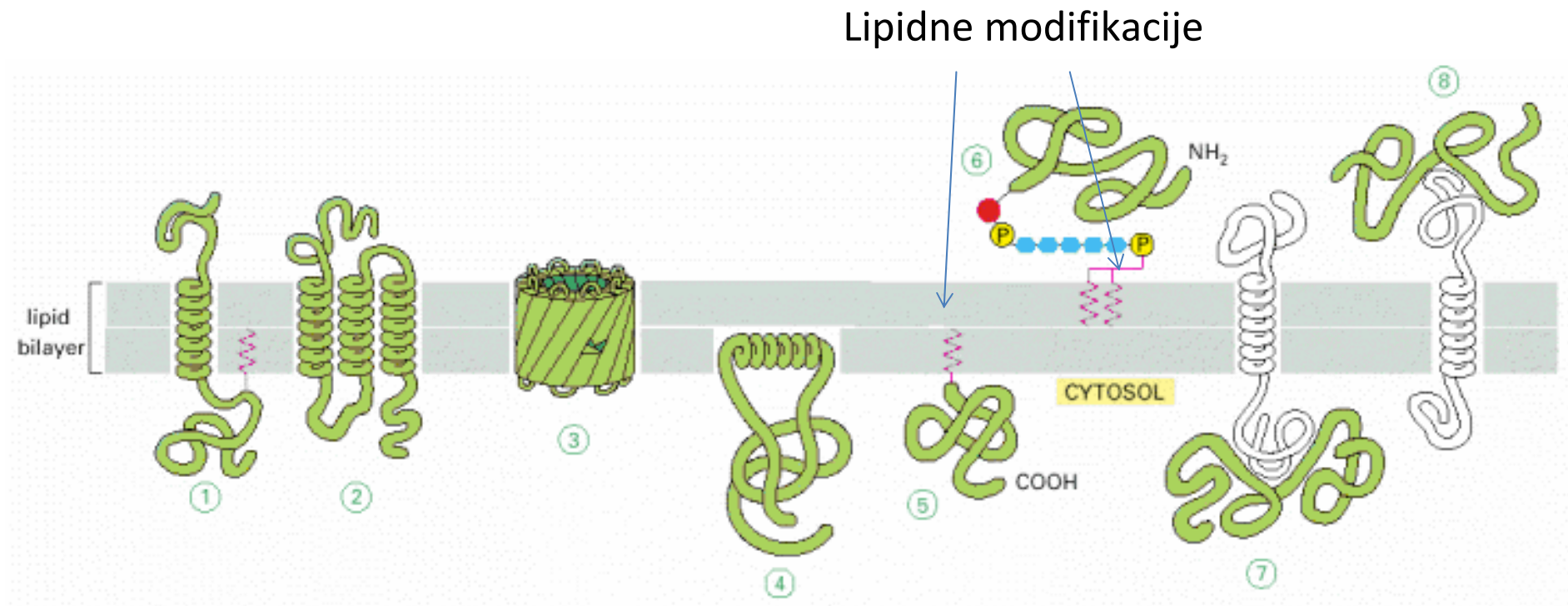


Modifikacije proteinov z lipidi in njihov fiziološki pomen

Biološke membrane

Saša Kajdič

Interakcije proteinov z membranami

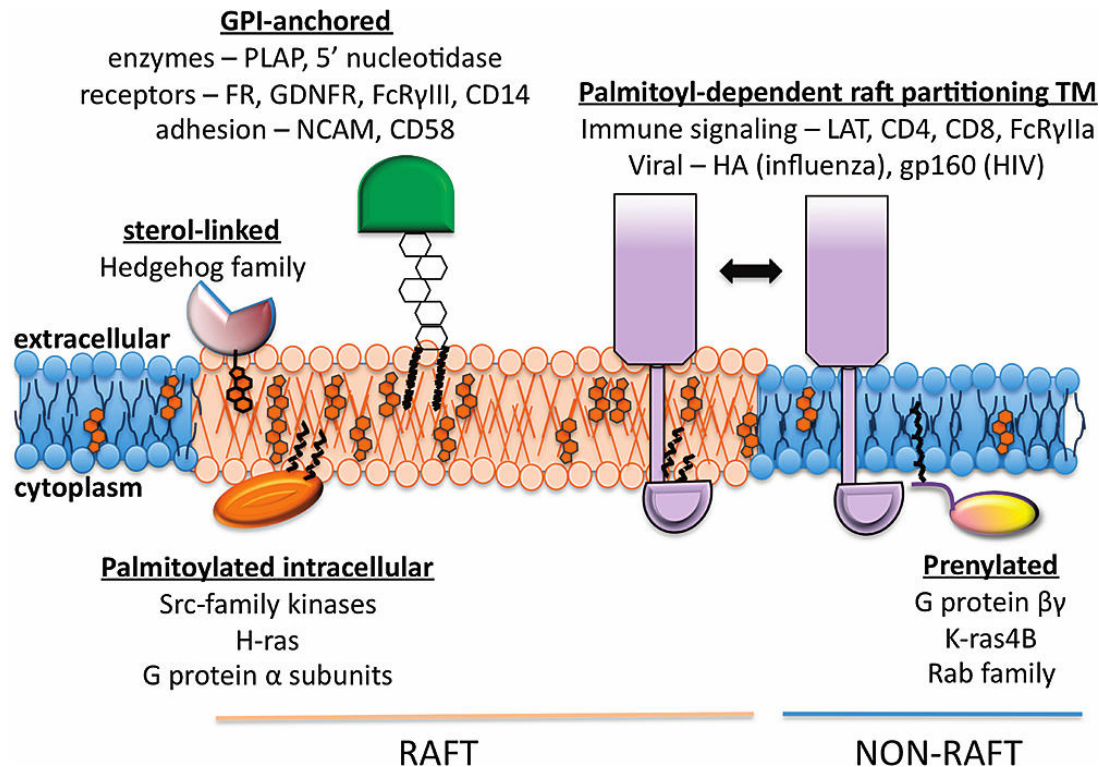


5 načinov pritrjevanja proteinov v lipidni dvosloj

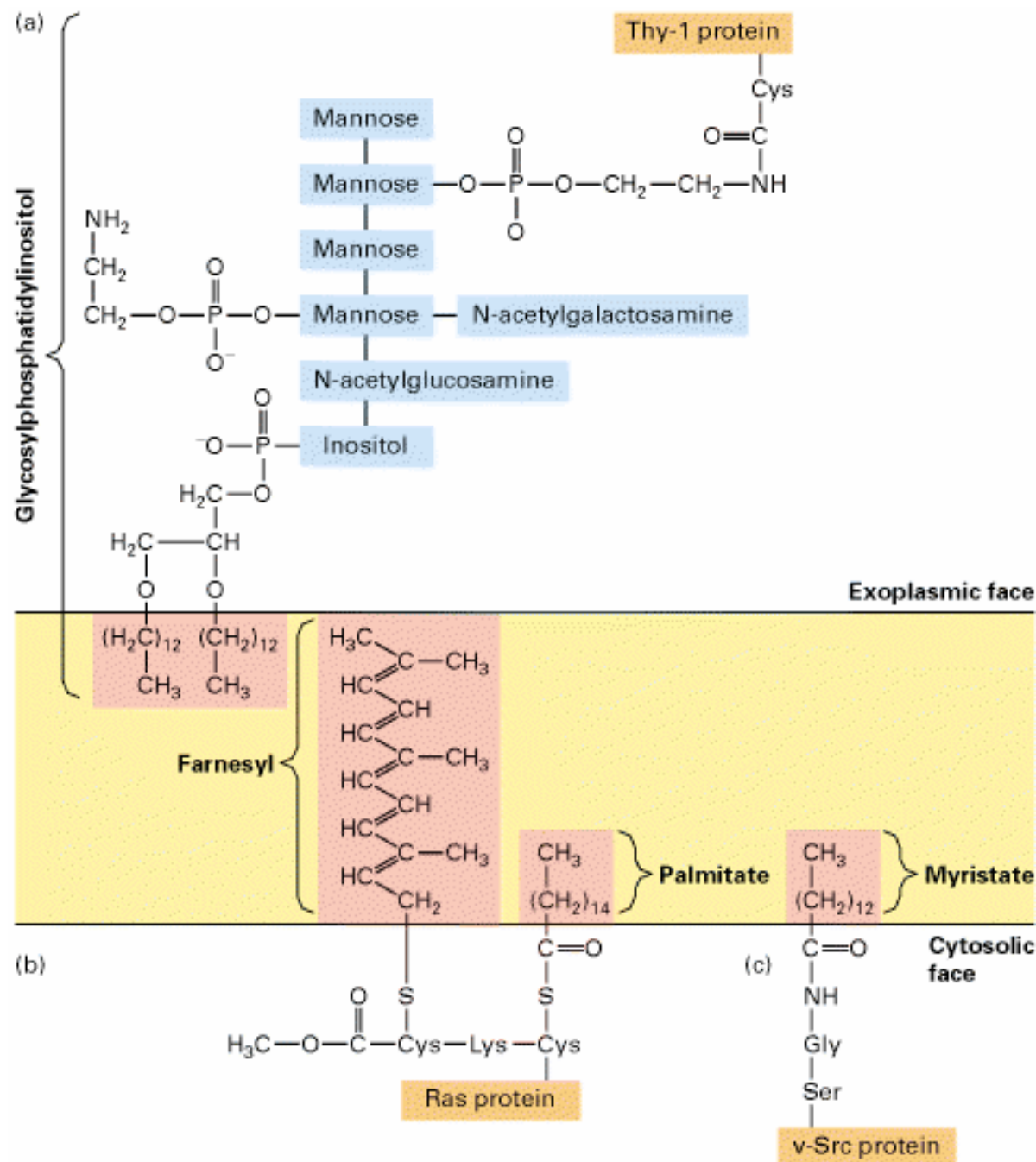
- Prenilacija
- Miristoilacija
- Palmitoilacija
- GPI sidro
- Modifikacije s holesterolom

5 načinov pritrjevanja proteinov v lipidni dvosloj

- Prenilacija
- Miristoilacija
- Palmitoilacija → reverzibilna
- GPI sidro
- Modifikacije s holesterolom

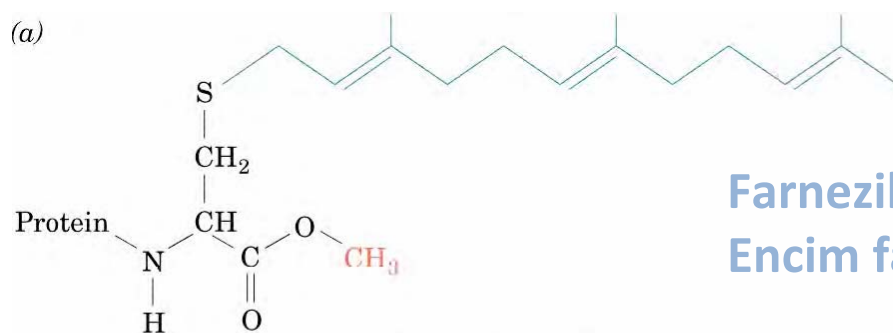


- Vloga pri razmeščanju proteinov, delitvi membran, pravilnem delovanju proteinov...
- Sidranje preko nasičenih maščobnih kislin in sterolov usmerja v lipidne rafte, sidranje preko nenasičenih in razvejanih CH pa proteine usmerja izven lipidnih raftov.



Prenilacija – modifikacija z izoprenoidi

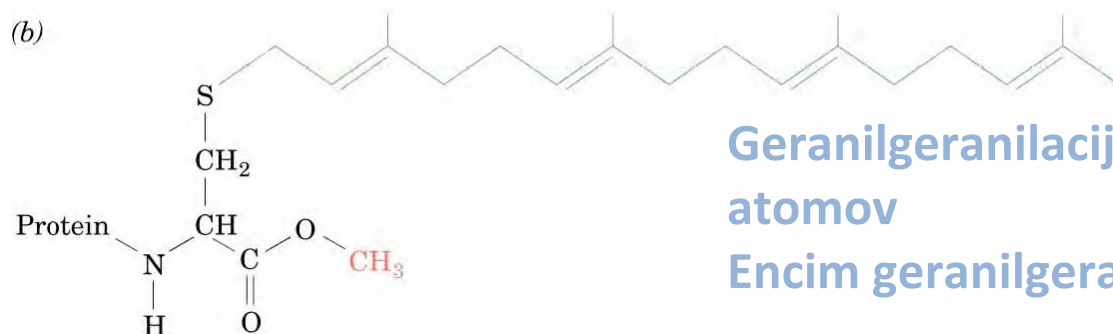
(a)



Farnezilacija: 15 C atomov
Encim farneziltransferaza

S-Farnesyl cysteine methyl ester

(b)



Geranilgeranilacija: 20 C
atomov
Encim geranilgeraniltransferaza

S-Geranylgeranyl cysteine methyl ester

Obe modifikaciji na C-končnem cisteinskem ostanku proteina.

Prenilacija/2

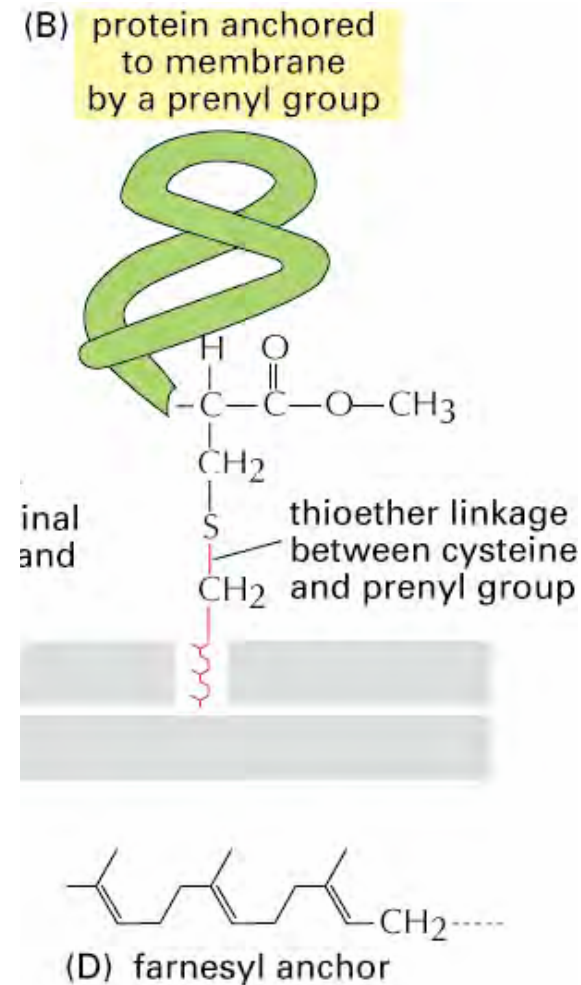
- Znani prenilirani proteini: lamin B; Ras in z Ras povezani GTP-vezavni proteini (G-proteini); glavni paritveni faktor; podenote heterotrimernih G proteinov; protein kinaze
- Prenilacija v večini primerov posreduje pri interakciji s celično membrano, ima pa tudi pomembno vlogo v protein-protein interakcijah.

Vloga prenilacije

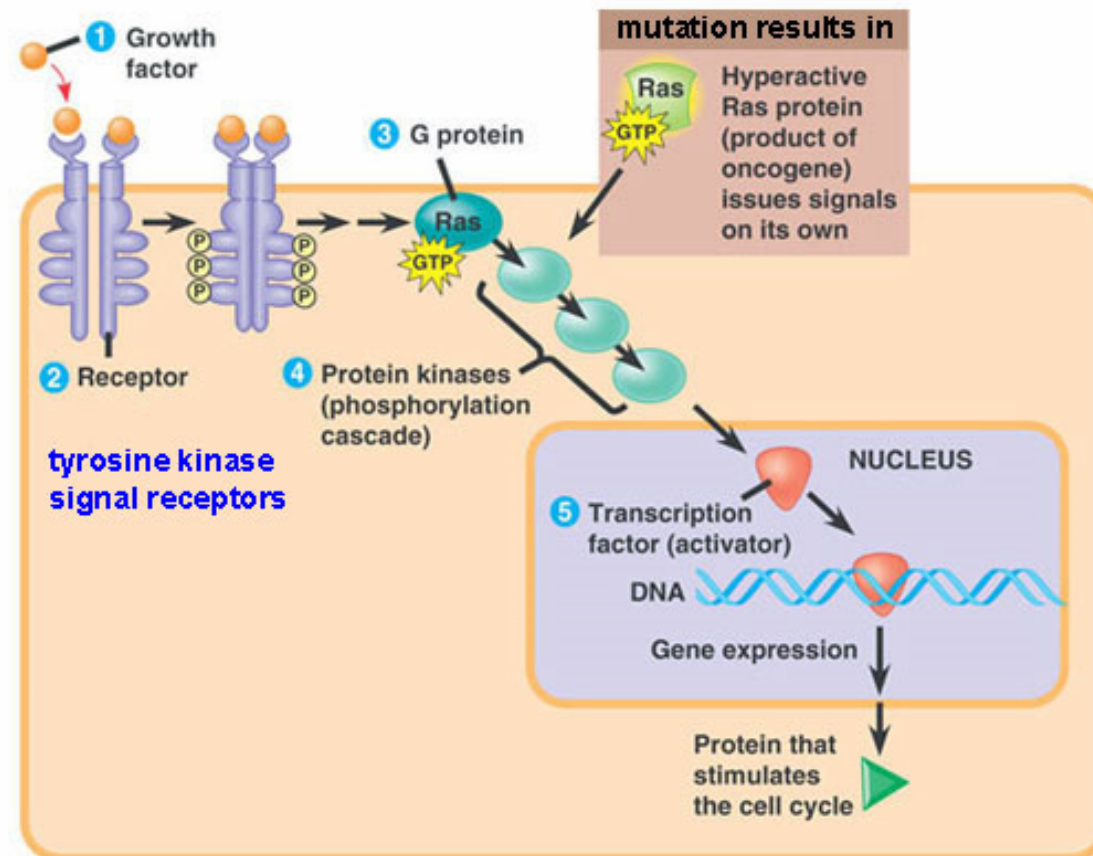
- Celična rast in diferenciacija
- Signalizacija
- Citokineza
- Transport in razmeščanje proteinov med membranami

Raziskave temeljijo na izražanju in analizi mutiranih proteinov, ki ne morejo biti prenilirani:

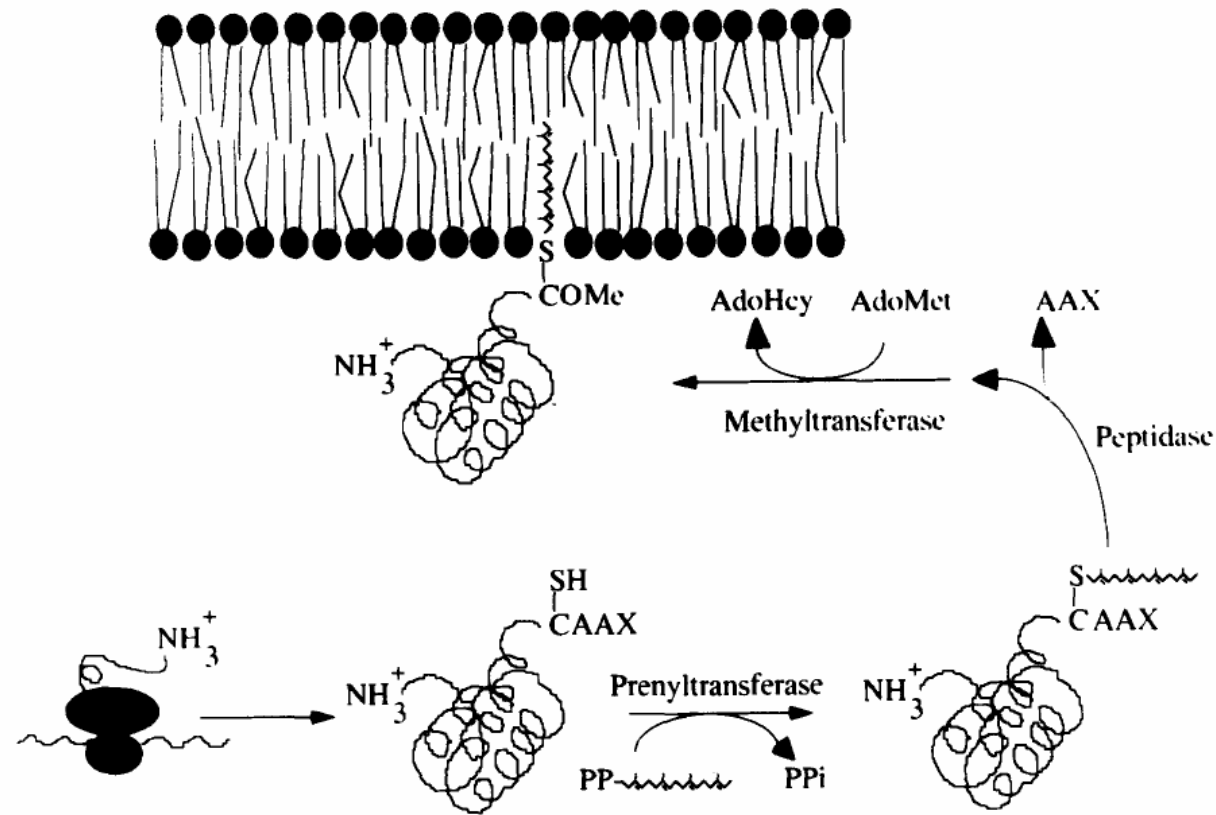
- Zamenjava cisteina s serinom
- Uporaba kompaktina in mevinolina na celicah, ki izražajo onkogeni Ras protein



(a) RAS Cell cycle–stimulating pathway

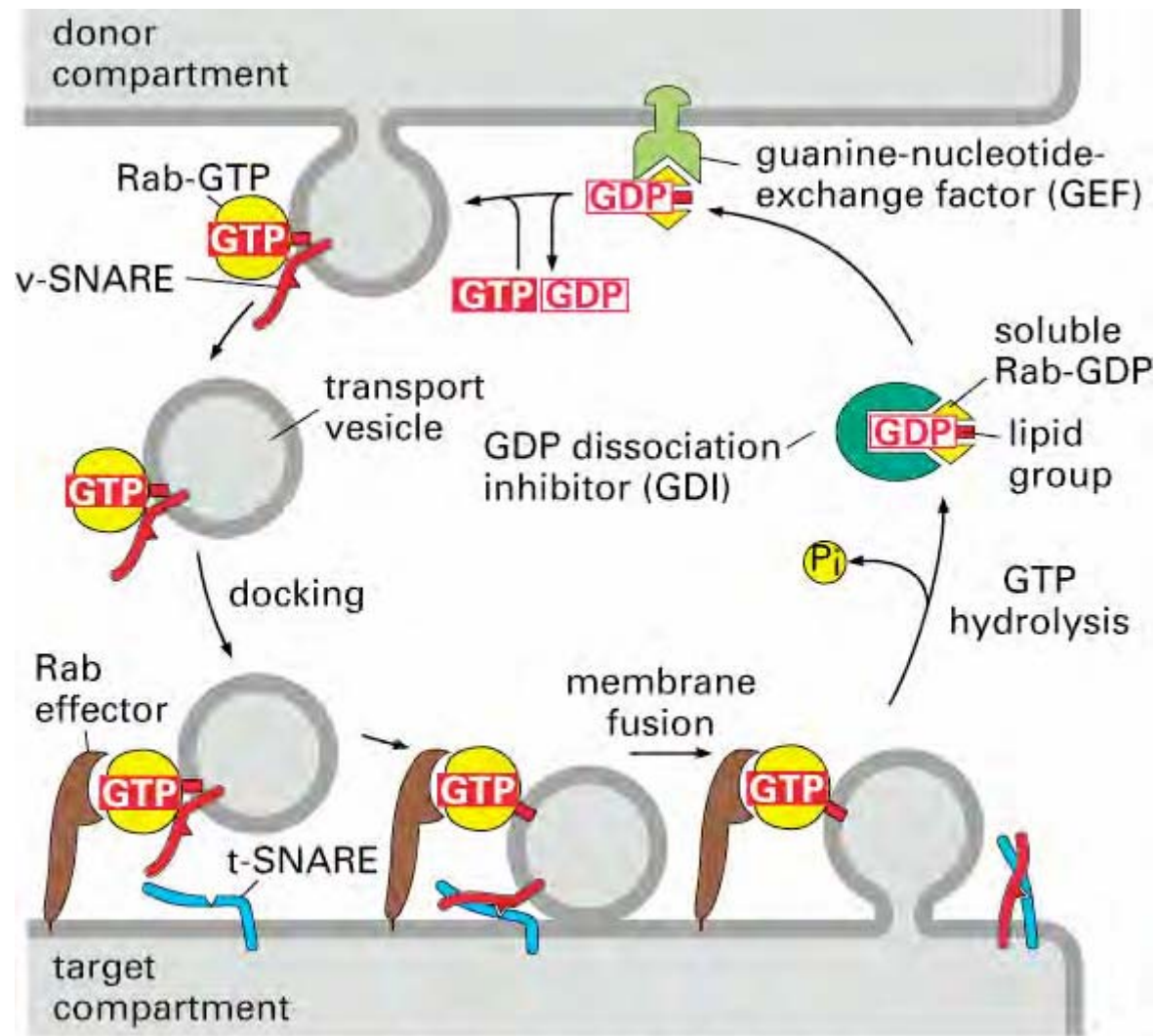


- Mutirani protein Ras lahko povzroči transformacijo evkariontske celice, zato je specifična inhibicija funkcije proteinov Ras ključna pri kemoterapiji teh tumorjev. Najpogosteje se za kemoterapijo uporablja inhibitorje farneziltransferaz.



Enzyme	Subunits	Recognition motifs	Protein substrates (examples)
FTase ^a	α β	CaaX	Ras, G γ , a-factor, nuclear lamins, IP ₃ 5-phosphatase, cGMP phosphodiesterase
GGTase-I ^a	α β	CaaL	Rap, Rho, Rac
Rab-GGTase ^b	α , β , REP	CC, CXC, CCX, CCXX, CCXXX	Rab, Ypt

Kroženje preniliranih proteinov med membranami v citoplazmi



SNARE hipoteza: interakcija med vSNARE in tSNARE je odgovorna za specifično fuzijo veziklov. Rab-GTP je nujen za povezavo med njima. vSNARE in tSNARE se morata konformacijsko ujemati, da se povežeta – ko vezikel prenese tovor na pravo mesto. Rab ima vezan GTP, ki se hidrolizira in s tem zaklene vezavo vezikla na tarčno membrano. RAB-GDP gre nazaj v citosol, in se nato pretvori v GTP ter se ponovno porabi.

Figure 13–14. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Farneziltransferaze kot tarče zdravil

- Rak: K-ras protein je mutiran pri več kot 80 % raka trebušne slinavke
- Progeria (Hutchinson-Gilford progeria sindrom)

Inhibitorji farneziltransferaz



GPI sidro

- GPI = glikozil fosfatidil inozitol
- GPI modificirani proteini se nahajajo na ekstracelularni oziroma lumenski strani plazmaleme na področju lipidnih raftov . Modifikacija na C-koncu proteina.
- Fiziološke funkcije še vedno slabo raziskane.

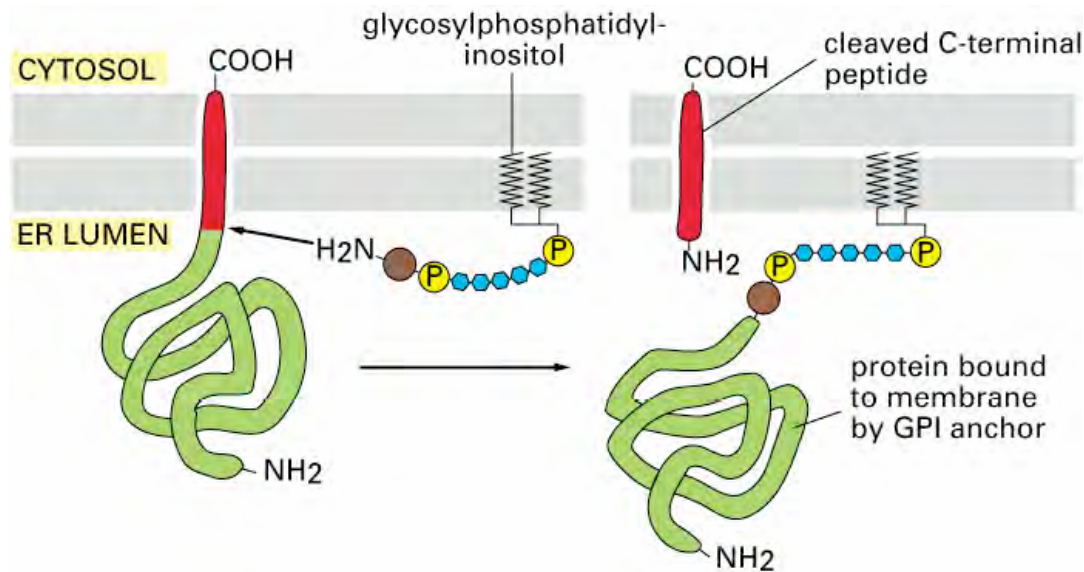


Figure 12-57. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

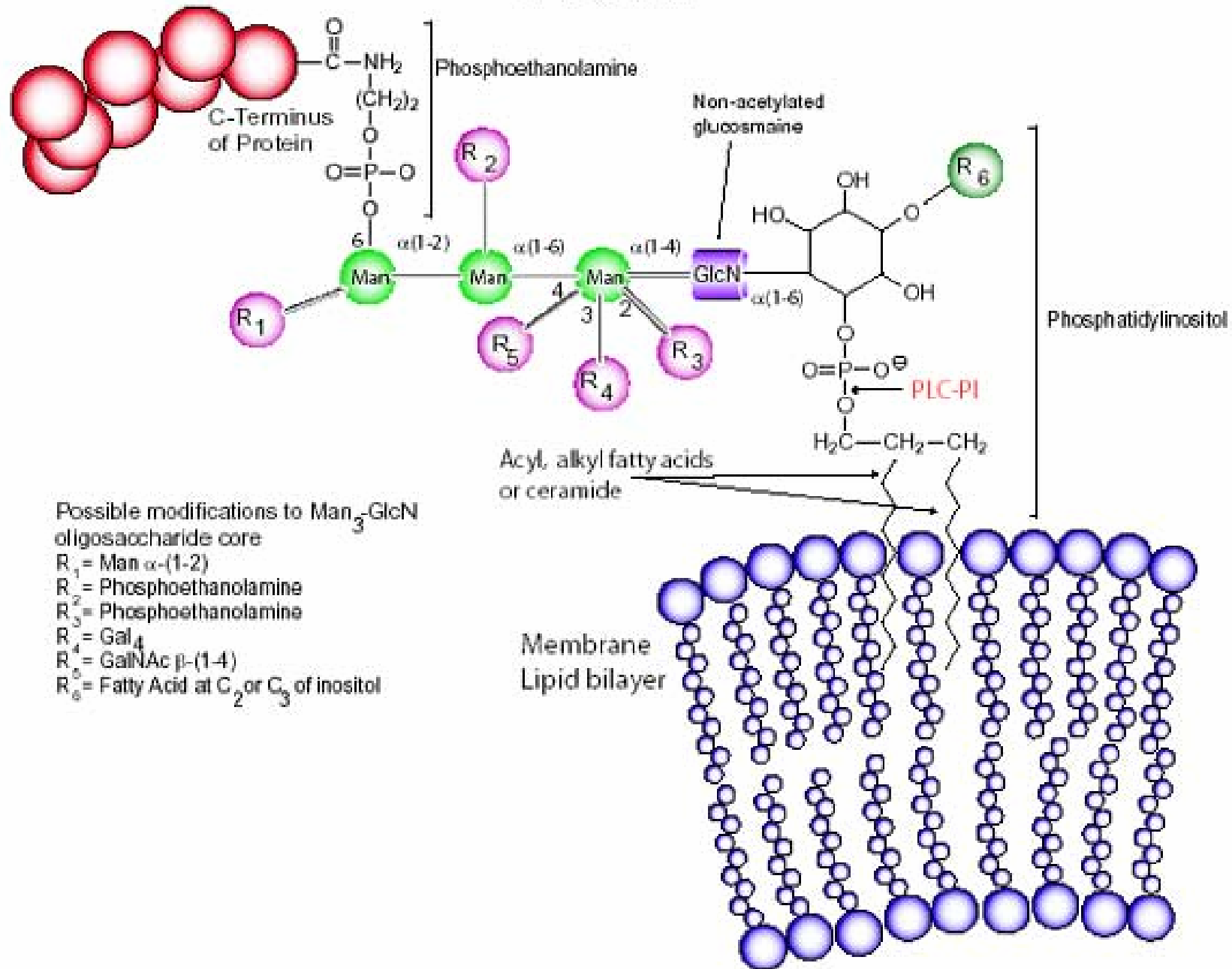
GPI sidro/2

Najbolje okarakterizirana lipidna modifikacija proteinov, ki določa asociacijo proteinov z lipidnimi rafti.

Vloge GPI-APs :

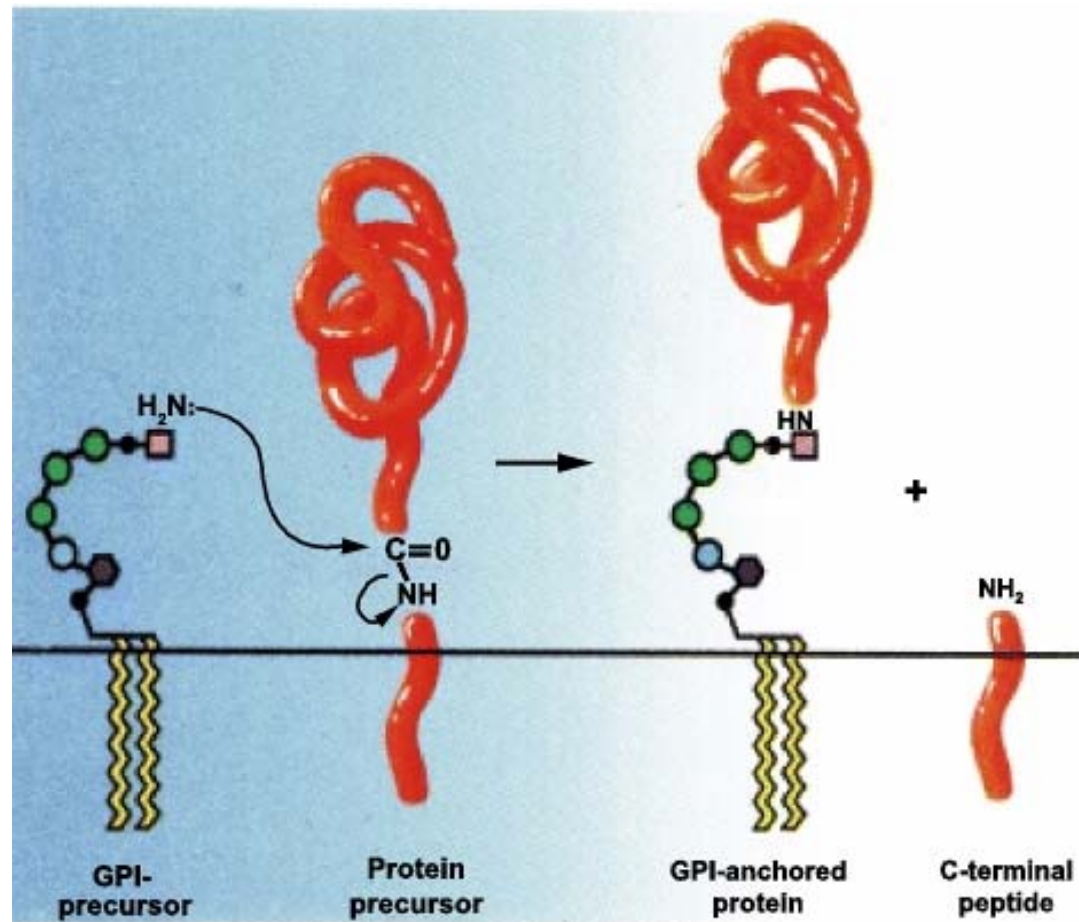
- Adhezija
- Razmeščanje membran
- Signalizacija pri imunskem sistemu
- Vnos nutrientov

GPI Anchor



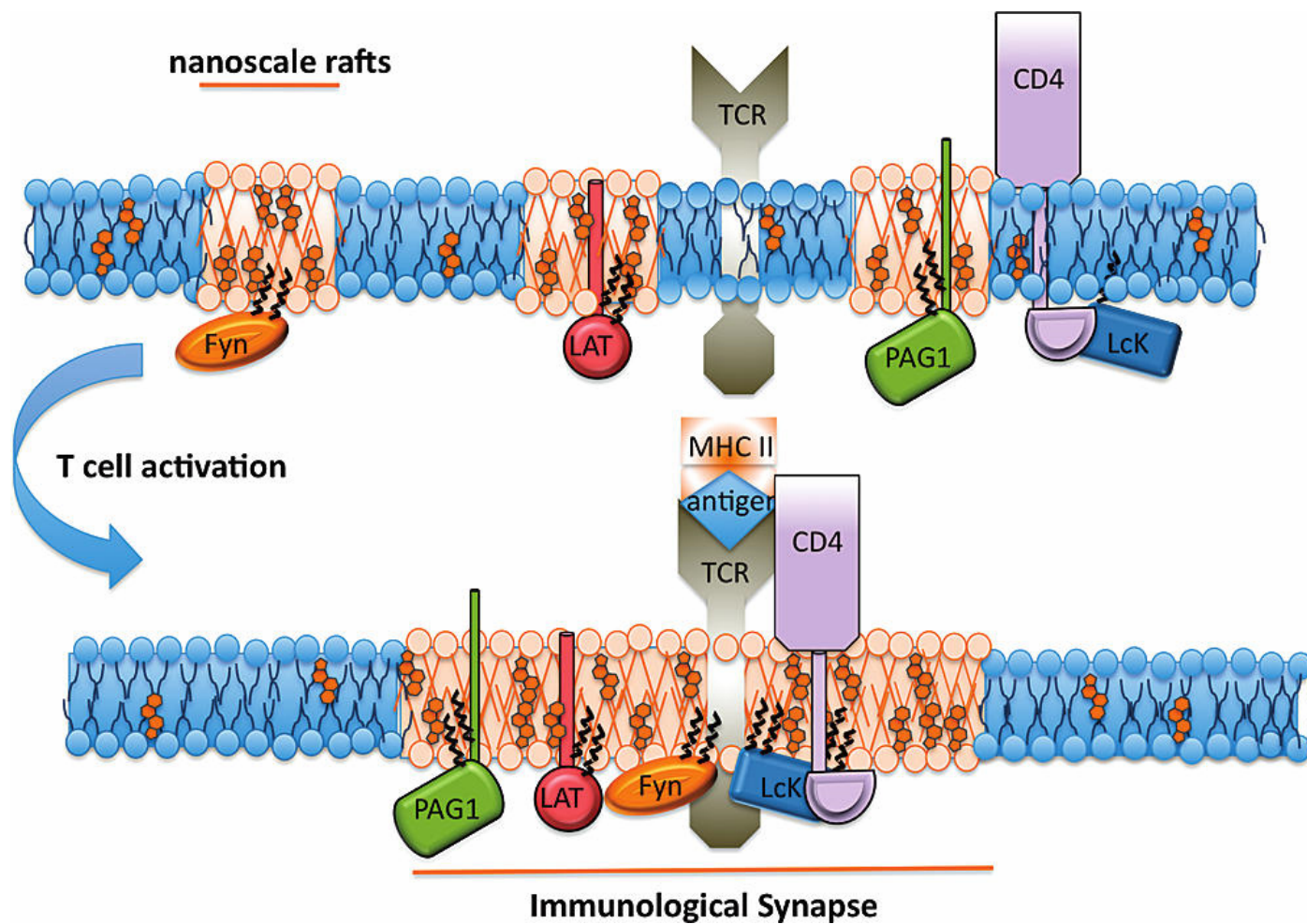
Protein	GPI signal sequence	
Acetylcholinesterase (<i>Torpedo</i>)	NQFLPKLLNATA	C DGELSSSGTSSSSKGIIFYVLFSILYLIFY
Alkaline phosphatase (placenta)	TACDLAPPAGTT	D AAHPGRSVPALLPLLAGTLLLLLETATAP
Decay accelerating factor	HETTPNKGSGTT	S GTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT
PARP (<i>T. Brucei</i>)	EPEPEPEPEPEP	G AATLKSVLPFAIAAAALVAAF
Prion protein (hamster)	QKESQAYYDGRR	S SAVLFSSPPVILLISFLIFLMVG
Thy-1 (rat)	KTINVIRDKLVK	C GGISLLVQNTSWLLLLLLSLSFLQATDFISI
Variant surface glycoprotein (<i>T. Brucei</i>)	ESNCKWENNACK	D SSILVTKKFALTW/SAAFVALLF

- Zelo različni motivi, kamor se pripenja GPI sidro na C-terminalu proteinov.
- Tudi različni aa ostanki, na katere je pripeto GPI sidro.



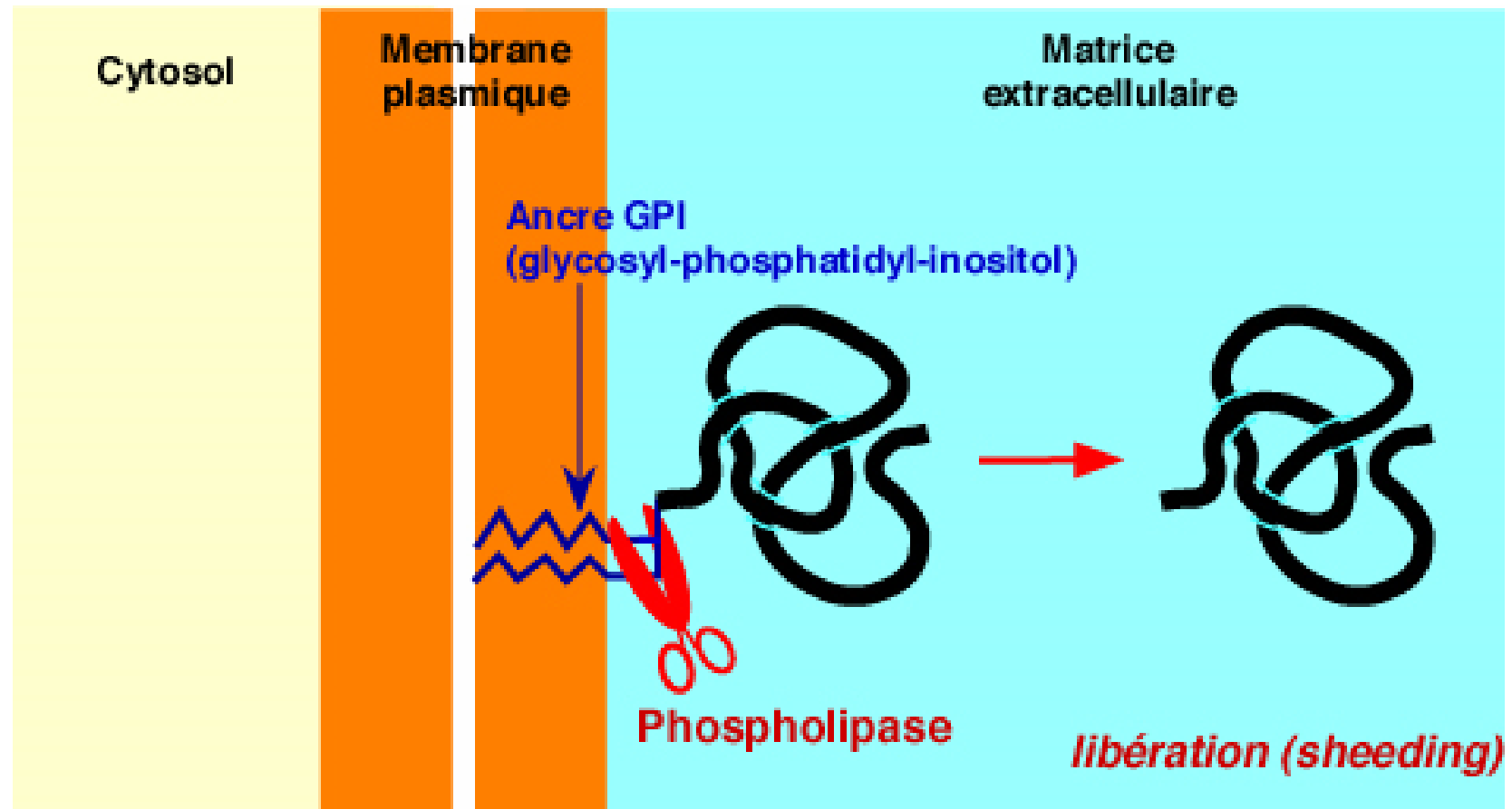
- Vsi GPI-vezani proteini so v začetku sintetizirani s transmembransko domeno, toda po translokaciji preko membrane endoplazmatskega retikuluma se ektodomena proteina izreže in se kovalentno poveže z GPI sidrom s pomočjo specifične transamidaze.

Tvorba imunološke sinapse – aktivacija celic T



GPI sidro/3

- Lokacija izključno na E strani
- Je močan tarčni signal za apikalno membrano epitelnih celic
- GPI-sidrani proteini lahko igrajo vlogo aktivacijskih antigenov pri imunskem odzivu
- Ko se GPI sidro odreže s pomočjo PI-fosfolipaze C, se lahko generira sekundarni obveščevalec pri transdukciji signala



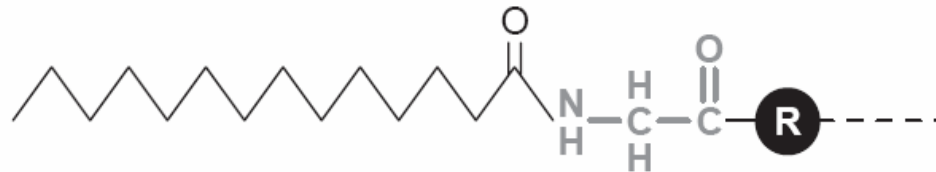
Miristoilacija

- Veliko membranskih proteinov je modificiranih z miristatom (14 C)
- Osnovni motiv: Met-Gly-x-x-x-[Ser/Thr]
- N-miristol transferaza/M-aminopeptidaza

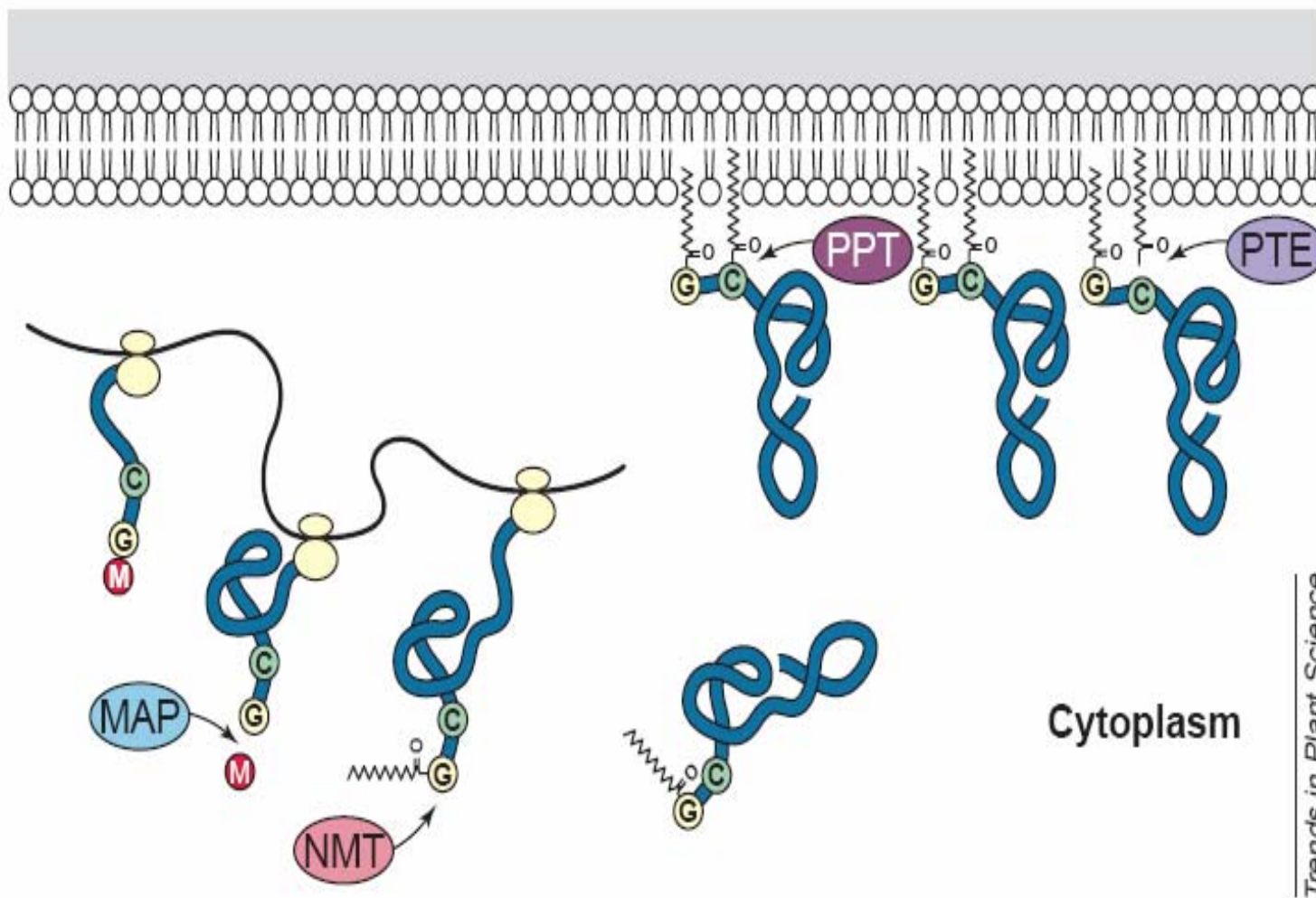
N-Myristylation

Stable
amide bond

$$K_d^{\text{eff}} = 80 \mu\text{m}$$



Miristoilacija/2



Miristoilacija/3

- Vključuje približno sto proteinov nižjih in višjih evkariontov, ki so vključeni v onkogenezo, sekundarno celično signalizacijo in v infektivnost retrovirusov ter drugih tipov virusov.
- Sesalska NMT se zelo razlikuje od tiste pri mikroorganizmih – nova tarča za fungicide?
- Inhibitorji NMT tudi možna protirakava in protivirusna zdravila
- Najboljši primer miristoiliranega proteina je sesalska nereceptorska protein tirozin kinaza, ki pripada družini Src (sarcoma) proteinov. Sodeluje pri intracelularni transdukciji signalov in ima pomembno vlogo pri razvoju raka

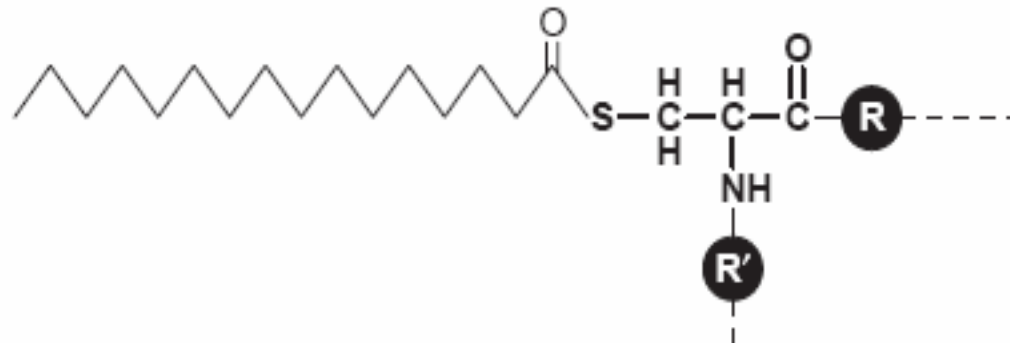
Palmitoilacija

- Kovalentna modifikacija cisteinskega ostanka
- Povečuje hidrofobnost in prispeva k membranski asociaciji
- Natančna funkcija odvisna od palmitoiliranega proteina
- REVERZIBILNA zaradi estrske vezi – regulatorni mehanizem

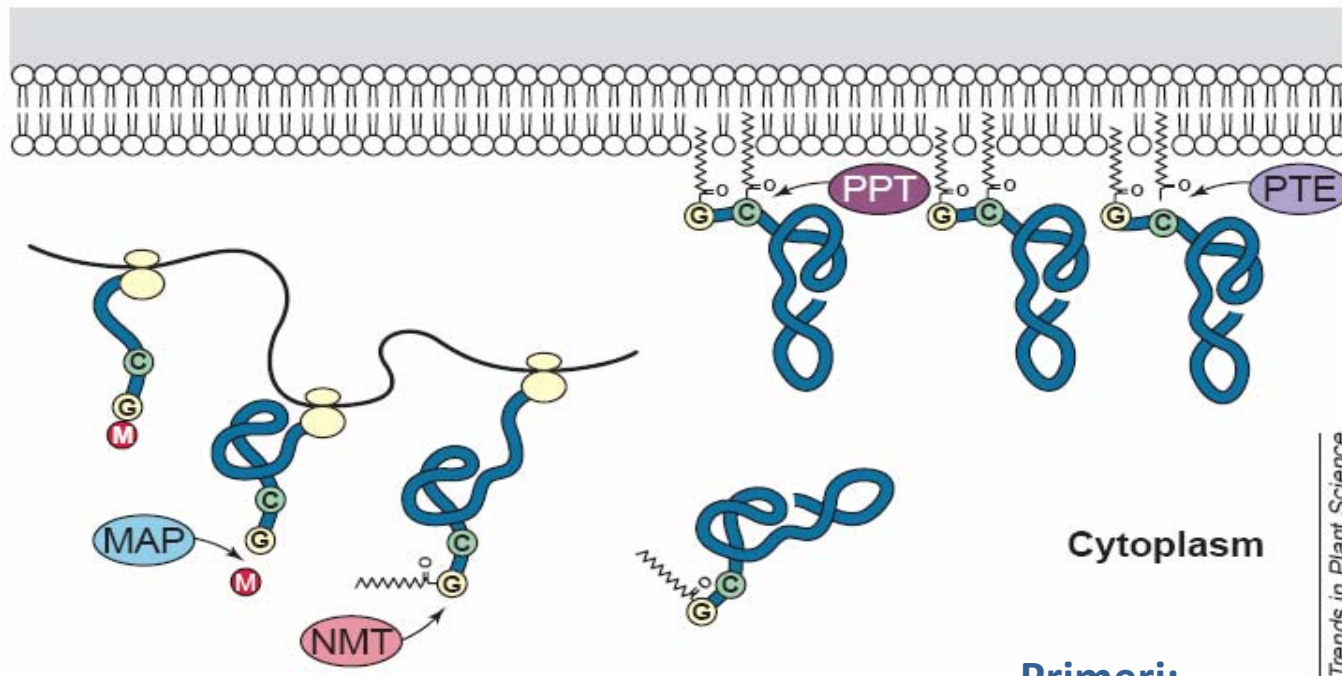
Palmitoylation

Reversible
thioester bond

$K_d^{\text{eff}} = 5 \mu\text{M}$



Palmitoilacija/2



Protein palmitoil transferaza PPT

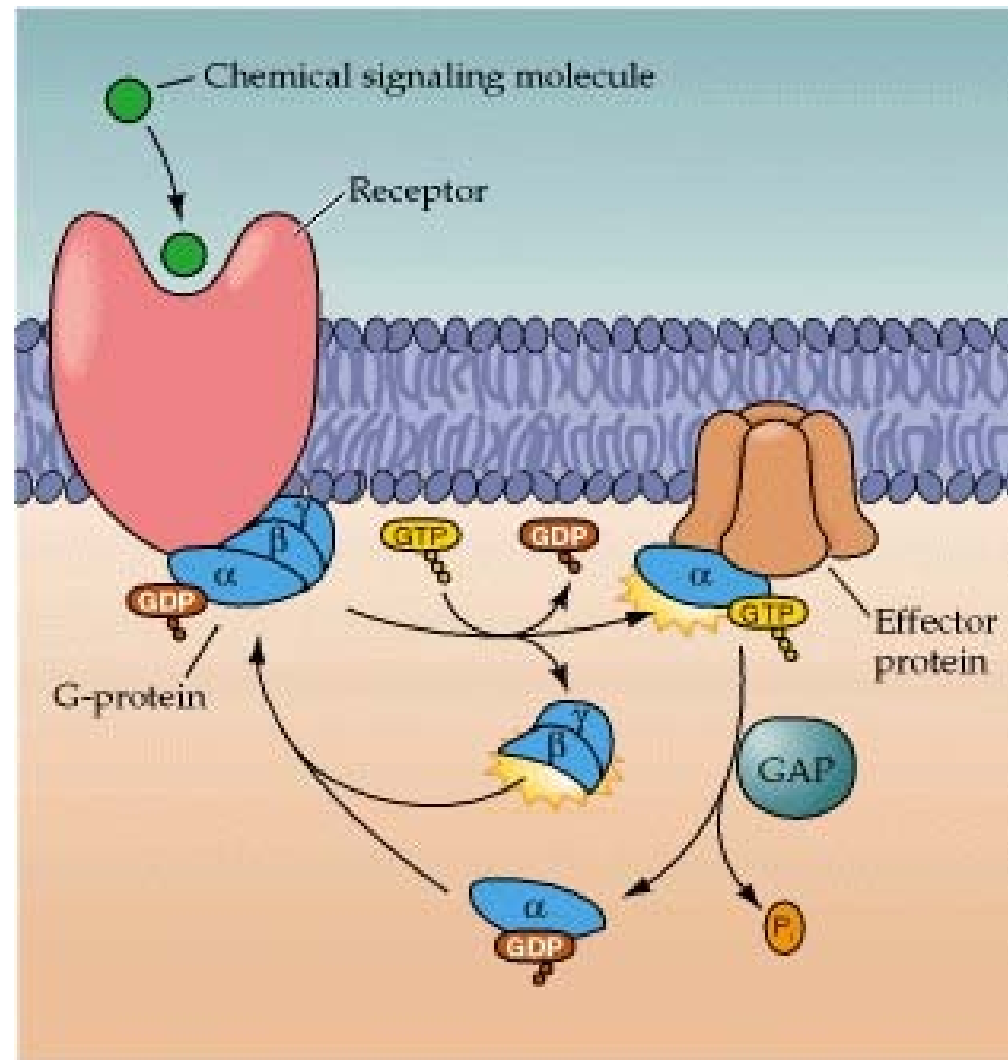
Palmitoil protein tioesteraza PTE – reverzibilna reakcija omogoča izmenjevanje proteinov med membranami in citosolom

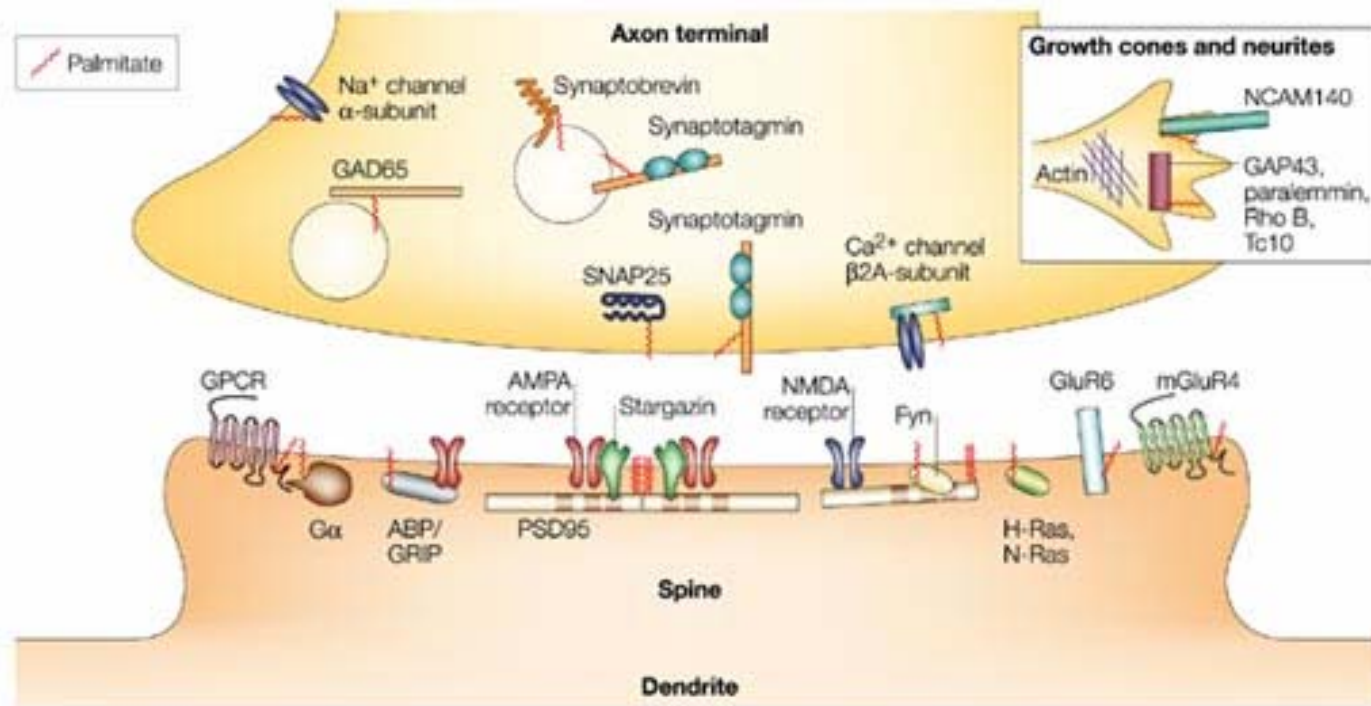
Osnovni motiv še ni bil odkrit.

Primeri:

- β adrenergični receptor
- α podenote G-proteinov
- H-Ras

- α podenote trimernih G-proteinov
- Po asociaciji z efektorjem – depalmitoilacija in relokalizacija v citosolu
- S tem se olajša hidroliza GTP – protein se resetira za nov celični cikel





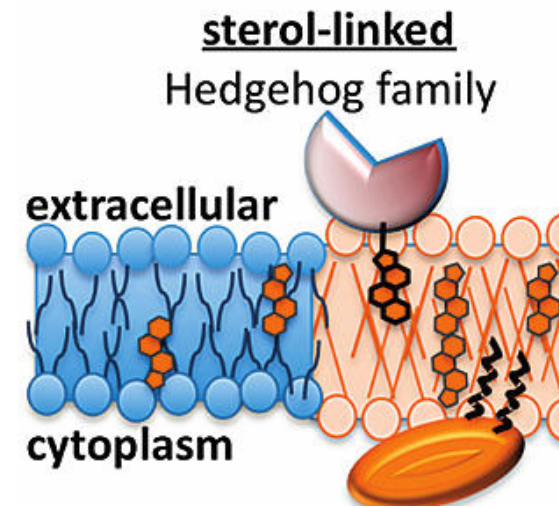
Nature Reviews | Neuroscience

- Palmitoilacija SNAP-25 proteina na presinaptičnem nevronu omogoča asociacijo kompleksa SNARE med fuzijo veziklov
- Vloga palmitoilacije pri regulaciji sproščanja neurotransmiterjev

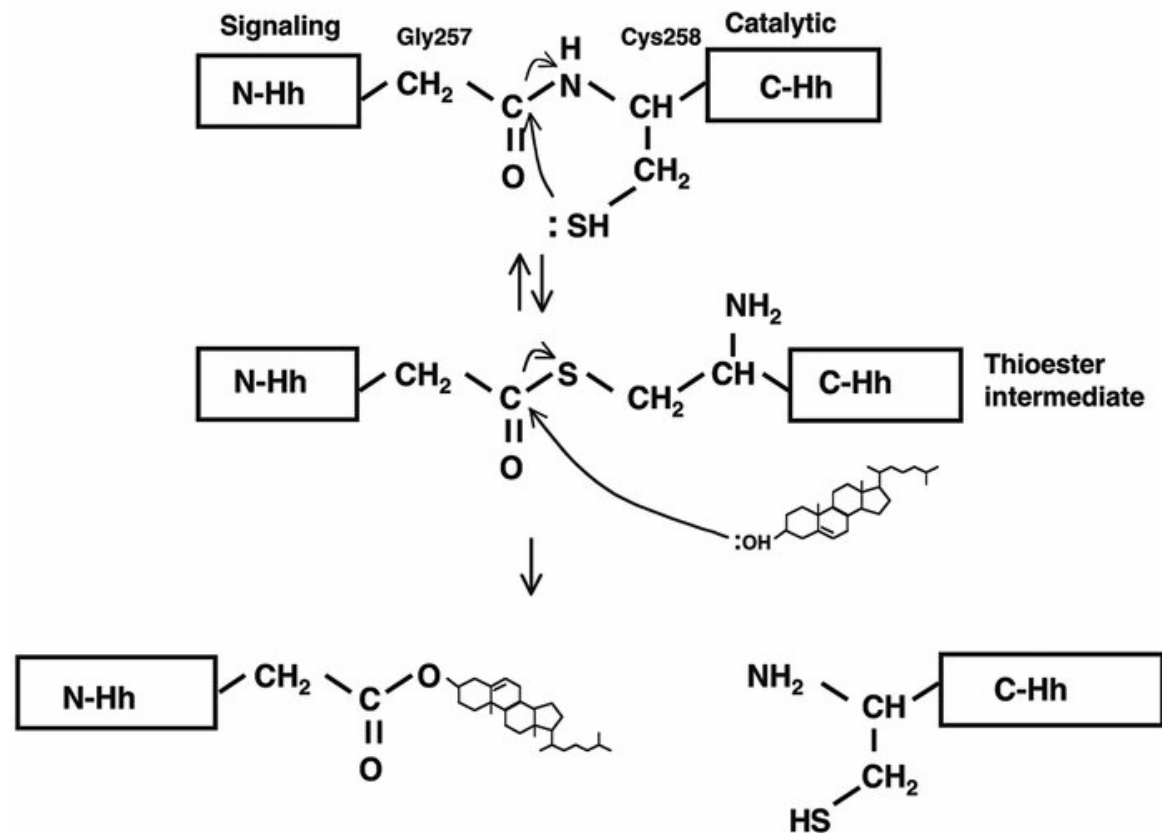
Holesterolna modifikacija Hedgehog proteinov

- Signalne molekule, esencialne za rast in obliko različnih delov telesa pri vretenčarskih in nevretenčarskih embrijih
- Pomembni tudi pri odraslih osebah – spremembe lahko povzročijo različne bolezni - rak

- promovirajo proliferacijo
- preprečujejo apoptozo
- določujejo, kako se bo celica diferencirala



Avtoprocesiranje Hh proteinov



Povzetek

- Prenilacija intracelularno
 - farnezilacija
 - preniltransferaze (tarče zdravil) -C-končni cistein –motiv caaX –
 - geranilgeranilacija
 - vloga pri celični rasti in diferenciaciji
- GPI sidro
 - transamidaza -C-konec proteina -E stran v lipidnih raftih -vloga pri imunskem odzivu
- Miristoilacija
 - N-miristiltransferaza -N-končni glicin -intracelularno -vloga pri celični signalizaciji
- Palmitoilacija
 - Protein palmitoil transferza -cistein -intracelularno v lipidnih raftih -vloga pri α -podenotah heterotrimernih G-proteinov
- Holesterolna modifikacija
 - avtoprocesiranje -C-konec proteina -ekstracelularno v lipidnih raftih -vloga pri rasti in obliki embrijev

Viri

- Casey, P. J. 1992. Biochemistry of protein prenylation. *J. Lipid Res.* Vol. 33: 1731–1740.
- Young, S. G. 2005. A thematic review series: Lipid modifications of proteins. *J. Lipid Res.* Vol. 46: 2529-2530.
- Levental, I. *et al.* 2010. Greasing Their Way: Lipid Modifications Determine Protein Association with Membrane Rafts. *Biochemistry.* Vol. 49: 6305–6316.
- Yalovsky, S. *et al.* 1999. Lipid modifications of proteins – slipping in and out of membranes. *Trends in plant science.* Vol. 4: 439-445.
- Casey, P. J. 1995. Protein lipidation in cell signaling. *Science.* Vol. 268: 221-225
- Jeong, J. and McMahon, A. P. 2002. Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *The Journal of Clinical Investigation.* Vol. 110: 591-596.