Homo sapiens</i>)	Yes
	A2	HIV-1 retropepsin (human immunodeficiency virus 1)	Yes
	A3	cauliflower mosaic virus-type peptidase (cauliflower mosaic virus)	-
	A9	spumapepsin (human spumaretrovirus)	Yes
	A11	Copia transposon peptidase (<i>Drosophila melanogaster</i>)	-
	A33	skin aspartic protease (<i>Mus musculus</i>)	-
AC	A8	signal peptidase II (<i>Escherichia coli</i>)	-
AD	A22	presenilin 1 (<i>Homo sapiens</i>)	-
	A24	type 4 prepilin peptidase 1 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	-
AE	A25	gpr peptidase (<i>Bacillus megaterium</i>)	Yes
	A31	HybD peptidase (<i>Escherichia coli</i>)	Yes
AF	A26	omptin (<i>Escherichia coli</i>)	Yes
unassigned	A5	thermopsin (<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)	-
Clan of Cysteine Peptidases			
CLAN	FAMILY	TYPE PEPTIDASE	STRUCTURE
CA	C1	papain (<i>Carica papaya</i>)	Yes
	C2	calpain-2 (<i>Homo sapiens</i>)	Yes
	C10	streptopain (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	Yes
	C12	ubiquitinyl hydrolase-L1 (<i>Homo sapiens</i>)	Yes
	C16	murine hepatitis coronavirus papain-like peptidase 1 (murine hepatitis virus)	Yes
	C19	ubiquitin-specific peptidase 14 (<i>Homo sapiens</i>)	Yes
	C28	foot-and-mouth disease virus L-peptidase (foot-and-mouth disease virus)	Yes
	C39	bacteriocin-processing peptidase (<i>Pediococcus acidilactici</i>)	Yes
	C47	staphopain A (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Yes
	C51	D-alanyl-glycyl peptidase (<i>Staphylococcus aureus</i>)	-
	C54	autophagin-1 (<i>Homo sapiens</i>)	Yes
	C58	YopT peptidase (<i>Yersinia pestis</i>)	Yes
	C64	Cezanne deubiquitylating peptidase (<i>Homo sapiens</i>)	Yes
	C65	otubain-1 (<i>Homo sapiens</i>)	Yes





Curr. Issues Intest. Microbiol. 2000

Presnova proteinov v debelem revesju

Razgradnja proteinov v celici

- odstranjevanje za celico nefunkcionalnih ali nevarnih proteinov
- uravnavanje celičnega metabolizma
(odstranjevanje nepotrebnih encimov in regulatorjev)

Koncentracija proteina v celici/ organizmu je odvisna od hitrosti sinteze **in** hitrosti razgradnje!

Enzyme	Half-life (h)
<i>Short-Lived Enzymes</i>	
Ornithine decarboxylase	0.2
RNA polymerase I	1.3
Tyrosine aminotransferase	2.0
Serine dehydratase	4.0
PEP carboxylase	5.0
<i>Long-Lived Enzymes</i>	
Aldolase	118
GAPDH	130
Cytochrome <i>b</i>	130
LDH	130
Cytochrome <i>c</i>	150

Source: Dice, J.F. and Goldberg, A.L., *Arch. Biochem. Biophys.* **170**, 214 (1975).

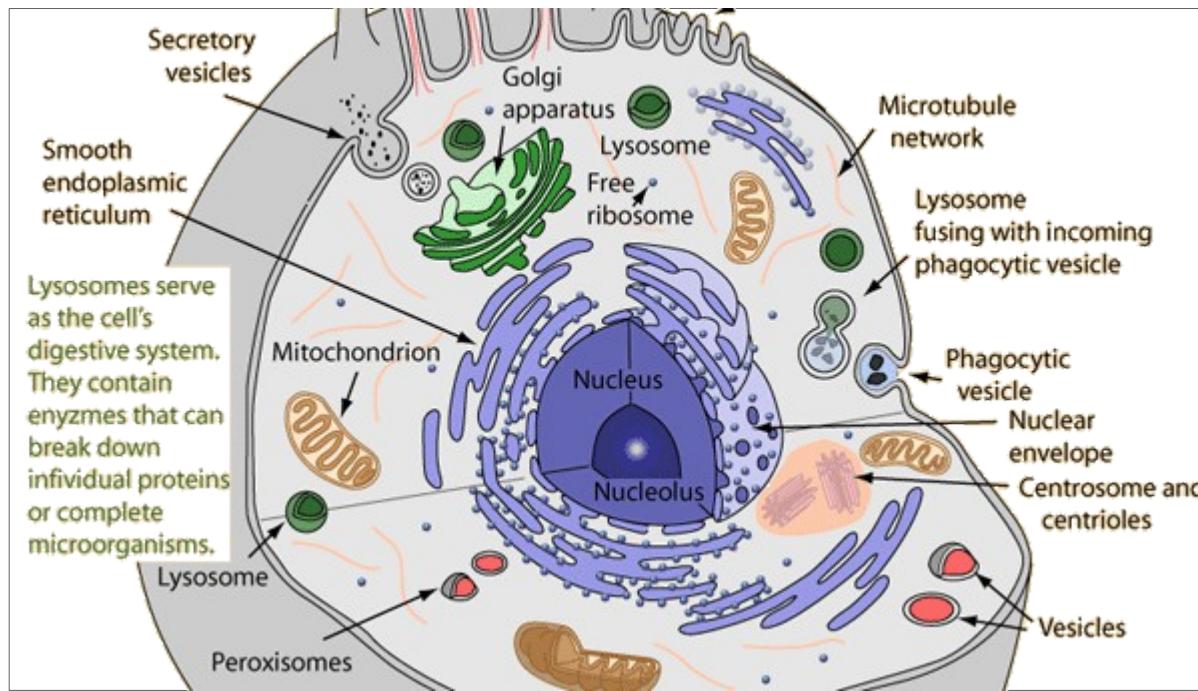
Razpolovni asi nekaterih jetrnih encimov pri podganah.

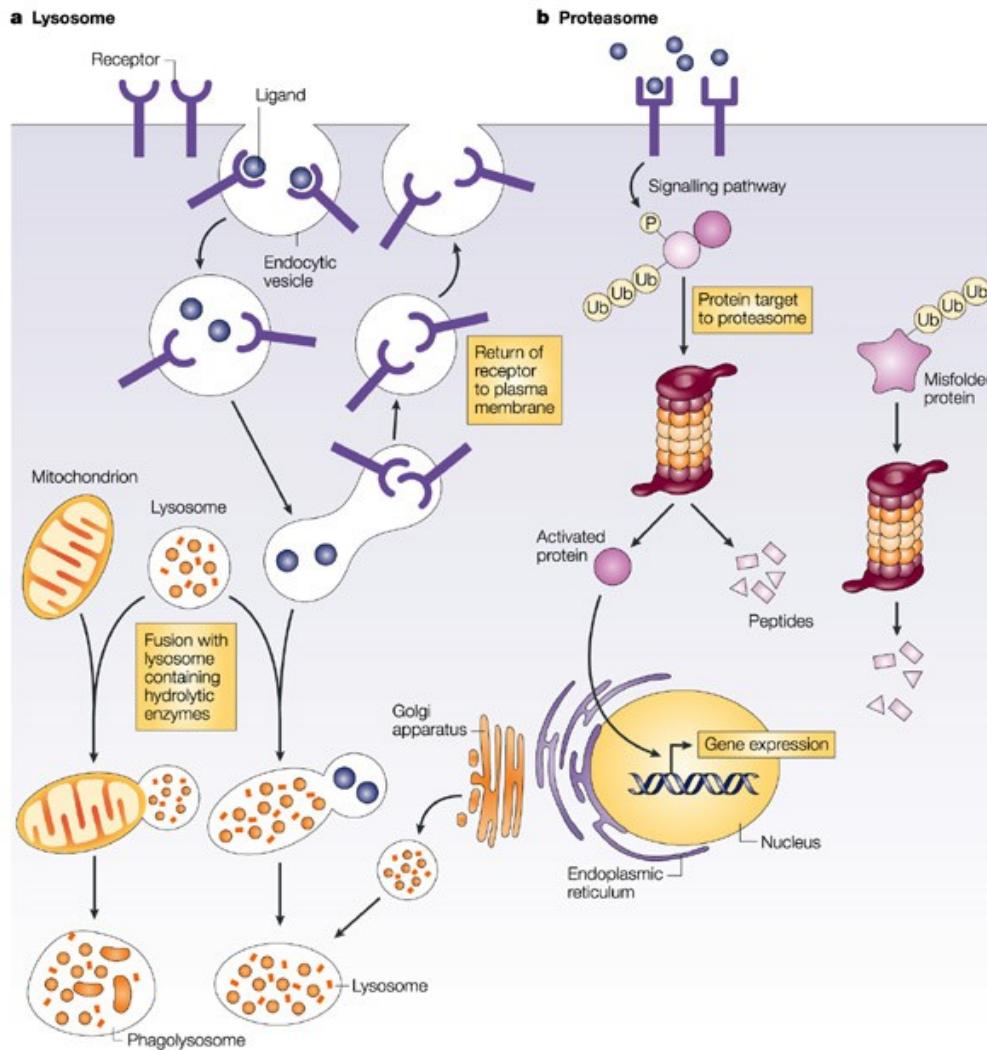
Znotrajcelična razgradnja:

- v lizosilih (nespecifična razgradnja)
- v citosolu (razgradnja z U_Q označenih proteinov v proteasomu; od ATP odvisni mehanizmi)

Lizosomska razgradnja: predvsem zunajcelični proteini, ki vstopajo z endocitozo, sodelujejo pa tudi pri autofagocitozi (fuzija z fagosomi; = autofagija).

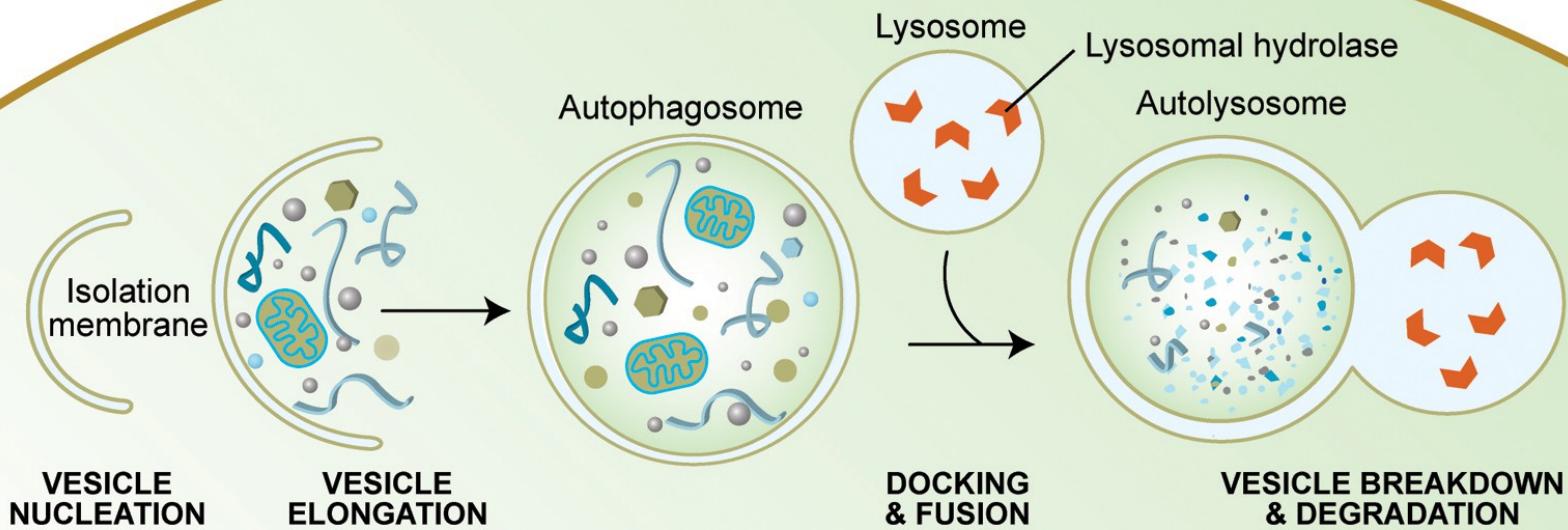
Citosolna razgradnja: predvsem za znotrajcelične proteine, ki so nepravilno zviti ali označeni za razgradnjo kot posledica fosforilacijskih signalnih kaskad.





Nature Reviews | Cancer

Znotrajceli na razgradnja: v lizosomih (nespecifična razgradnja) ali
v citosolu (razgradnja označenih proteinov)



http://www.wormbook.org/chapters/www_autophagy/autophagy.html

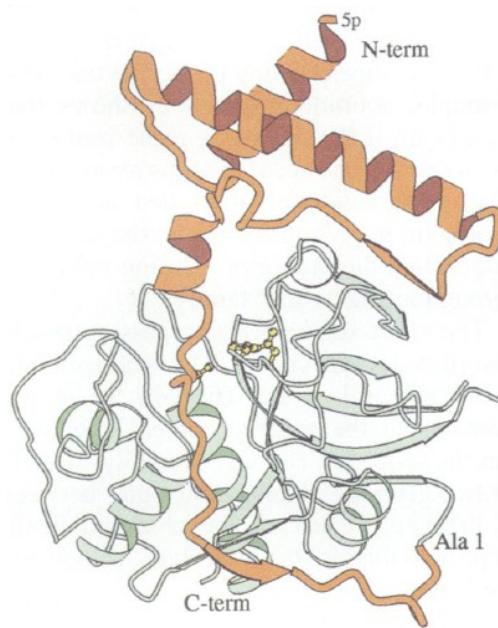
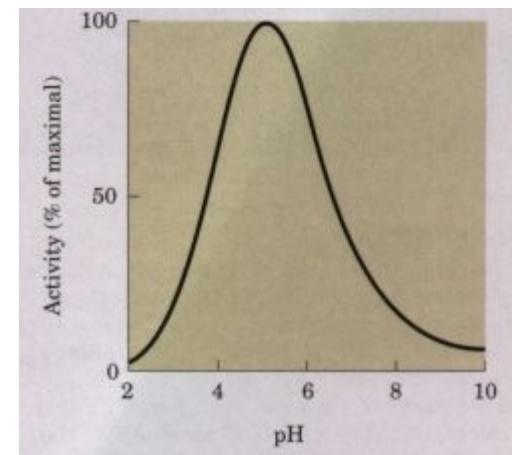
Shematski prikaz avtografije

Lizosomi vsebujejo številne hidrolaze (~50 različnih), med njimi proteinaze s skupnim imenom katepsini.

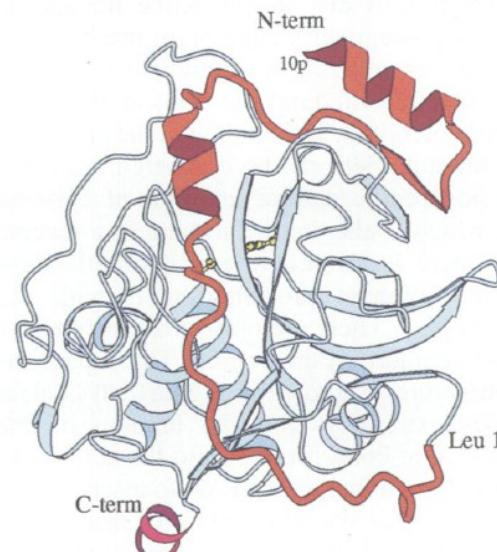
Zaradi nizkega pH v lizosomih imajo katepsini pH-optimum v kislem.

Katepsini so večinoma cisteinske proteinaze, obstajajo pa tudi aspartatne (in serinske). Sintetizirajo se v neaktivni obliki – s propeptidom, ki prekriva aktivno mesto.

V procesu aktivacije se propeptid odcepi.

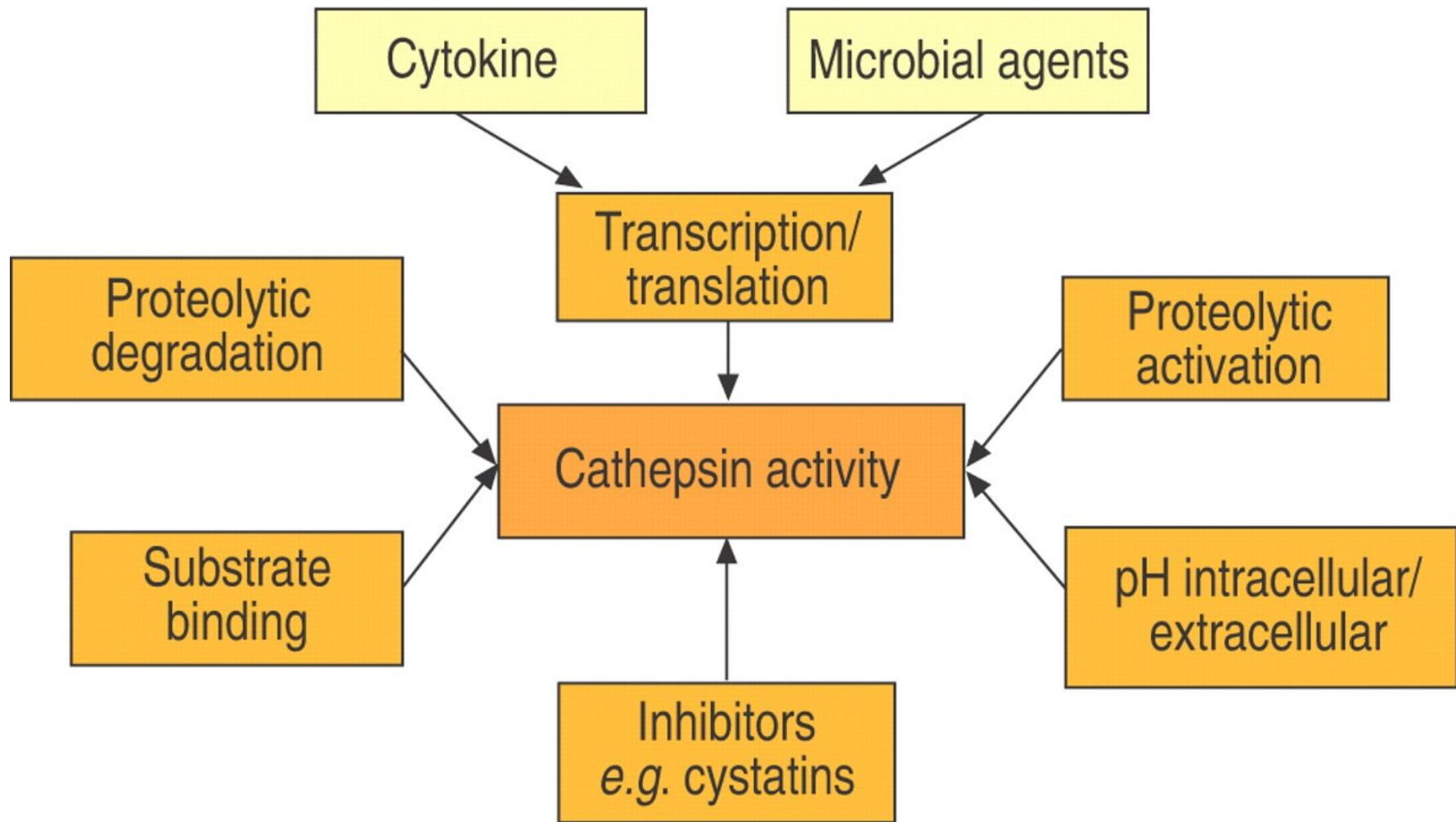


pcatL



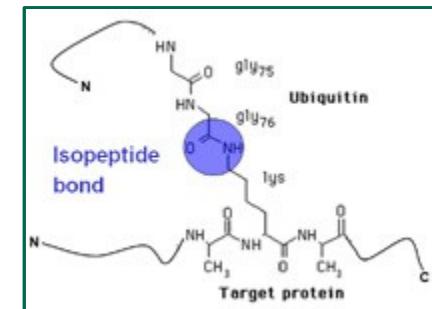
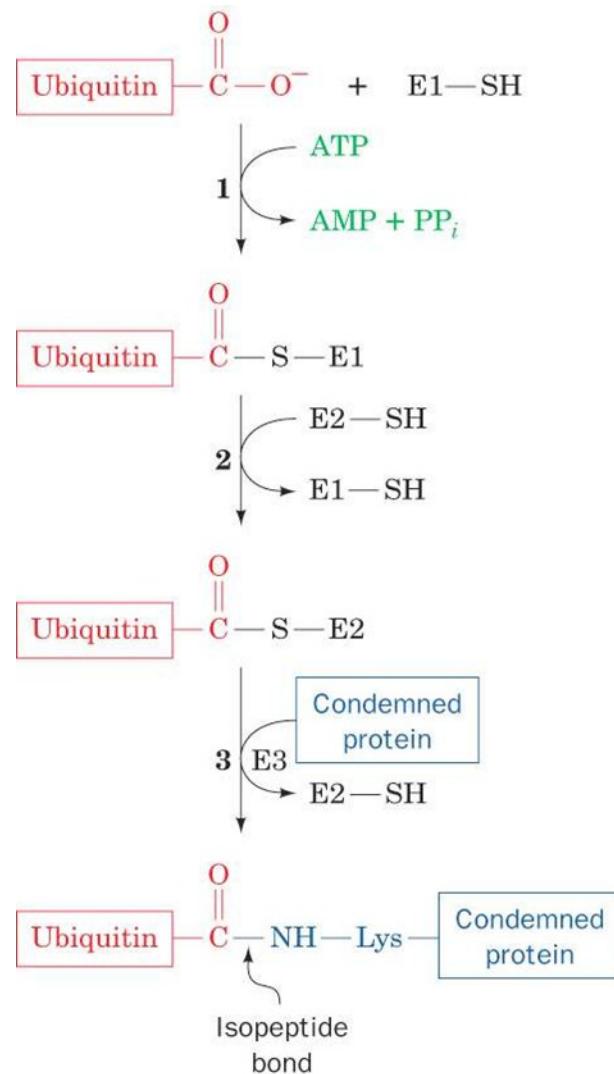
pcatB

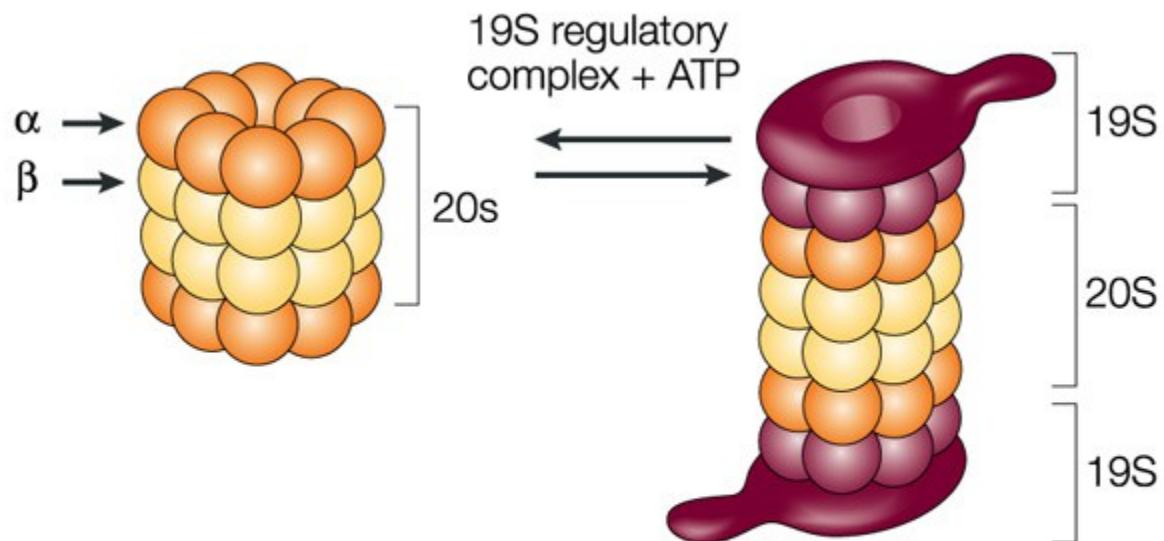
Coulombe et al., EMBO J. 1996



Regulacija encimske aktivnosti katepsinov (Bühling et al., 2004)

Ubikvitinacija





Nature Reviews | Cancer

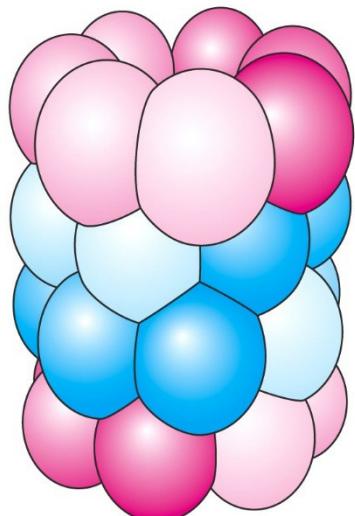
Shematski prikaz zgradbe proteasoma
26 S \approx 2100 kDa, 20 S \approx 670 kDa, 19 S \approx 700 kDa

Razgradnja proteinov v proteasomu 20 S poteka samo, če je tarčni protein nezvit in ob porabljanju ATP.

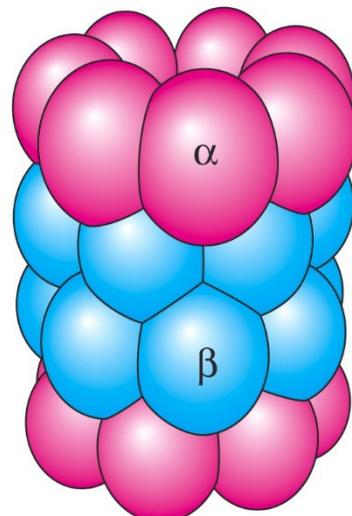
Vloga kape (19 S) je prepoznavanje ubikvitiniranih proteinov in njihovo razvitje.

V obroč nameščenih 6 podenot ima ATPazno aktivnost. ATP je potreben tako za prepoznavanje substratov, kot za razvijanje proteinov in odpiranje kanala za vstop substrata v notranje votline.

Proteasomi 20 S so prisotni ne samo v citoplazmi, pač pa tudi v jedru. Mehanizem cepitve proteinov je poseben, s Thr v aktivnem centru.

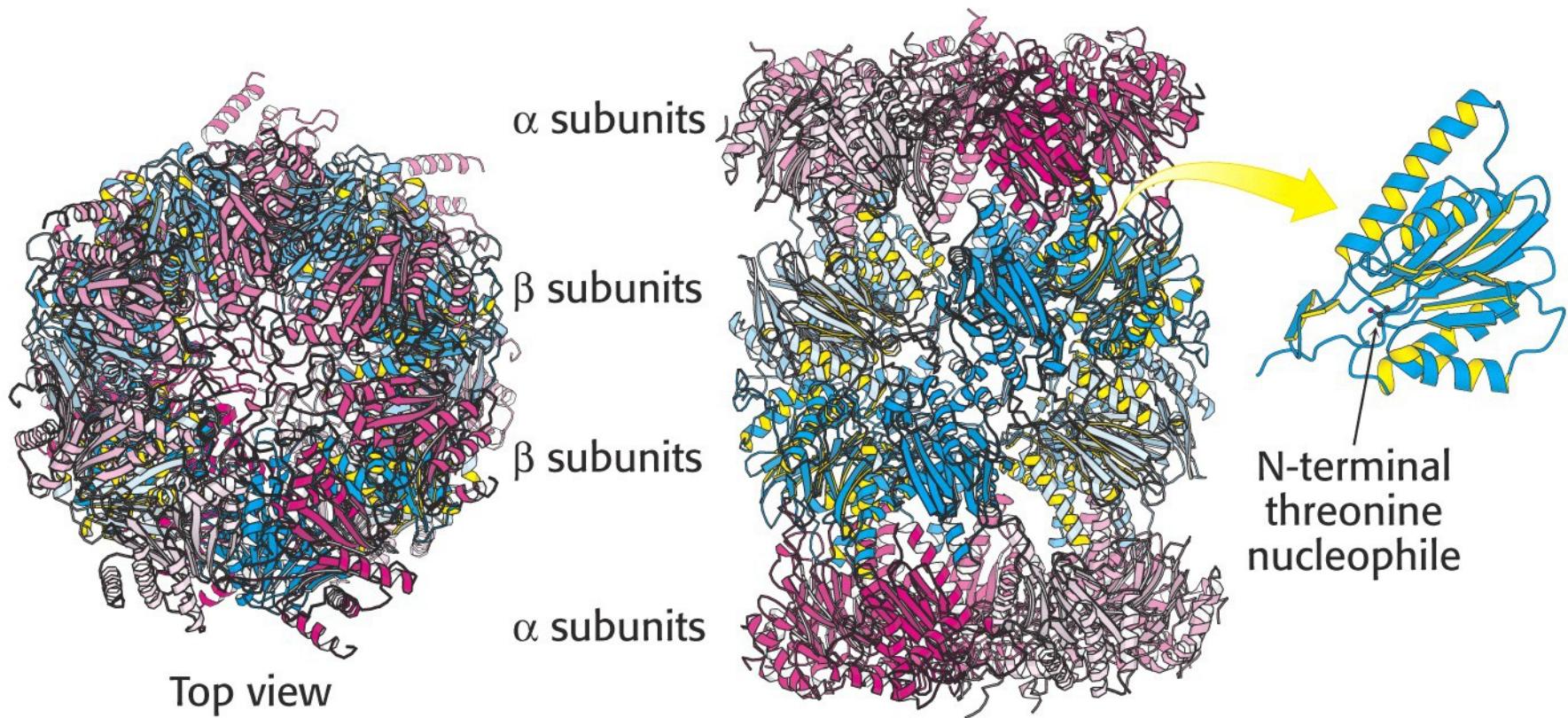


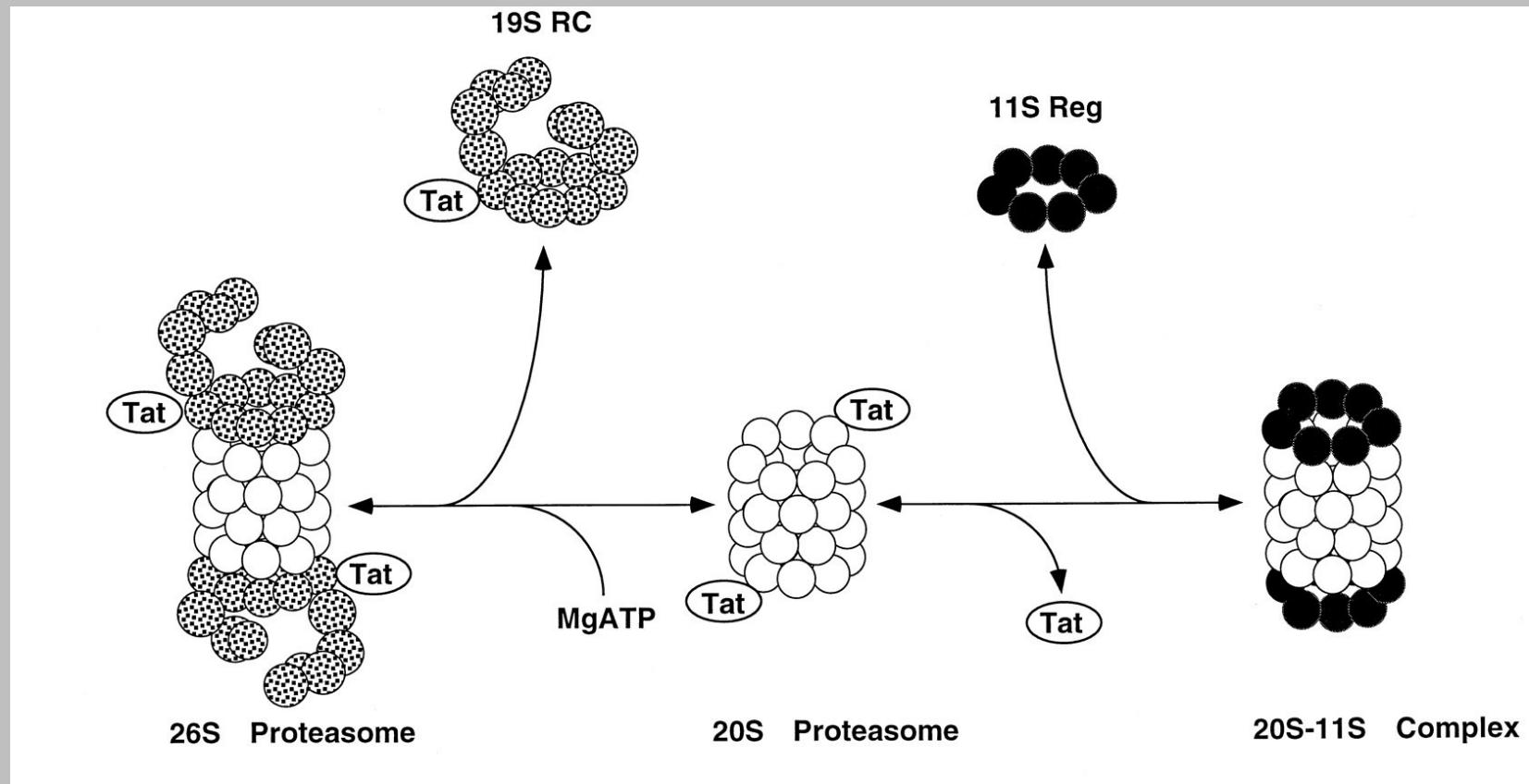
Eukaryotic proteasome



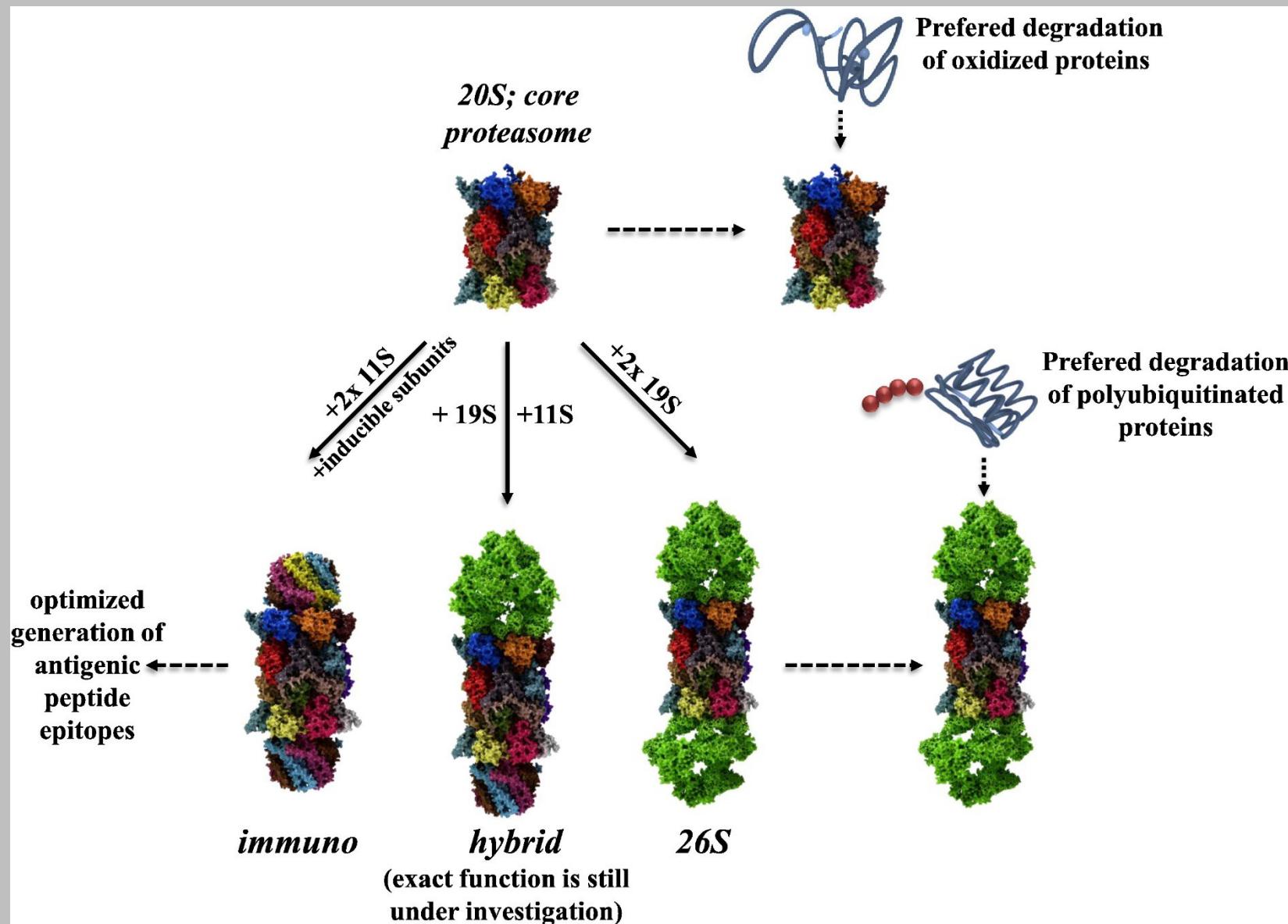
Archaeal proteasome

Zgradba osrednjega dela proteasoma



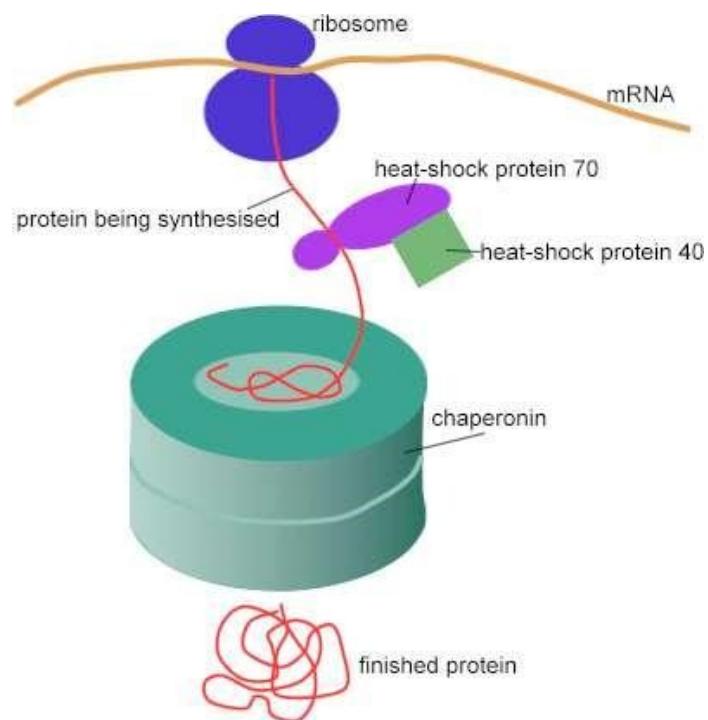


Dodajanje regulatorja 11 S na proteasom 20 S pri višjih evkarijontih



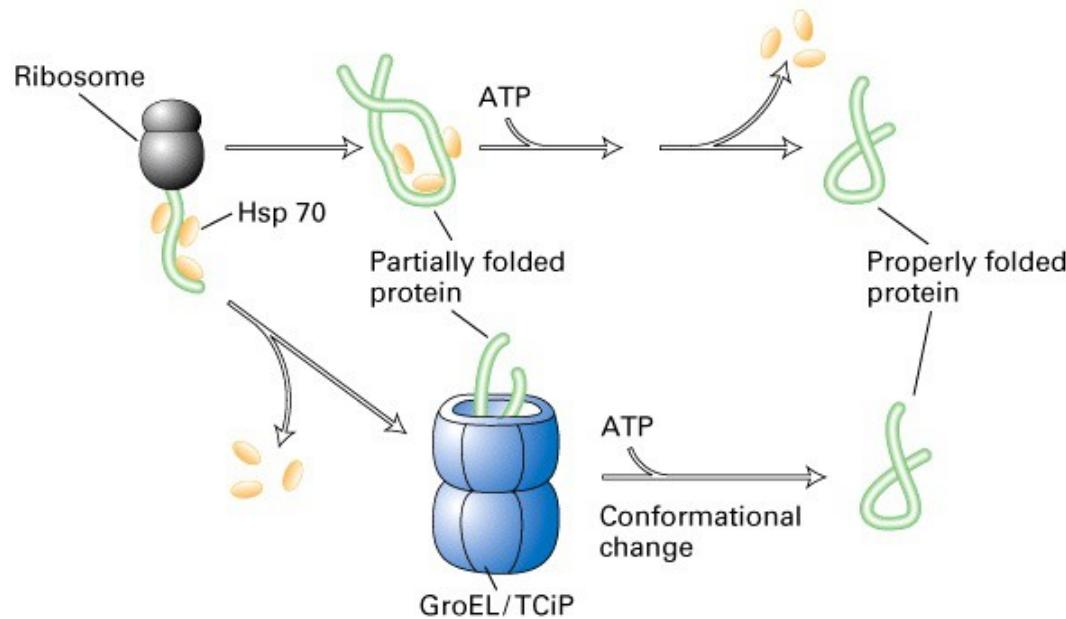
Molekulske šaperoni

- preprečujejo nastajanje agregatov nezvitih proteinov v celici
- delujejo predvsem na večdomenske proteine in proteine z več podenotami
- vežejo se na izpostavljena hidrofobna področja, ki so izpostavljena topilu
- pogosto imajo ATPazno aktivnost
- med šaperone spada več nesorodnih razredov proteinov



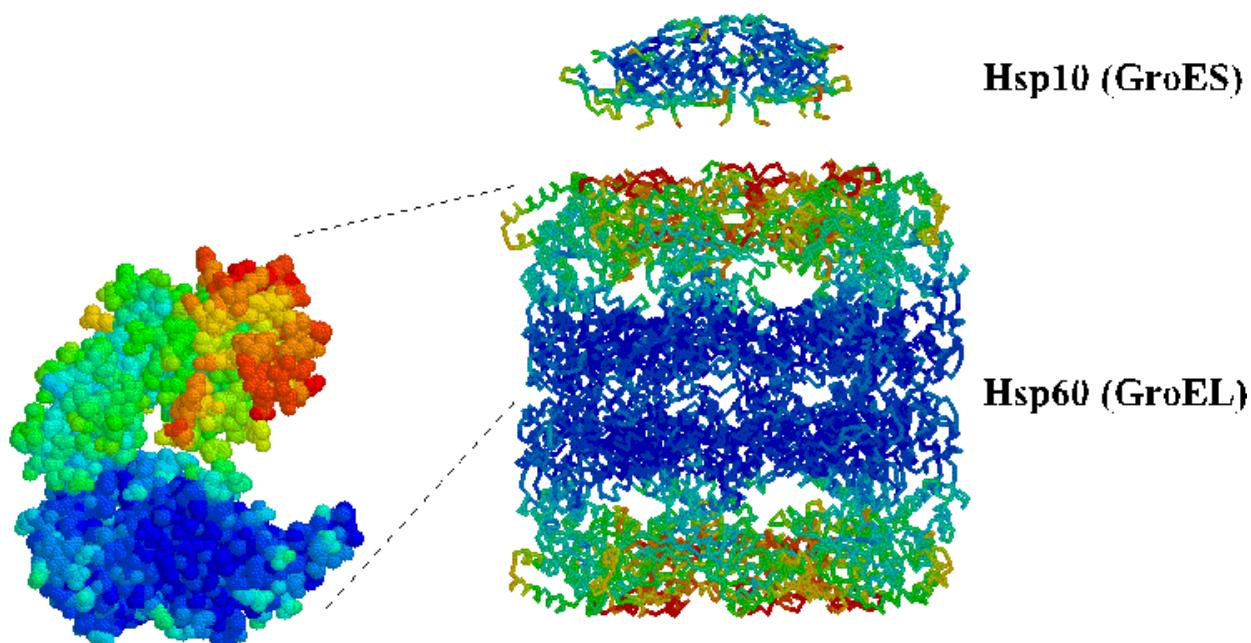
Razredi molekulskih šaperonov

- **Hsp70** (70 kDa, monomerni, se povezujejo s košaperoni Hsp40)
- **šaperonini** (več podenot, oblika kletke → obdajo protein, ki se zvije v notranjosti kletke)
- **Hsp90** (pomagajo predvsem pri zvijanju proteinov, ki sodelujejo pri prenosu signalov)
- **nukleoplazmini** (jedrni, za pravilno sestavljanje nukleosomov)

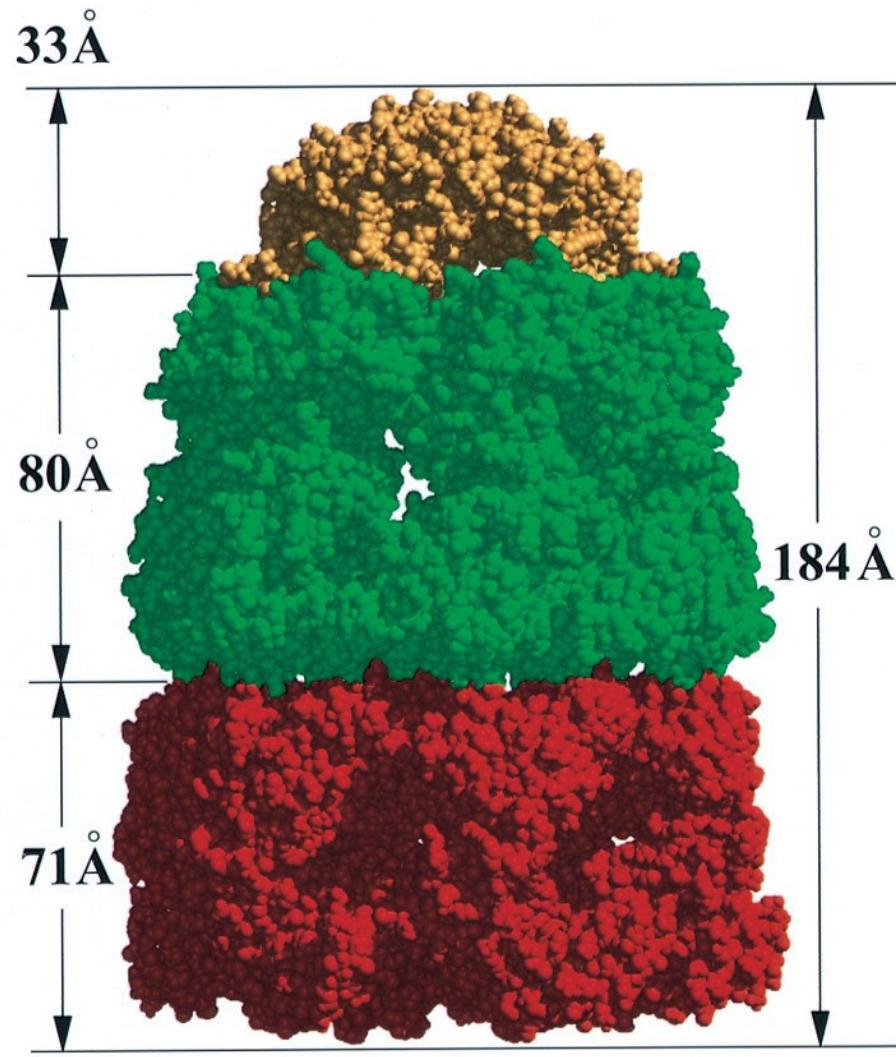


Šaperonini

- **dve družini:**
 - Hsp60 (GroEL pri *E. coli*, Cpn60 v kloroplastih): 14 x 60 kDa
 - Hsp10 (GroES, Cpn10): heptamer (7 x 10 kDa) kot prstan

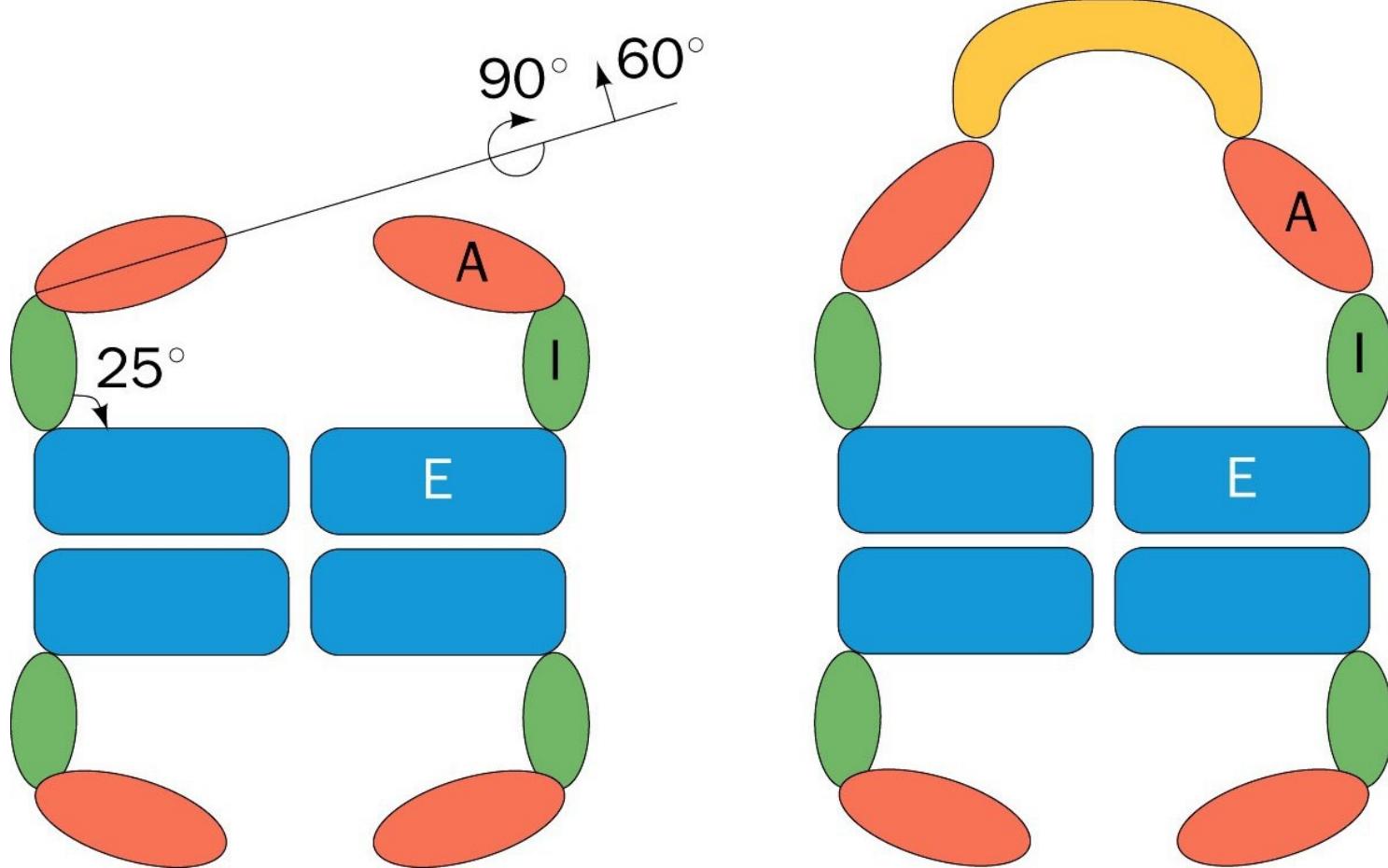


Vsaka od 14 podenot Hsp60 v dveh obročih ima dve domeni (ena je nad drugo).



Courtesy of Paul Sigler, Yale University

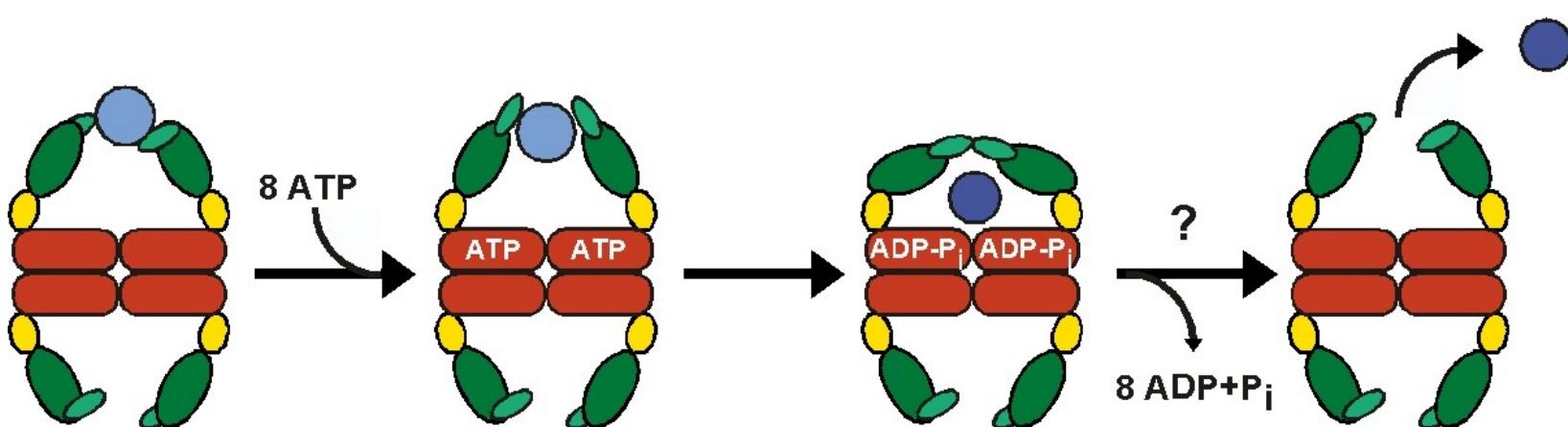
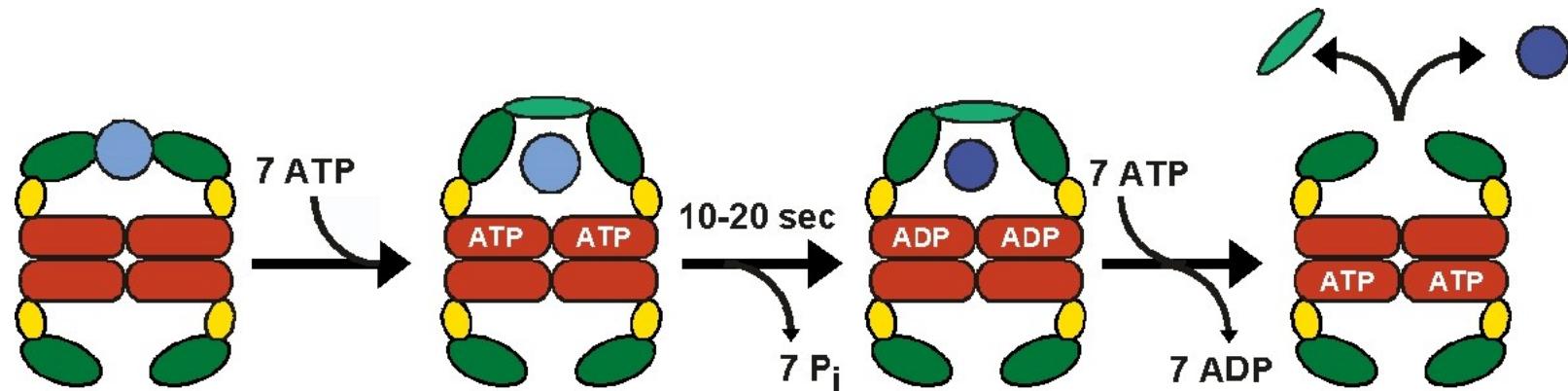
Sestavljanje kompleksa GroEL2-GroES – (ADP)7.

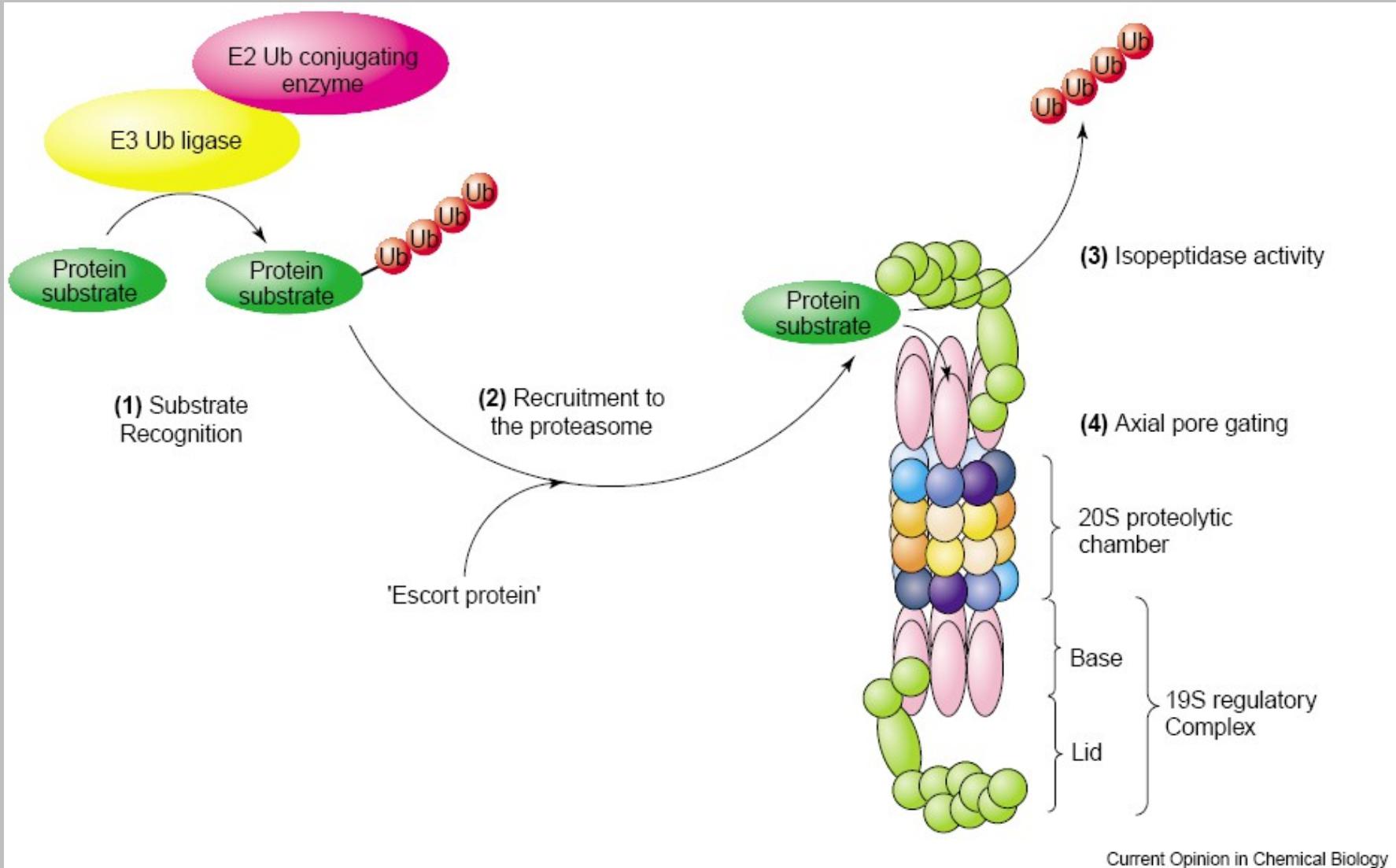


Konformacijske spremembe ob vezavi Gro**ES**: volumen votline se več kot podvoji.
 E=ekvatorska domena, I=indermediarna, A=apikalna. Votlina lahko sprejme ~70 kDa velik protein.

Šaperonini

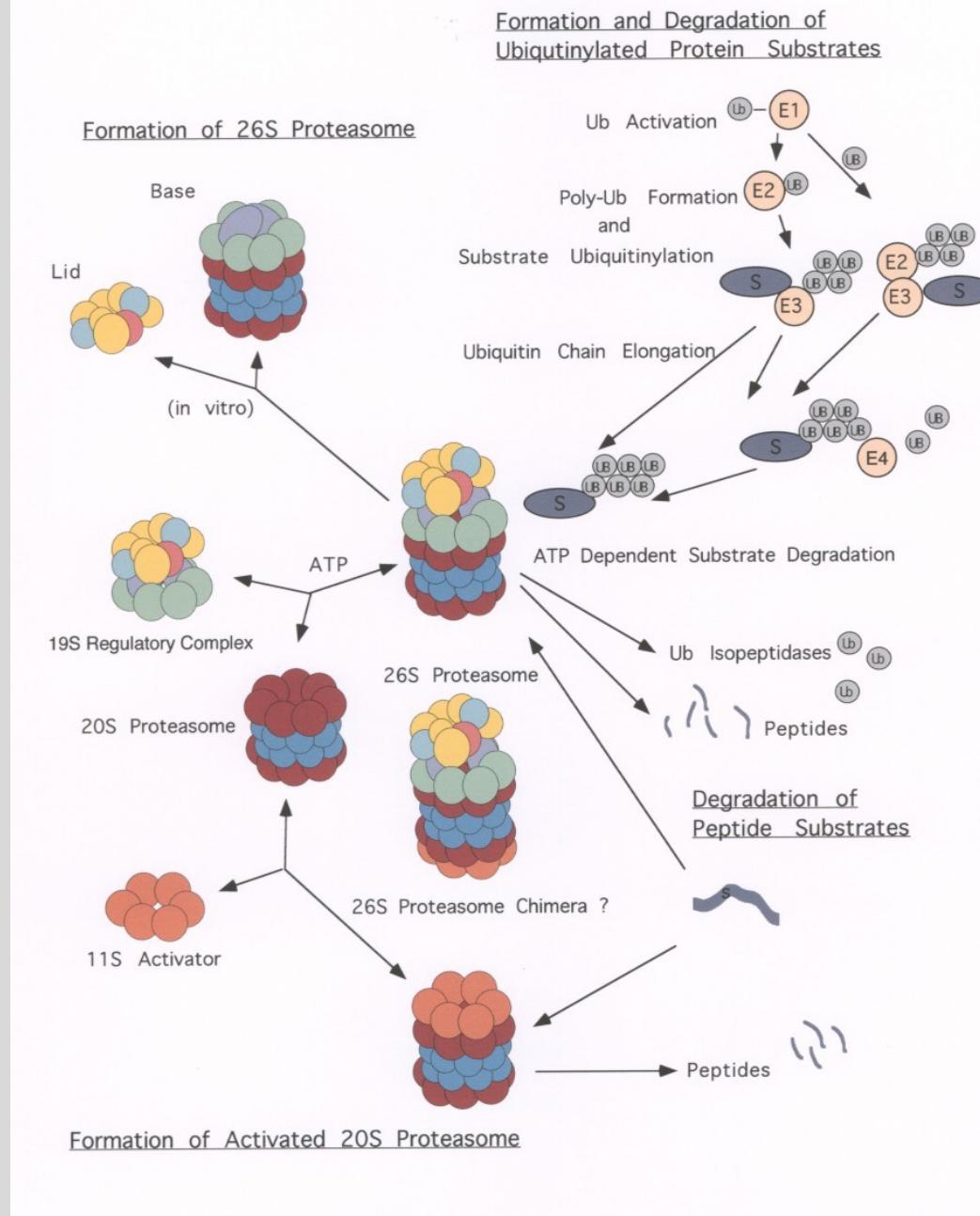
- skupina I (bakterije, organeli): košaperon deluje kot pokrov, ki zapira kletko
- skupina II (arheje, evkarijonti): zapiranje izvede poseben segment apikalnih domen

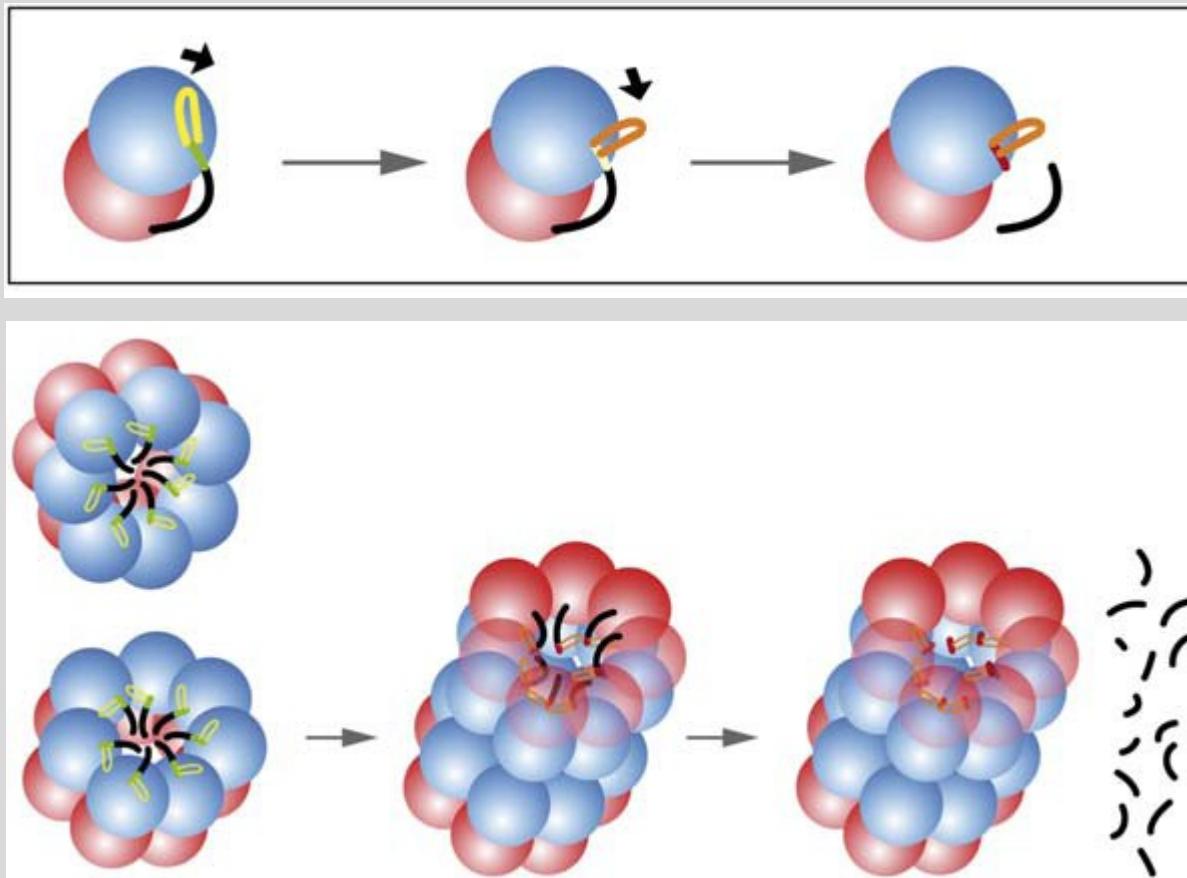




Označeni substrati se vežejo na pokrov (19 podenot), kjer se veriga Uq odcepi, nato pa pride do razvitja substratne molekule in odprtja pore, pri čemer sodeluje obroč 6 iz podenot, vezanih na podenote alfa.

26S Proteasome Assembly and Substrate Formation Pathways



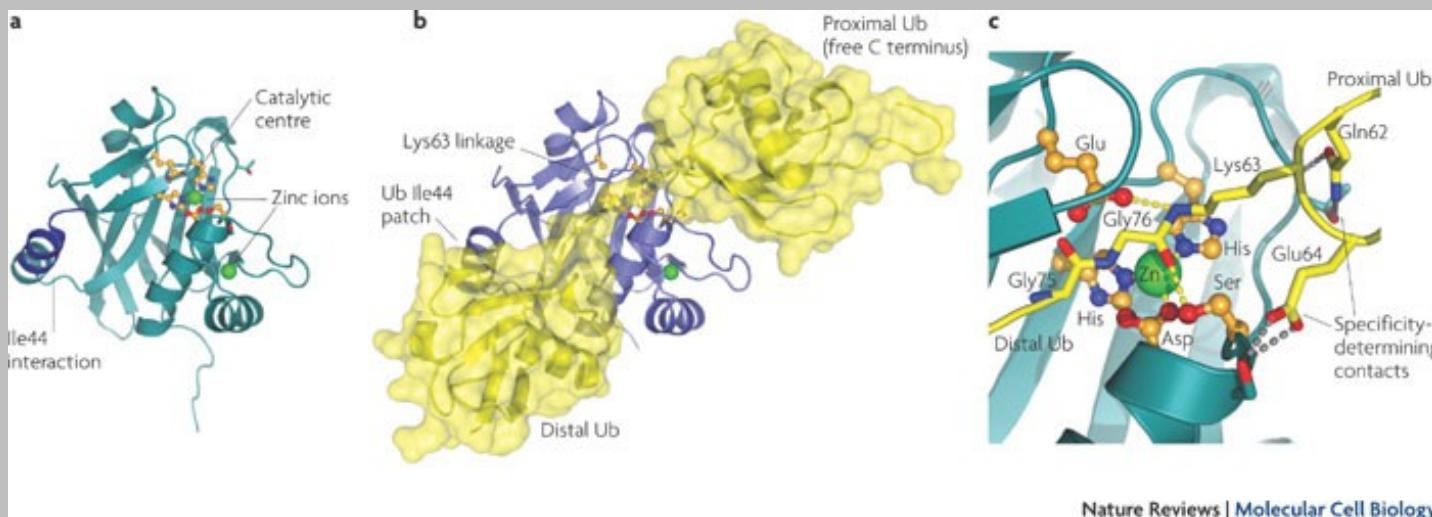


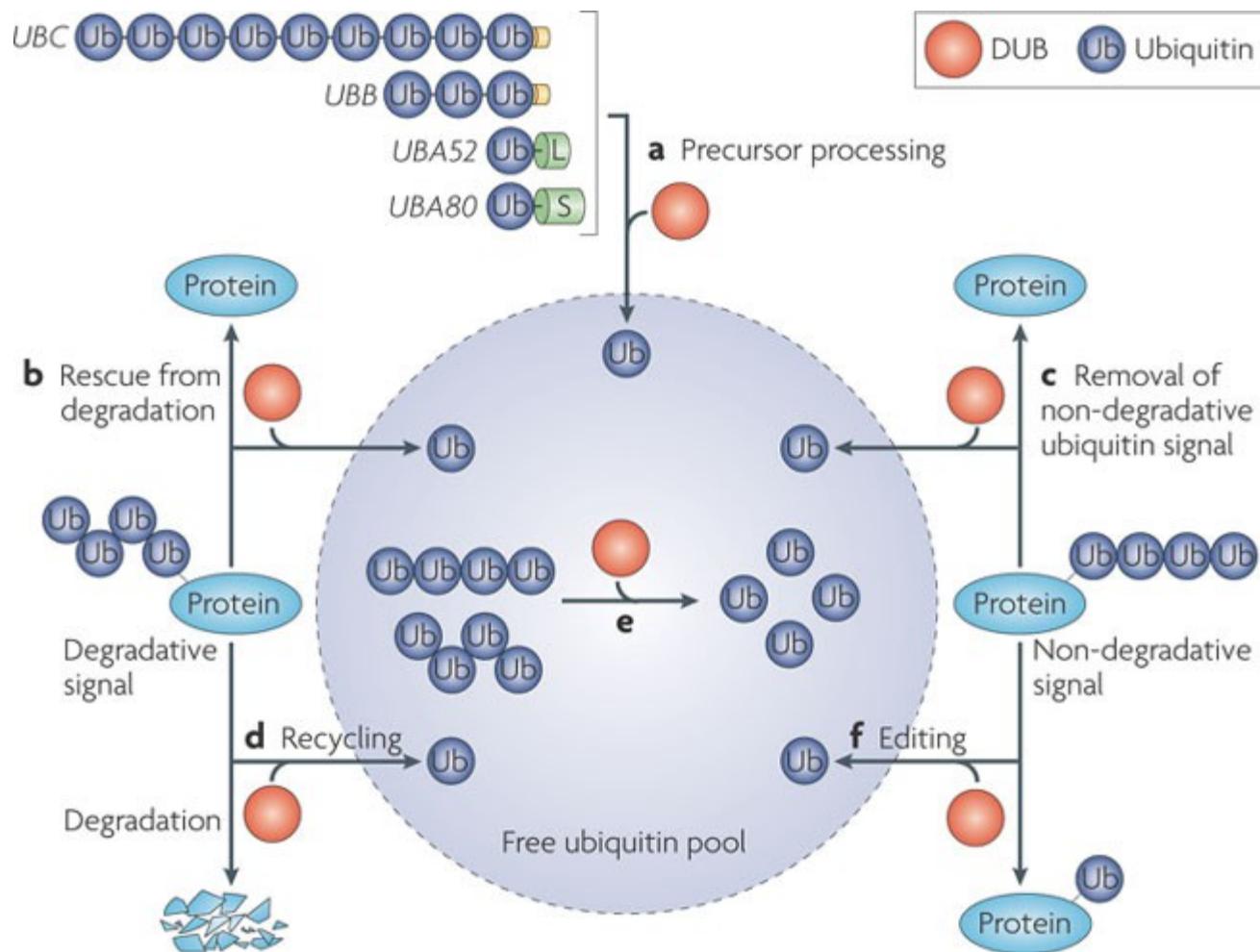
Structure 14, 1179–1188, 2006

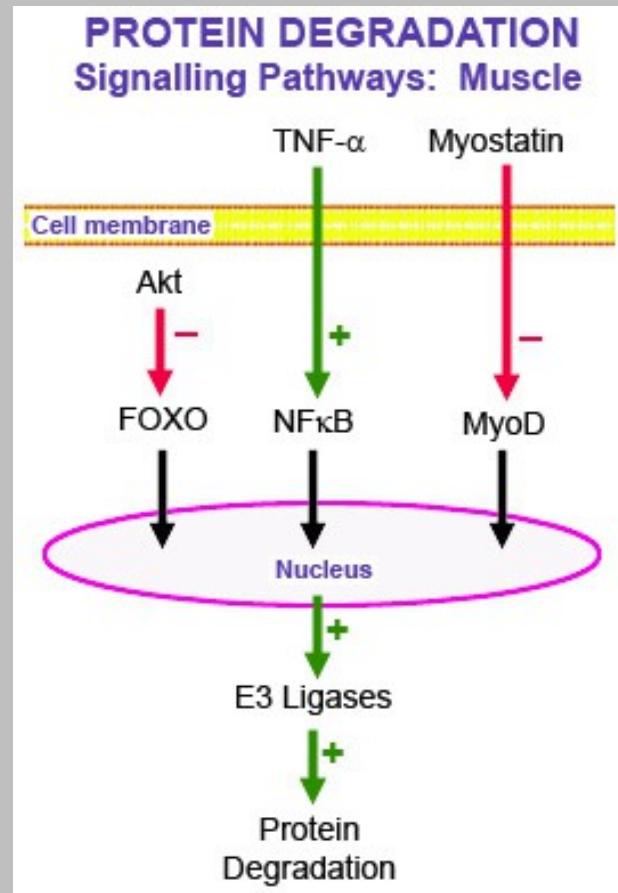
Sestavljanje proteasoma 20 S iz dveh pol-proteasomov in aktivacija pro- v aktivne podenote beta z odcepom propeptida.

Pred vstopom tarčnega proteina v lumen se Uq odstranijo ob delovanju deubikvitinaze (DUB), ki je ena od podenot kape in je metaloproteinaza.

Obstajajo tudi proste DUB, ki lahko podaljšajo življenjsko dobo proteina.
Večinoma so cisteinske proteinaze.

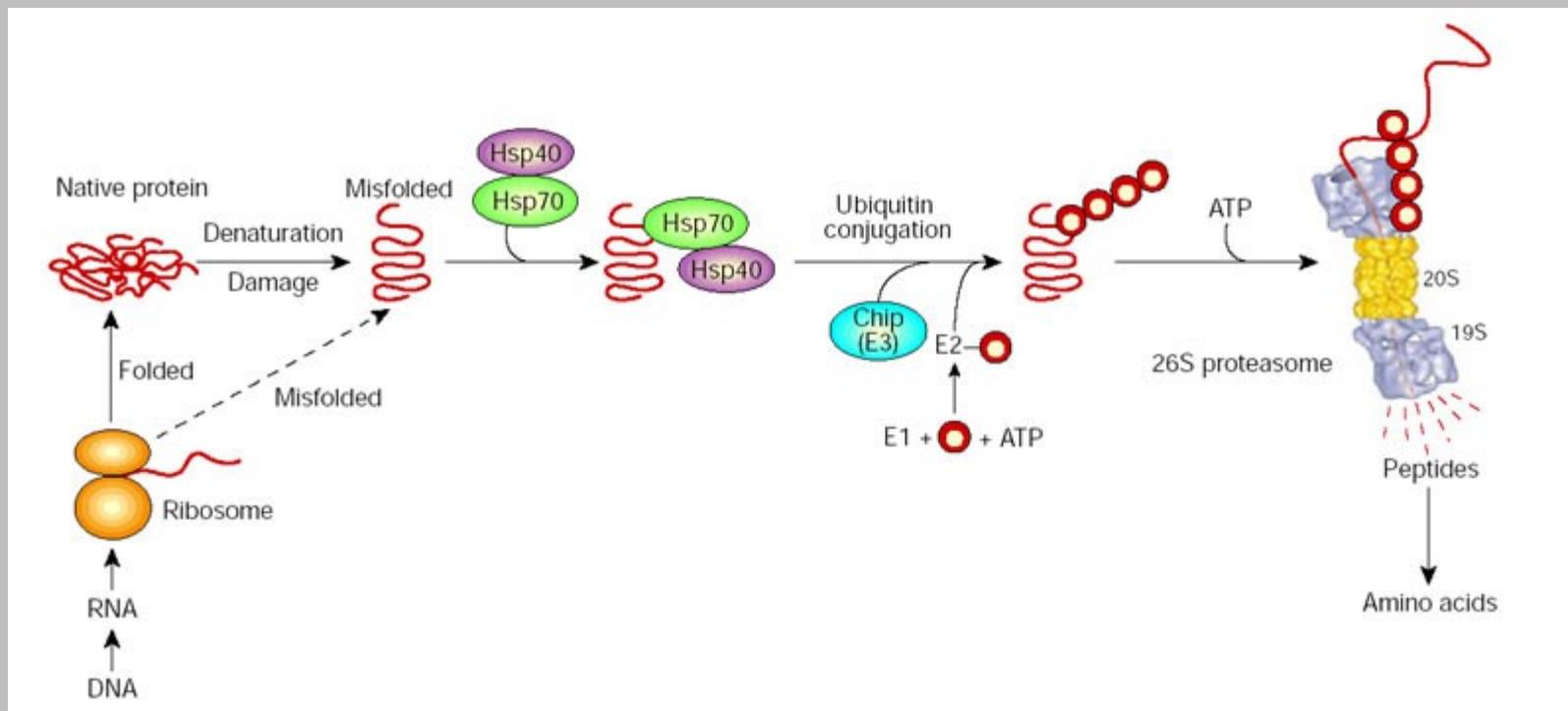






<http://neuromuscular.wustl.edu>

Proces ubikvitinacije lahko nadzorujejo signalne poti preko transkripcijskih faktorjev, ki uravnavajo izražanje encimov, potrebnih za dodajanje ubikvitinskih enot na tarče.



Nature 426, 895-899 (2003)

Šaperoni lahko sodelujejo pri prepoznavanju nepravilno zvitih proteinov, kar privede do njihove ubikvitinacije.

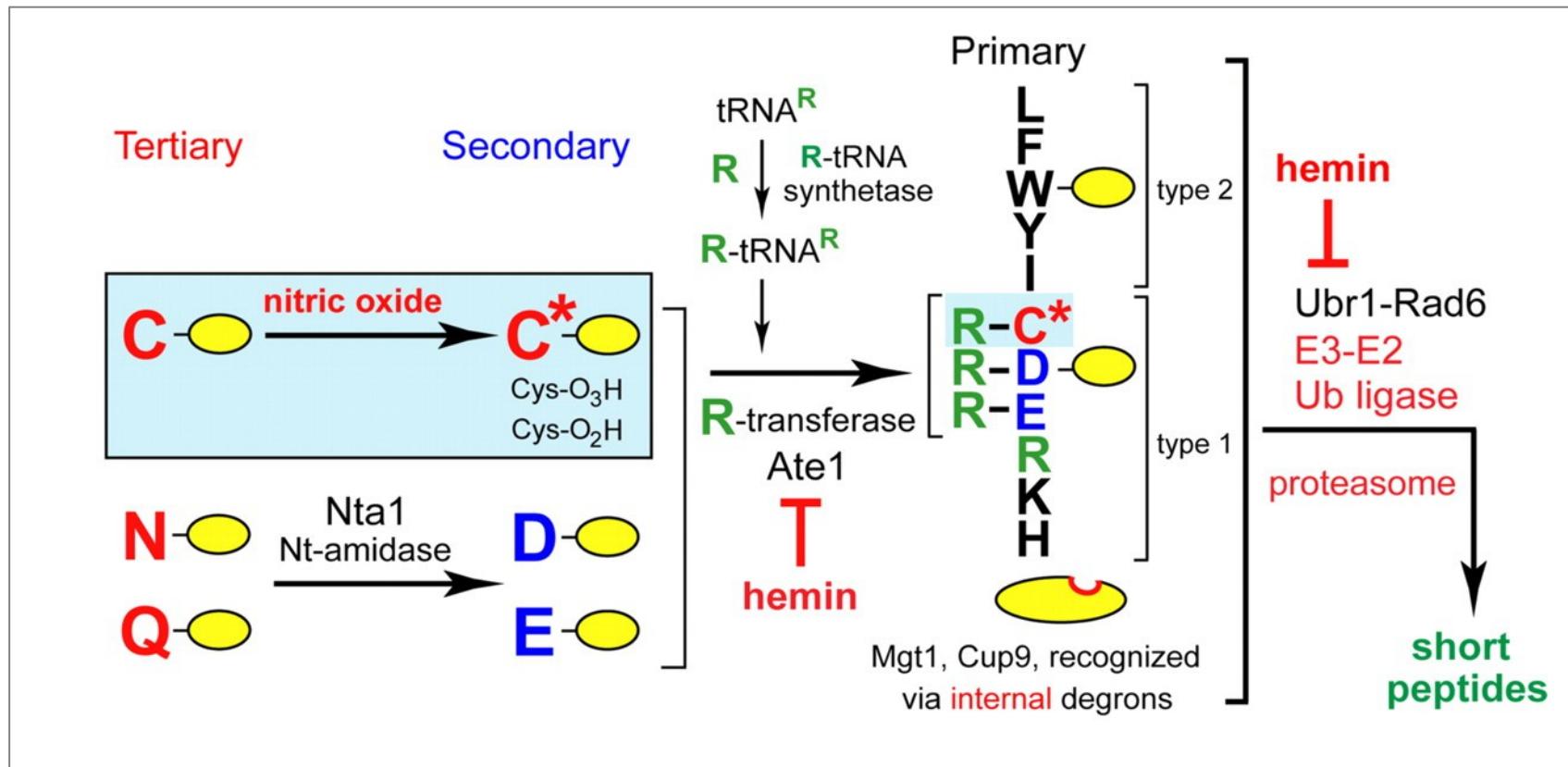
Table 1 The N-end rule in *E. coli* and *S. cerevisiae*

Residue X	Half-life of X- β gal	
	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Arg	2 min	2 min
Lys	2 min	3 min
Phe	2 min	3 min
Leu	2 min	3 min
Trp	2 min	3 min
Tyr	2 min	10 min
His	> 10 h	3 min
Ile	> 10 h	30 min
Asp	> 10 h	3 min
Glu	> 10 h	30 min
Asn	> 10 h	3 min
Gln	> 10 h	10 min
Cys	> 10 h	> 30 h
Ala	> 10 h	> 30 h
Ser	> 10 h	> 30 h
Thr	> 10 h	> 30 h
Gly	> 10 h	> 30 h
Val	> 10 h	> 30 h
Pro	?	> 5 h
Met	> 10 h	> 30 h

Approximate *in vivo* half-lives of X- β gal proteins in *E. coli* at 36 °C (Tobias *et al.* 1991) and in *S. cerevisiae* at 30 °C (Bachmair & Varshavsky 1989). A question mark at Pro indicates its uncertain status in the N-end rule (see the main text).

Pravilo N-konca

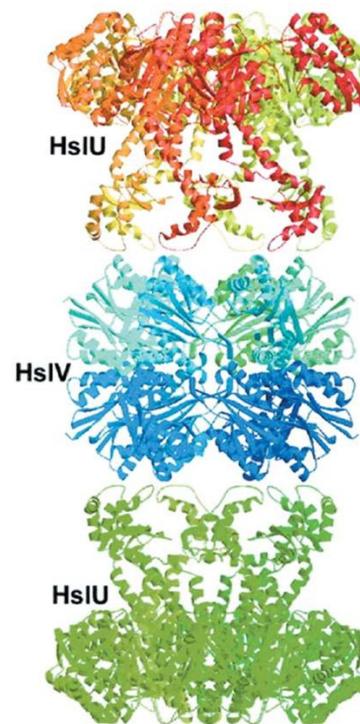
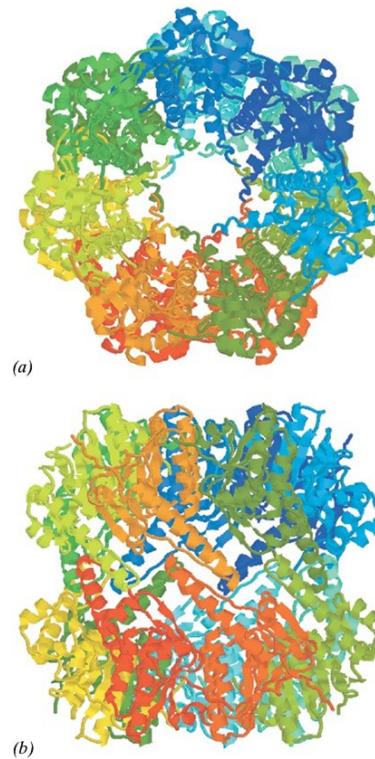
Razen osnovnih destabilizirajočih N-končnih aminokislinskih ostankov oz. zaporedja (N-degron) obstajajo še dodatni signali, ki vplivajo na obstojnost proteina po pretvorbah: Asn, Gln – terciarna destabilizirajoča ostanka – se encimsko deaminirata v sekundarna destabilizirajoča Asp in Glu. Nanju se veže (primarno destabilizirajoči) Arg ob delovanju Arg-tRNA-transferaze.



Razgradnja proteinov pri prokariontih

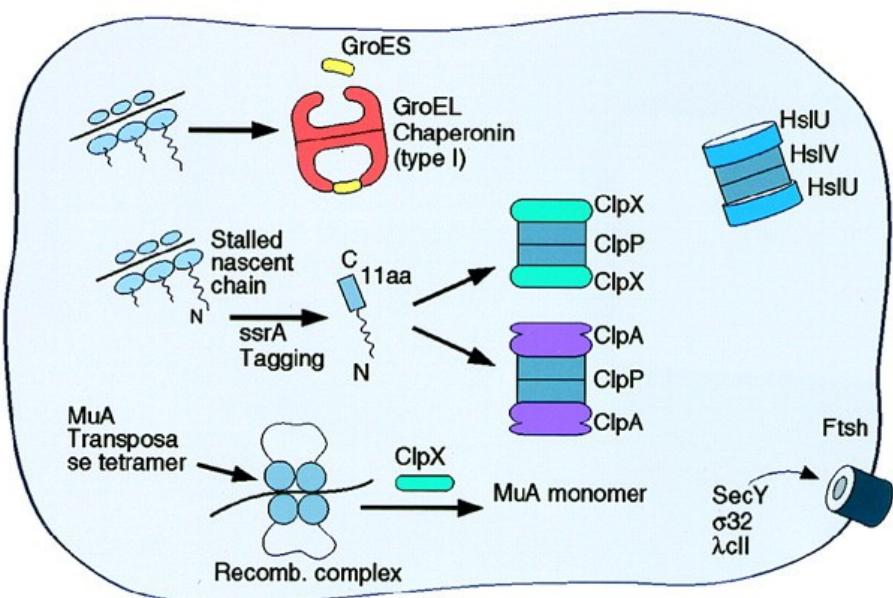
Bakterije nimajo proteasomov 20 S (izjema: *Actinomyces*), vseeno pa imajo od ATP odvisno razgradnjo proteinov s sodčkastimi encimi.

Pri *E. coli* 80 % razgradnje proteinov posredujeta proteazi Lon in Clp, ki ju sestavlja več podenot, pri čemer je aktivno mesto obrnjeno v notranjost strukture. Pri proteolizi sodeluje tudi kompleks HslUV (*heat shock locus UV*).

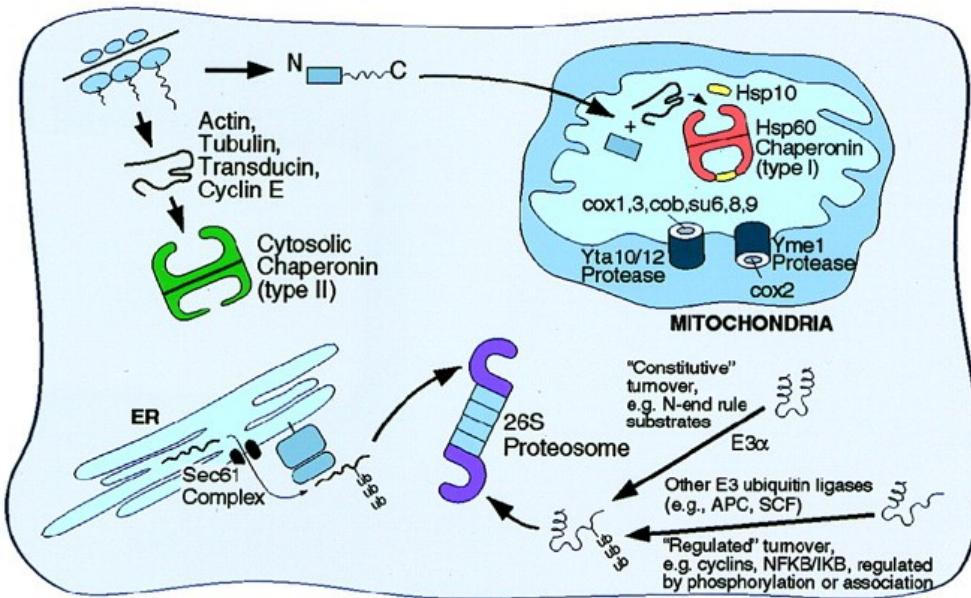


Heptamerni kompleks ClpP, ki v Clp-kompleksu sodeluje z ATPazami (ClpA, ClpX).
Kompleks HslUV (820 kDa), kjer ima ‚kapa‘ HslU ATPazno aktivnost, HslV pa proteazno.

a) Prokaryote



b) Eukaryote



PNAS (1999) 96, 11033-11040

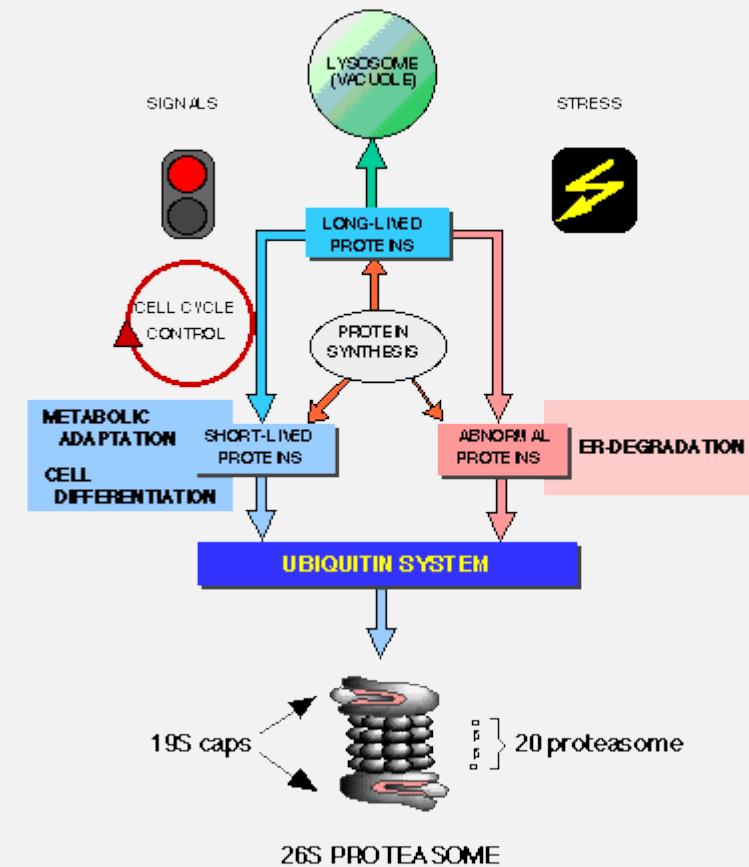
Vloga „šaperonskih obročev“ pri zvitju in razgradnji proteinov

Dodelava proteinov v ER

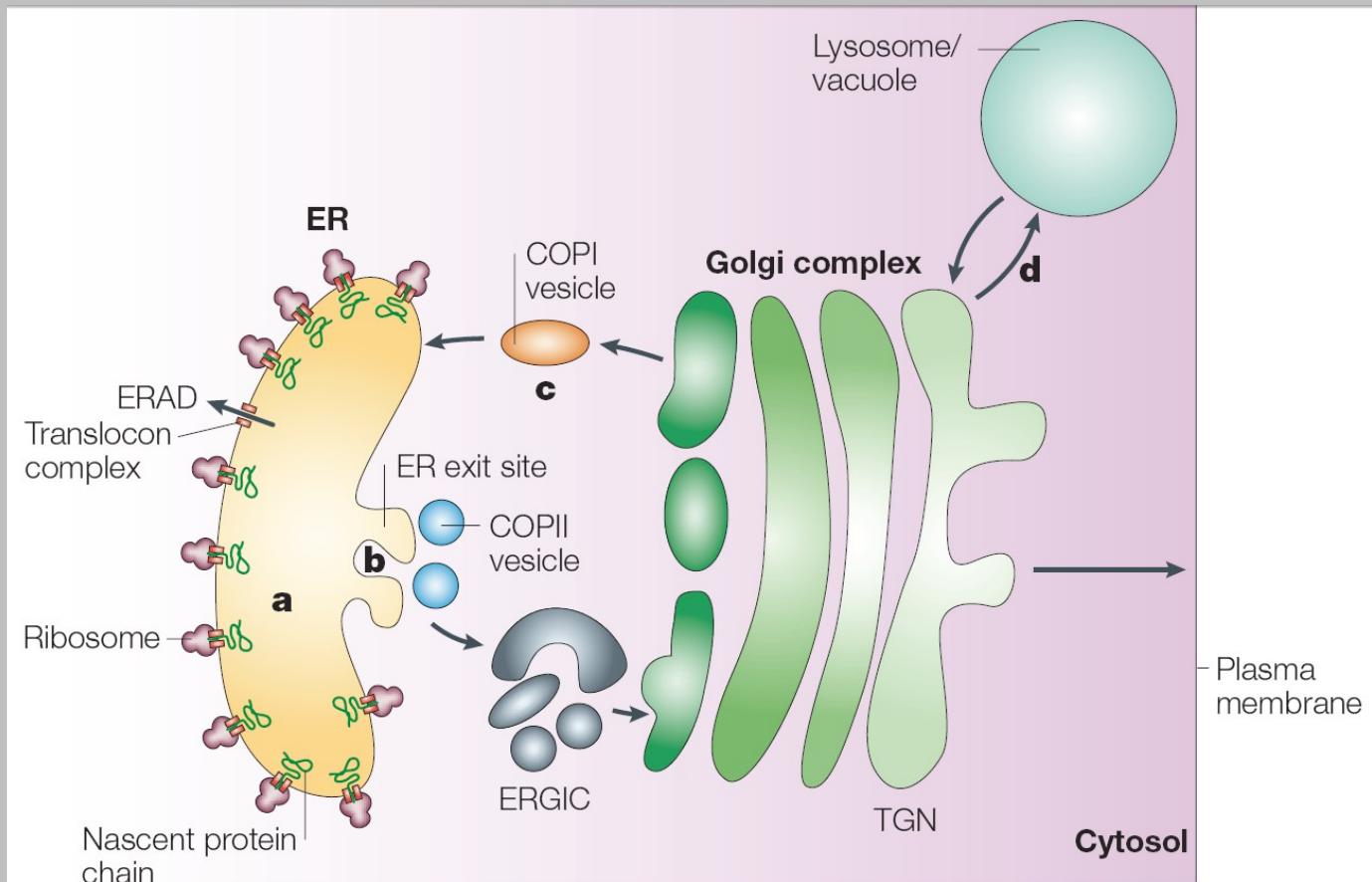
- zvitje
- nastanek disulfidnih mostičkov
- glikozilacija (pripenjanje in dodelava)
- proteolitično procesiranje
- sestavljanje multimernih proteinov

V GA lahko pridejo samo pravilno zviti in sestavljeni proteini; ostali se zadržijo v ER, najpogosteje pa se vrnejo v citosol, kjer se razgradijo.

PROTEIN DEGRADATION PATHWAYS



Preverjanje kakovosti proteinov v ER: kontrola nativnosti



ERAD = ER-associated degradation
ERGIC = ER-Golgi intermediate compartment
TGN = trans-Golgi network

Z ER povezana razgradnja proteinov (ERAD)

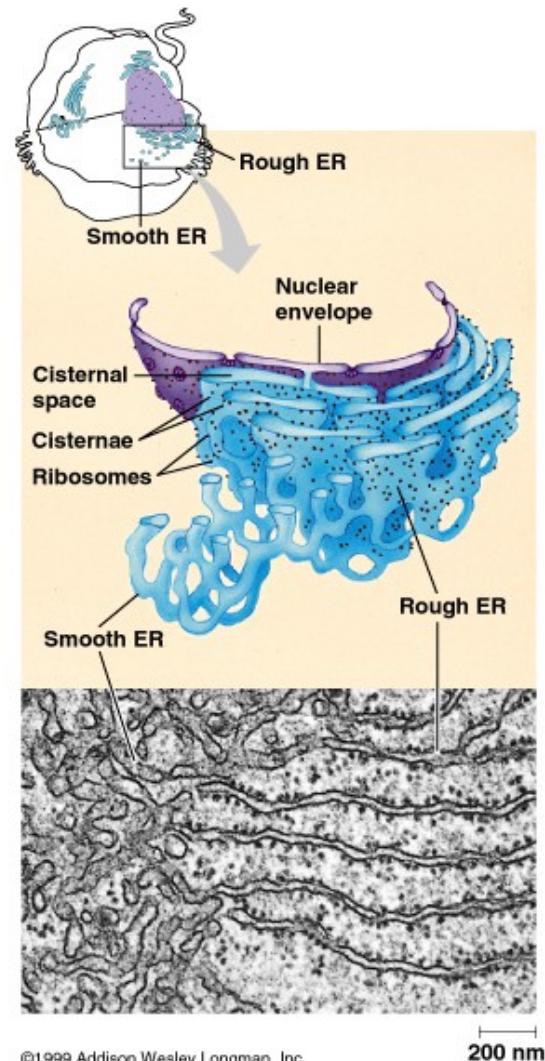
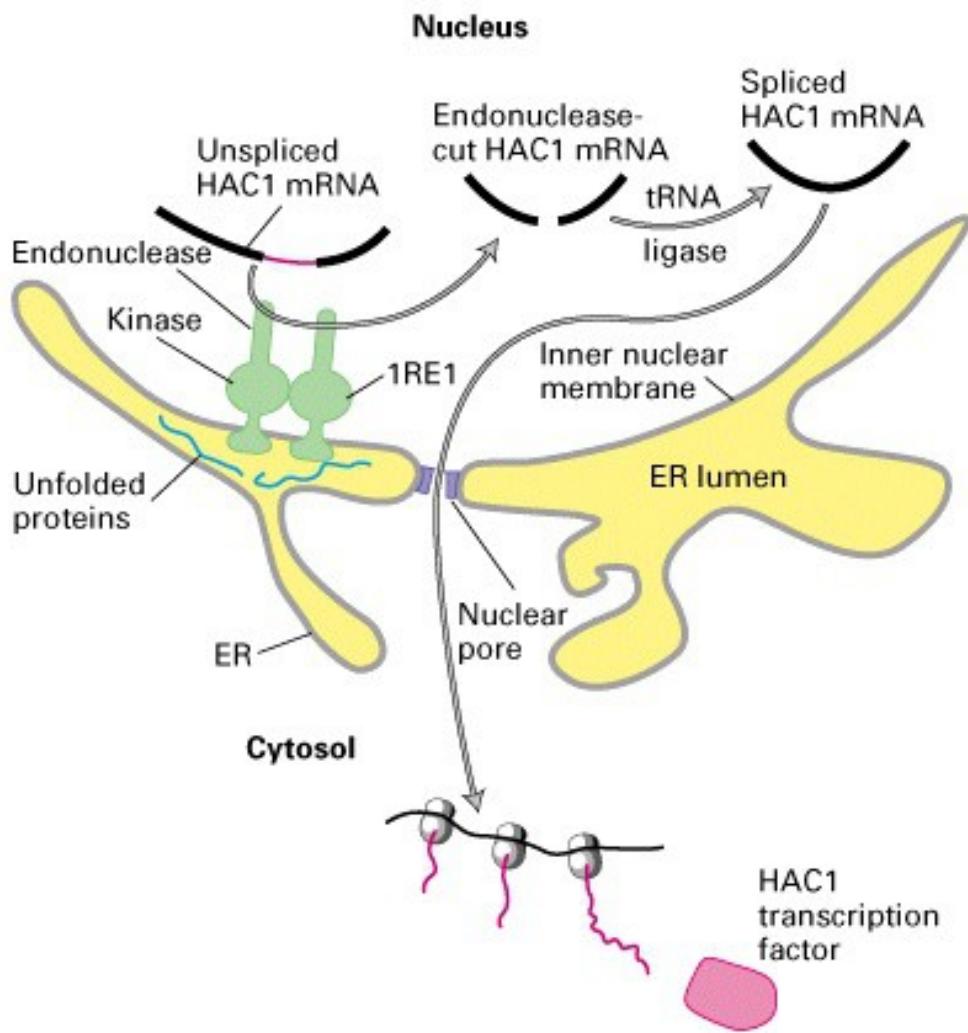
Senzorji pravilnosti zvitja so šaperoni in nekateri drugi proteini.

Zaznavajo izpostavljene hidrofobne regije, proste Cys in nedokončane glikanske verige.

Terminalno napačno zviti proteini zapustijo ER z retrogradnim transportom.

V citosolu se označijo z Uq in razgradijo. Ubikvitinacijo omogočajo Uq-ligaze in pomožni proteini v membrani ER.

Pri kvasovkah so kontrolne točke zvitja verjetno tri. Membranski proteini se preverjajo drugače kot ostali. Pri membranskih se najprej preveri zvitje citosolne domene (ERAD-C), nato luminalne domene (ERAD-L: na enak način tudi nemembranski proteini); obstaja tudi ERAD-M (preverjanje transmembranskih domen). Vsaka od treh poti zahteva drugo Uq-ligazo E3.



©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

200 nm

Ključna vloga IRE1 pri odgovoru ER na nezvite proteine: vezava nezvitega proteina na IRE1 povzroči sintezo transkripcijskega faktorja HAC1, ta pa aktivira transkripcijo genov za ostale proteine, udeležene v odgovoru ER.

