Ubikvitinacija

Košić, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:137984

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Kristina Košić

Ubikvitinacija

Završni rad

Mentor: Dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, docent

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

UBIKVITINACIJA

Kristina Košić

Mentor: Dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, docent

Kratak sažetak završnog rada:

Ubikvitinacija je glavni put selektivne razgradnje proteina u eukariotskim stanicama. Regulira širok raspon staničnih procesa, uključujući endocitozu, popravak DNA, degradaciju proteina, stanični ciklus i sl. Ključnu ulogu u tom posttranslacijskom mehanizmu imaju proteini ubikvitin (Ub) i proteasom, uz enzime E1, E2 i E3. Ubikvitin je poput biljega koji obilježava proteine određene za uništenje, a proteasom je sam egzekutor. Ukoliko dođe do poremećaja u radu ubikvitin-proteasom sustava (UPS) stanica je u nemogućnosti normalno funkcionirati te se javljaju bolesti. Tumori, autoimunost, neurodegenerativne bolesti, samo su neke od mogućih posljedica u radu UPS-a. Isto tako, različite vrste patogena imaju sposobnost manipulacije domaćinskim ubikvitinacijskim sustavom, što im omogućuje proliferaciju, stoga je važno razumjeti sam molekularni mehanizam kako bismo razvili nove antibakterijske i antitumorske strategije.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: ubikvitinacija, ubikvitin, proteasom, bolesti

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelor thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Biology

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

UBIQUITINATION

Kristina Košić

Supervisor: Ivna Štolfa Čamagajevac, PhD, Asst. Prof.

Short abstract:

Ubiquitination is the main mechanism of selective protein degradation in eukaryotic cells. It regulates a wide range of cellular processes, including endocytosis, DNA repair, protein degradation, cell cycle and similar. Main role in this posttranslation mechanism have proteins ubiquitin (Ub) and proteasome, with enzymes E1, E2 and E3. Ubiquitin marks proteins for degradation, while proteasom is the main executor. If a failure in ubiquitin-proteasom system (UPS) occurs, cell doesn't function normally and diseases may show. Tumors, autoimmunity, neurodegenerative diseases are just some of the possible outcomes. Also, various pathogens have ability to manipulate host ubiquitination system, allowing them to proliferate. Hence, it is important to understand molecular mechanism of ubiquitination, so new antibacterial and antitumor strategies can be developed.

Original in: Croatian

Key words: ubiquitination, ubiquitin, proteasome, disease

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb

Sadržaj

1. UVOD 6
2. PUT UBIKVITIN-PROTEASOM 7
2.1. STRUKTURA I MEHANIZAM PROTEASOMA 11
2.2. PROKARIOTSKI HOMOLOZI 12
3. UTJECAJ STRESA 13
3.1. OKSIDACIJSKI STRES 13
3.2. NF-kB 14
4. POSLJEDICE GREŠKE UPS 14
4.1. TUMORI 15
4.2. AUTOIMUNOST 16
4.3. NEURODEGENERATIVNE BOLESTI 16
5. BAKTERIJSKI UTJECAJ NA UPS 17
6. LIJEKOVI 18
7. ZAKLJUČAK 21
8. LITERATURA 22

Kratice

APC/C *Anaphase-promoting complex*

ATP Adenozin trifosfat

Cbl *E3 ubiquitin-protein ligase CBL, Cas-Br-M (murine)*

ciklin/CDK C*yclin-dependent kinase*

DANFIN N,N0-bis-(2,4-dimetil-pentil)-etan-1,2-diamin

DUB *Deubiquitinating enzymes*

EHEC/EPEC *Enterohemorrhagic E. coli/ Enteropathogenic E. coli*

HECT-domena *Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*

I-kB *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor*

MDM2 *Mouse double minute 2*

NF-kB *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

PINK1 *PTEN-induced putative kinase 1*

p53 Tumor supresorski gen

RGG motiv Arg-Gly-Gly motiv

RHD *Rel Homology Domain*

RING-domena *Really Interesting New Gene*

ROS *Reactive oxygen species*

RTK *Receptor tyrosine kinases*

SdeA Toksin bakterije *Legionella pneumophila*

SCG *Superior cervical ganglia*

ThiF Prokariotski homolog E1 eukariota, *hydroxyethylthiazole phosphate biosynthesis*

UPS Ubikvitin-proteasom sustav

1. UVOD

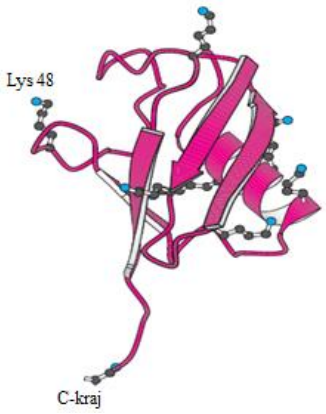
Razina proteina u stanici određena je intenzitetom sinteze, ali isto tako i udjelom njihove razgradnje. Poluvrijeme života proteina u stanici varira od nekoliko minuta do nekoliko sati, stoga je upravo vrijeme razgradnje važan čimbenik stanične regulacije. Primjerice, transkripcijski faktori koji djeluju kao regulatorne molekule, razgrađuju se velikom brzinom kako bi omogućile brzu promjenu u odgovoru na signale iz okoline. Isto tako, brza razgradnja omogućuje drugačiji mehanizam za regulaciju unutarstanične aktivnosti enzima. Od velike važnosti je prepoznati i brzo razgraditi oštećene ili nefunkcionalne proteine čime se posljedice pogreški nastale tijekom sinteze proteina uklanjaju (Cooper i sur. 2010).

Glavni put selektivne razgradnje proteina u eukariotskim stanicama je put ubikvitin-proteasom gdje ključnu ulogu ima protein ubikvitin (Ub). On služi kao privjesak koji obilježava jezgrene i citosolne proteine te ih time usmjerava na brzu proteolizu, odnosno uništenje. Ub je mali polipeptid, molekularne mase 8.5 kDa, izgrađen od 76 aminokiselina (Slika 1). Visoko je očuvan protein: ubikvitin čovjeka i kvasca razlikuje se samo u 3 ostatka, od njih 76 (Stryer i sur. 2013; Cooper i sur. 2010).

Ub-signalizacija regulira širok raspon staničnih procesa, uključujući degradaciju proteina, endocitozu, popravak DNA, transkripciju gena, stanični ciklus, upale i imunološke odgovore (Haglund i Dikic 2005).

Put ubikvitin-proteasom je glavni regulator u stanicama, stoga ukoliko dođe do poremećaja u radu istog, stanica je u nemogućnosti normalno funkcionirati te dolazi do posljedica koje mogu biti opasne, a na posljetku i kobne.

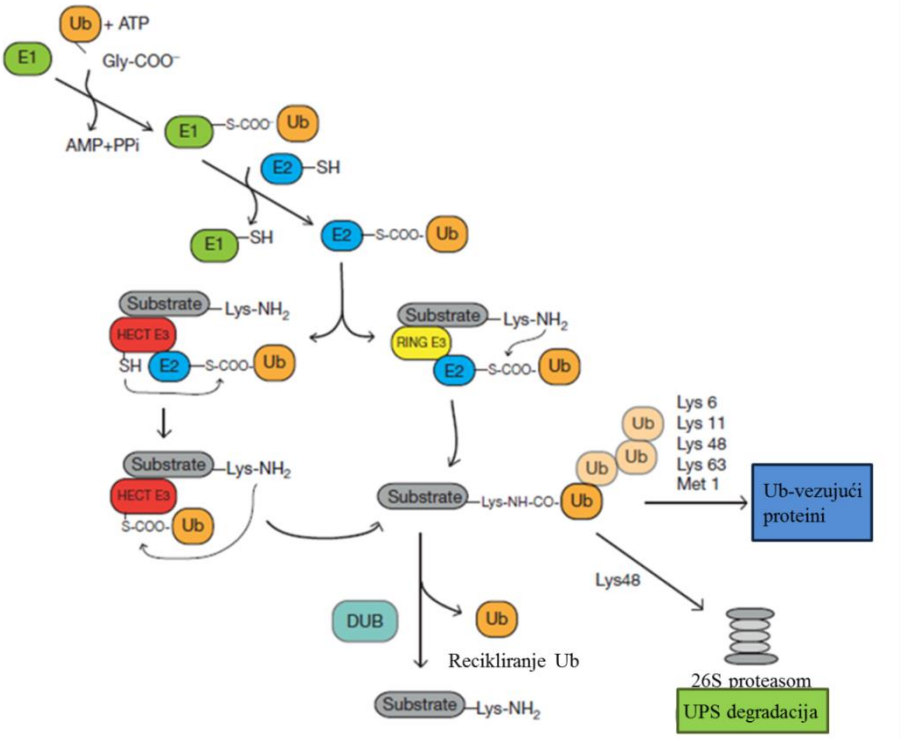
Profesor Đikić i njegovi suradnici posvetili su svoj rad izučavanju ubikvitinacije, te su otkrili na koji način patogeni kao što su vrste roda *Salmonella* i *Legionella* preuzimaju kontrolu nad stanicama i uzrokuju bolesti. Svojim radom, otvorili su mogućnost za razvoj novih vrsta antibakterijskih lijekova, ali i mnogih drugih.



Slika 1. Struktura ubikvitina (preuzeto i prilagođeno prema Stryer i sur. 2013).

2. PUT UBIKVITIN-PROTEASOM

Ubikvitin (Ub) je visoko očuvani globularni protein. Njegov fleksibilan C-terminalni kraj nosi karakterističan RGG motiv (Arg-Gly-Gly motiv) koji se kovalentno veže na ε-amino-skupine lizinskih (Lys) ostataka supstratnih proteina predodređenih za razgradnje. Proces konjugacije zahtjeva koordinirano djelovanje triju enzima: Ub-aktivirajući enzim (E1), Ub-konjugirajući enzim (E2) i Ub-protein-ligaza (E3) (Slika 2).



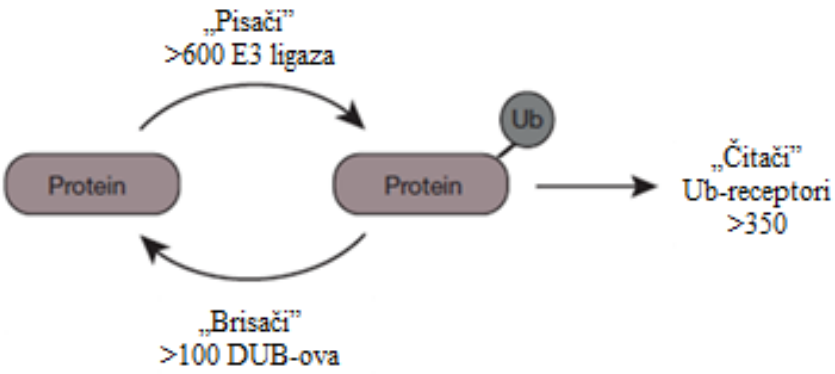
Slika 2. Put ubikvitin-proteasom (preuzeto i prilagođeno prema Holler i Dikic 2014).

U prvom koraku, C-terminalna karboksilna skupina glicina (Gly, G) Ub povezuje se sa sulfihidrilnom skupinom E1 tvoreći E1~Ub tioestersku vezu. Ta je reakcija potpomognuta molekulom ATP. Aktivirani se Ub potom prebacuje na sulfihidrilnu skupinu E2, čime se stvara tioesterska veza E2~Ub. U zadnjem koraku, E2~Ub surađuje sa E3, ubikvitin-protein-ligazom, koja katalizira prijenos Ub na supstratni protein stvarajući izopeptidnu vezu između ε-amino-skupine Lys ostatka supstrata i C-terminalnog glicina Ub. U manjoj mjeri, serin, treonin, cistein i N-terminalna amino skupina supstratnog proteina se povezuje s Ub.

E3 ligaza je jedina komponenta mehanizma konjugacije koja se direktno veže na supstrat, te je stoga odgovorna za specifičnost istog. Eukariotske stanice sadrže 2 enzima E1, 25 E2 i oko 600 E3. Obitelj ubikvitin-protein-ligaza, jedna je od najvećih genskih porodica u ljudskom tijelu. E3 ligaze mogu se podijeliti u tri glavne skupine: RING-tip, HECT-tip i U-box-tip. Najzastupljeniji tip E3 ligaze sadrži domenu cinkovog prsta – RING (engl. *really interesting new gene*). RING E3 ligaza izravno prenosi E2~Ub na supstrat. S druge strane, HECT (engl. *Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*)-tip E3 najprije tvori tioestersku vezu s Ub koji više nije vezan za E2, te se tek naknadno Ub veže na supstrat. U-box E3 je modificirani oblik RING-tipa i djeluje na sličan način kao i RING E3 (Holler i Dikic 2014).

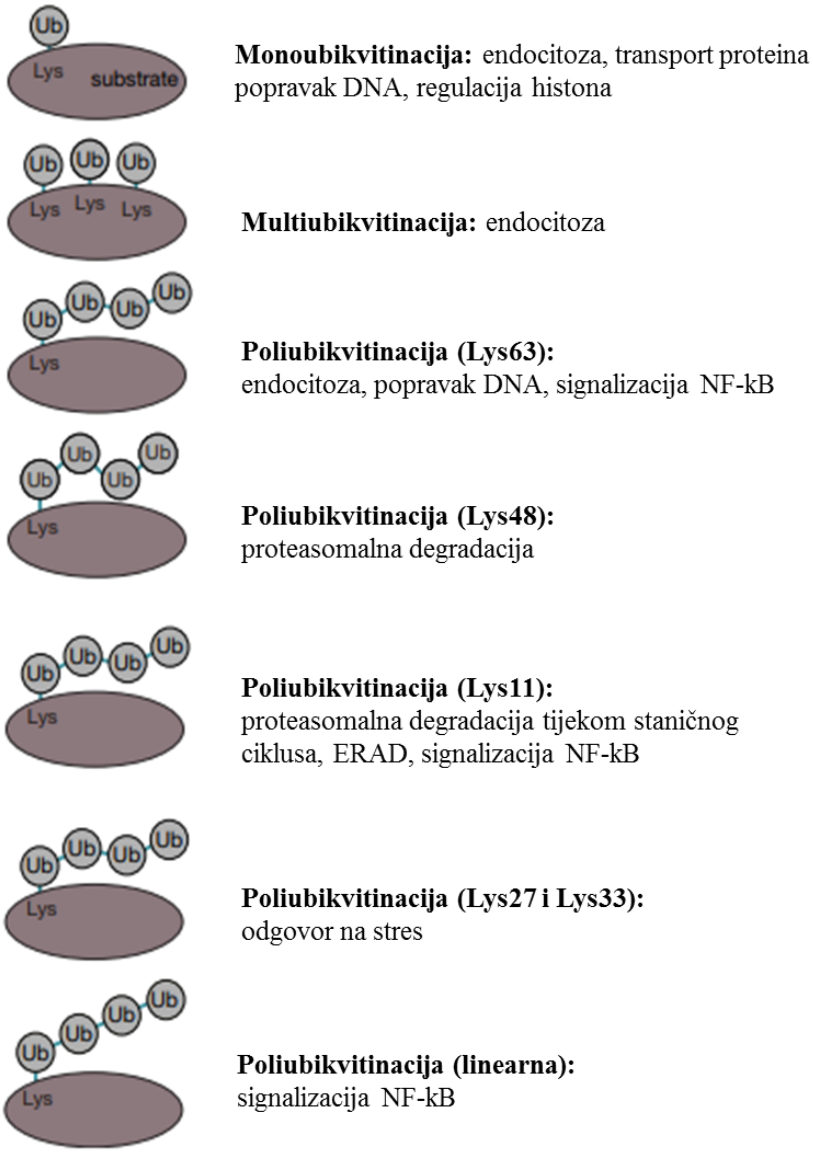
Poluvrijeme života citoplazmatskoga proteina određeno je amino-terminalnim ostatkom, što se naziva *pravilo N-kraja*. Primjerice, proteini kvasca s argininom (Arg) ili leucinom (Leu) na N-kraju ima poluvrijeme života oko 2 minute, dok je poluvrijeme života proteina s metioninom (Met) ili prolinom (Pro) na tom položaju oko 20 sati (Stryer i sur. 2013).

Ubikvitinacija je reverzibilan proces. U ljudskom genomu postoji oko 100 deubikvitinacijskih enzima (DUB) koji uklanjaju Ub sa supstrata i recikliraju ga (Slika 3). Osim toga, Ub je napravljen kao prekursor koji se sastoji od višestrukih Ub proteina koji mogu tvoriti lanac. DUB igra važnu ulogu u cijepanju tog prekursora (Holler i Dikic 2014).



Slika 3. Ub *network* (preuzeto i prilagođeno prema Holler i Dikic 2014).

Među svim poznatim posttranslacijskim modifikacijama, ubikvitinacija je najsvestranija jer Ub sadrži sedam lizina (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 i Lys63) koji stvaraju veliki broj različitih veza između Ub i supstrata (Slika 4). Pokazano je da svaka veza Ub i supstrata aktivira različite stanične odgovore: vezana jedna molekula Ub (monoubikvitinacija) predstavlja signal za endocitozu i lizosomalnu degradaciju. Lys48 vezani lanac označava proteine za proteasomalnu degradaciju, Lys11 lanac signalizira proteasomalnu degradaciju tijekom staničnog ciklusa i degradaciju endoplazmatskog retikuluma (Holler i Dikic 2014).

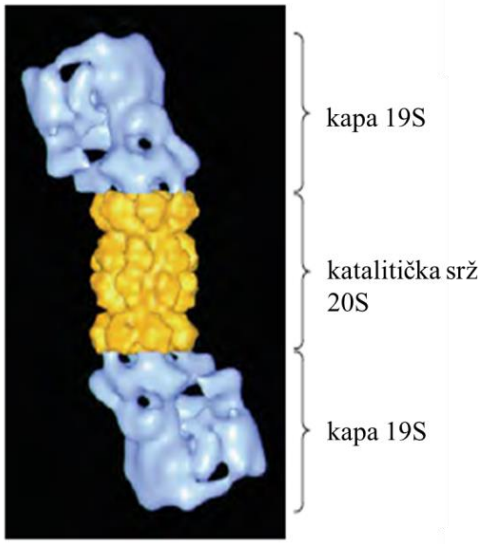


Slika 4. Tipovi Ub veza i proteolitičke/neproteolitičke fukcije (preuzeto i prilagođeno prema Holler i Dikic 2014).

Posljednji korak put ubikvitin-proteasoma je razgradnja ubikvitinom obilježene proteine. Proteasom ili 26S-proteasom je veliki proteazni kompleks koji razgrađuje proteine u male peptidne fragmente s kojih se zatim uklanja Ub i reciklira. Potom se peptidni fragmenti dalje razgrađuju do slobodnih aminokiselina, koje se mogu upotrijebiti za reakcije biosinteze, primjerice za sintezu proteina. Isto tako može se ukloniti amino skupina te nastaje urea, dok se okosnica ugljika može upotrijebiti u sintezi masti, ugljikohidrata ili kao gorivo u procesu staničnog disanja (Holler i Dikic 2014).

2.1. STRUKTURA I MEHANIZAM PROTEASOMA

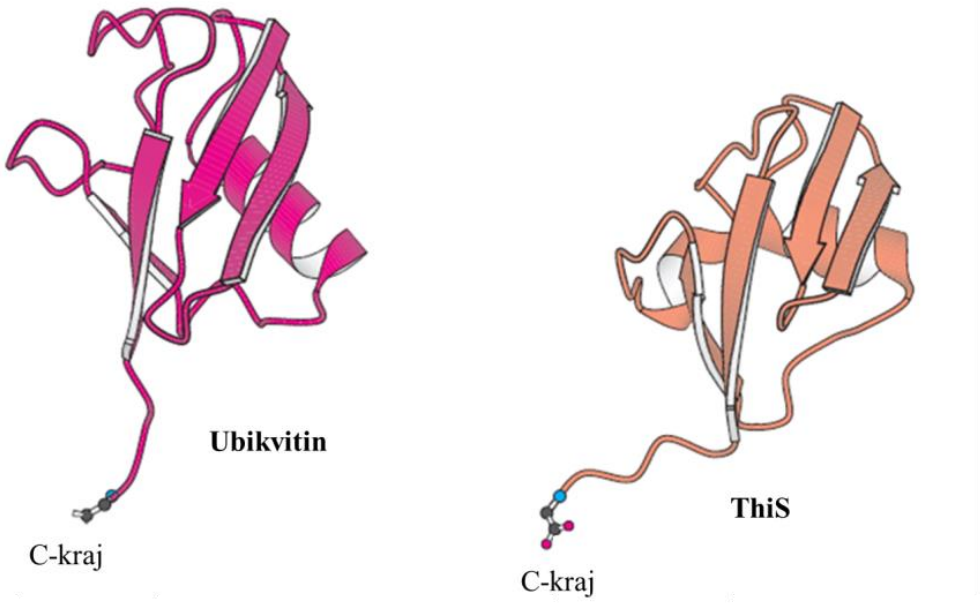
Ubikvitin-proteasom sustav (UPS) je glavni stanični sustav za razgradnju topljivih proteina i regulator temeljnih staničnih procesa kao što je popravak DNA. Proteasom 26S, mase 1.4 MDa, je konačni egzekutor proteina. Sastavljen je od katalitičke srži 20S, potpuno zatvorene bačvaste strukture gdje dolazi do degradacije, i regulatorne jedinice 19S (Slika 5). Jedinica 20S građena je od 14 homolognih podjedinica, čije su kopije razmještene u dva prstena. Dva vanjska prstena čini α-podjedinica, dok unutarnje čini β-podjedinica. Sam ulaz u unutrašnjost katalitičke srži reguliran je dvjema jedinicama 19S. Uloga regulatorne jedinice 19S je da veže poli-Ub lance kako bi se osigurao raspad samo proteinima koji su za to obilježeni, potom uništi strukturu supstrata proteina te inducira konformacijske promjene u katalitičkoj srži 20S, što omogućuje supstratu ulazak u samo središte kompleksa gdje je smješteno aktivno mjesto. Supstrat se prvo raspada na peptide od sedam do devet aminokiselina, pri čemu izopeptidaza iz 19S jedinice miče molekule Ub koje se recikliraju, a proteaze razgrađuju peptide do pojedinačnih aminokiselina ((Holler i Dikic 2014; Stryer i sur. 2013).



Slika 5. 26S-proteasom (preuzeto i prilagođeno prema Stryer i sur. 2013).

2.2. PROKARIOTSKI HOMOLOZI

Ub-proteasom sustav (UPS) pronađen je i objašnjen u eukariotskim stanicama, no homolozi proteasoma pronađeni su i u prokariotima. Arhejski proteasomi također imaju 28 podjedinica. Međutim, u arhejskom proteasomu α-podjedinice vanjskog prstena i β-podjedinice unutarnjeg prstena su istovjetne, dok kod eukariota pripadaju jednom od sedam različitih izooblika. Protein Ub nije nađen u prokariota, no molekularni predci jesu. Uloga tih proteina jest da sudjeluju u sintezi koenzima tiamina. Enzim ključan za taj biološki proces je ThiF (engl. *hydroxyethylthiazole phosphate biosynthesis*), koji aktivira protein ThiS. ThiF je homolog ljudskom E1. Trodimenzionalna struktura proteina ThiS podsjeća na ubikvitin, iako sadrže samo 14% jednakih aminokiselina (Slika 6). Možemo zaključiti kako je eukariotski sustav za modifikaciju proteina evoluirao iz prokariotskog puta biosinteze koenzima tiamina (Stryer i sur. 2013).



Slika 6. Usporedba strukture proteina ubikvitina i ThiS (preuzeto i prilagođeno prema Stryer i sur. 2013).

3. UTJECAJ STRESA

Ubikvitinska i proteasomalna aktivnost potrebna je stanicama kako bi se one mogle održati u stanju stresa. Pad aktivnosti proteasoma, povezano starošću ili inducirano kemikalijama, smanjuje otpornost stanice na stres.

3.1. OKSIDACIJSKI STRES

Jedan od najčešćih uzroka oboljenja kod ljudi jest oksidacijski stres, oštećenje uzrokovano reaktivnim kisikovim vrstama (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Suvišak ROS-a može oštetiti mnoge stanične komponente, kao što su proteini, DNA i lipidi, ali isto tako uzrokuje probleme u metabolizmu stanice. Oksidacijska oštećenja povezana su s nekoliko bolesti, uključujući tumore, dijabetes, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, ali i starenje. Obrambeni mehanizmi protiv oksidacijskog oštećenja uključuju neenzimske antioksidanse i antioksidacijske enzime koji „gase“ suvišak ROS-a, molekularne šaperone (engl. *chaperone*) koji pomažu u popravljanju oksidiranih proteina, te proteolitičke sustave koji eliminiraju ireverzibilno oštećene proteine. Nema sumnje da su proteasomi glavni egzekutori oksidiranih proteina, no pitanje je u kojoj mjeri je Ub potreban. Blagi oksidacijski stres aktivira ubikvitinaciju (E1, E2, E3 enzime) i potiče stvaranje Ub konjuganata. Međutim, velik broj oksidiranih proteina izravno se veže na proteasom te se samostalno degradiraju. Povećana proteasomalna degradacija regulatornih proteina, kao što je I-kB (engl. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor*), kao odgovor na blagi oksidacijski stres, također ima ulogu u suočavanju sa stresom aktivirajući put NF-kB (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Isto tako, sam Ub i proteasomi, kao i ostale stanične komponente, ugrožene su djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta. Proteini E1, E2, HECT-tip E3 i DUB imaju cisteinske (Cys) ostatke u svom aktivnom mjestu koji reagiraju s oksidiranim glutationom (GSSG, proizveden nakon izlaganja oksidacijskom stresu), tako reverzibilno blokirajući njihovu vezu s Ub (Holler i Dikic 2014).

3.2. NF-kB

NF-kB je obitelj transkripcijskih faktora i regulatora ekspresije ljudskih gena koji uključuje imunološki odgovor, staničnu proliferaciju i razvoj stanice (Uematsu i sur. 2018).

Glavni put za pokretanje stresnih odgovora i imunološke aktivnosti nakon invazije patogena, kontrolira transkripcijski faktor NF-kB. S druge strane, prekomjerno signalizirane NF-kB (npr. zbog kroničnih infekcija uzrokovanih patogenima ili genetskih aberacija u regulatornom putu komponenata) je povezano s upalnim i malignim bolestima kao što su B-limfom stanica, mijelom, rak debelog crijeva i neurodegenerativne bolesti. Na molekularnoj razini put NF-kB je čvrsto reguliran proteolitičkom i neproteolitičkom ubikvitinacijom. U „mirujućim“ stanicama, NF-kB proteini ostaju neaktivni u citoplazmi zbog djelovanja inhibitora I-kB proteina. Kao odgovor na signale upalnog procesa koji se vežu na membranske receptore, I-kB se fosforilira tvoreći tako vezno mjesto za enzim E3. Dolazi do ubikvitinacije i proteasomalne degradacije pri čemu se oslobađa NF-kB. Aktivirani NF-kB seli u jezgru i vrši svoju funkciju kao transkripcijski faktor gdje kontrolira ekspresiju brojnih gena obrambenog mehanizma (Holler i Dikic 2014).

4. POSLJEDICE GREŠKE UPS

UPS je glavni regulator u stanicama, uključen je gotovo u svaki fiziološki proces, stoga ukoliko dođe do greške u njegovom radu stanica je u nemogućnosti normalno funkcionirati i reagirati na unutarnje i vanjske promjene i podražaje. Konkretno, promjene ili mutacije koje utječu ne samo na E3 ligazu, već i na DUB-ove, povezane su s pojavom bolesti u ljudi, uključujući tumore, neurodegenerativne bolesti, dijabetes, slab imunološki sustav ili autoimune bolesti (Holler i Dikic 2014).

Primjerice, oštećenja ubikvitin-proteasom puta uzrokuju agregaciju proteina što dovodi do pojave bolesti kao što je Parkinsonova bolest, Angelmanov sindrom (AS), rijedak neurogenetički upalni poremećaj karakteriziran ograničenom ekspresijom govora, mentalnom retardacijom, epileptičkim napadajima, disfunkcijom sna i poremećajem kretanja. S druge strane, nekontrolirana proteoliza može isto tako za posljedicu imati opasne patološke poremećaje. Humani papilomavirus (HPV) jedan je od uzročnika nekontrolirane pretvorbe proteina. HPV kodira protein koji aktivira specifični put

ubikvitin-proteasoma, čime dolazi do ubikvitinacije tumor supresorskog gena p53 koji nadzire popravak DNA. Aktivacija tog specifičnog oblika ubikvitin-proteasom puta u 90% slučajeva razlog je pojave raka grlića maternice (Pollack i sur. 2018; Stryer i sur. 2013).

4.1. TUMORI

Tumor je izraz za svaku nenormalnu proliferaciju stanica u tijelu koja može biti dobroćudna ili zloćudna. Osnovna razlika između dobroćudnog i zloćudnog oblika tumora je tu tome što se dobroćudni tumor ne širi u susjedna tkiva, dok su zloćudni tumori u stanju proširiti se čitavim tijelom preko limfnog ili krvožilnog sustava. Temeljni poremećaj koji vodi ka stvaranju ove bolesti jest trajno poremećena proliferacija stanica tumora koje pritom ne reagiraju na signale koji kontroliraju ponašanje zdravih stanica. Tumorske stanice se nekontrolirano dijele i rastu, šireći se pri tome na ostala tkiva pri čemu šire i sam poremećaj regulacijskih sustava stanica. S obzirom da tumor nastaje zbog poremećaja temeljnih regulacijskih mehanizama u stanici, bolest je važno razumjeti na staničnoj i molekularnoj razini (Cooper i sur. 2010).

Temeljni razlozi razvoja tumora jesu mutacije u genima koji eksprimiraju ključne kontrolne proteine. E3 ligaze izravno utječu na tumorigenezu jer reguliraju stabilnost onkogena ili tumor supresora preko proteasomalne ili lizosomalne degradacije. Istaknuti primjer je MDM2 (engl. *Mouse double minute 2*) koji cilja tumor supresor p53 i SCG (engl. *Superior cervical ganglia*) i APC/C (engl. *Anaphase-promoting complex*) ligaze, koji kontroliraju napredovanje staničnog ciklusa i mitotički izlaz, kontrolirajući stabilnosti ciklin/CDK (engl. *Cyclin-dependent kinases*) kompleksa i inhibitora staničnog ciklusa p27. Također, članovi Cbl obitelji E3 ligaze su proto-onkogeni koji igraju važnu ulogu u *down*-regulaciji aktivacije RTK (engl. *Receptor tyrosine kinases*) kroz lizosomalno sortiranje i degradaciju. Ali isto tako, neproteolitička ubikvitinacija igra ulogu u razvoju i u samoj prevenciji tumora. Nekoliko puteva popravaka DNA ovise o monoubikvitinaciji ili atipičnom Ub lancu (Holler i Dikic 2014).

4.2. AUTOIMUNOST

Neuspjeh organizma da prepozna konstitutivni dio sebe potiče imuni odgovor na vlastite stanice, što uzrokuje autoimune bolesti, uključujući *diabetes mellitus* tip 1, sistemski *lupus eritematodes*, reumatski artritis i alergije.

Prekomjerna aktivacija NF-kB, jedan je od najbolje proučavanijih uzroka nenormalne aktivnosti imunološkog sustava koji dovodi do navedenih bolesti. A20 je Ub-*editing* enzim koji ograničava signalno trajanje i intenzitet nekoliko molekula uključenih u NF-kB put, no specifični polimorfizam u A20 genskom lokusu predisponira ljude na autoimune bolesti. U B-stanicama, A20 ograničava proizvodnju autoantitijela, protutijela koje organizam stvara na vlastite antigene pri čemu dolazi do razvoja autoimunih bolesti (Holler i Dikic 2014).

4.3. NEURODEGENERATIVNE BOLESTI

Nusproizvodi mitohondrijskih energetskih puteva su toksični slobodni radikali koji mogu uzrokovati oksidacijski stres ukoliko njihova razina prijeđe optimalnu vrijednost, koju stanica ne može metabolizirati. Stoga je nefunkcionalne mitohondrije potrebno ukloniti Ub-ovisnim procesom koji se zove mitofagija. Protein kinaza PINK1 (engl. *PTEN-induced putative kinase 1*) prepoznaje nefunkcionalni mitohondrij te aktivira Parkin, Ub-E3 ligazu, koja selektivno razara mitohondrij. Parkin označava oštećeni organel pričvršćivanjem poli-Ub lanca na nekoliko vanjskih proteina mitohondrijske membrane te dolazi do autofagije (mitofagije). Temeljna važnost ovog puta je činjenica da genetskim gubitkom PINK1 ili Parkin-a dovodi do ranog početka razvoja Parkinsonove bolesti (PD) (Holler i Dikic 2014).

PD je neurodegenerativna progresivna bolest koja se javlja zbog oštećenja nigrostrijatalnog dopaminergičnog sustava, te se očituje poremećajima pokreta, nestabilnošću stava i rigidnošću mišića. Propadanje neurona *substantiae nigrae* jest uzrok propadanja nigrostrijalnoga puta, često se javljaju i Lewyjeva tjelešca koja sadrže neurofilamente, alfa-sinuklein i ubikvitin (Damjanov i sur. 2008).

Osim oksidacijskog stresa, formiranje agregata proteina je također uzrok razvoja neurodegenerativnih bolesti, uključujući PD, Alzheimerovu bolesti ili Huntingtonovu

bolest. Karakteristična značajka agregata je činjenica da sadrže značajne količine ubikvitiniranih proteina. Zapravo, odstupanja u Ub-ovisnom sustavu degradacije uzrokuju neurodegenerativne bolesti. UPS je glavni put razgradnje oštećenih proteina, no ne može ukloniti agregirane proteina jer se oni ne mogu razmotati i umetnuti u proteasomalnu strukturu. Stoga se stanice uklanjaju procesom autofagije. Autofagija je autodestruktivan proces razgradnje organela i citoplazmatskih proteina pri čemu se oni okružuju vezikulama endoplazmatskog retikuluma (ER) te stapaju s lizosomima. Primjer abnormalnih agregata proteina su Lewyjeva tjelešca u mozgu osobe s PD (Holler i Dikic 2014; Cooper i sur. 2010).

5. BAKTERIJSKI UTJECAJ NA UPS

Dijareja je najčešći oblik bolesti u svijetu. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) procjenjuje da 1.9 milijardi ljudi godišnje oboli od te bolesti, dok njih 715 000 umre. Prema procjenama, trećina ovih infekcija prenosi se hranom. U većini slučajeva radi se o gram-negativnoj bakteriji roda *Salmonella*. Godišnje 100 milijuna ljudi bude zaraženo tim fakultativnim unutarstaničnim patogenom koji napada epitelne stanice i makrofage (Besser 2018).

Iako prokarioti ne sadrže molekulu ubikvitin, uspješno su evoluirali kako bi iskoristili ubikvitin u svoju korist. Status Ub kod više od 500 proteina domadara se mijenja tijekom infekcije bakterijom roda *Salmonella*, ali istovremeno je sama bakterija meta ubikvitinacije koja ograničava njenu proliferaciju u domaćinskoj stanici. Unatoč velikim naporima da se identificiraju mjesta vezanja Ub na površini bakterije, identificirano je samo nekoliko vanjskih membranskih proteina. Stoga, identifikacija procesa ubikvitinacije bakterije roda *Salmonella* nosi svoje poteškoće (Herhaus i Dikic 2017).

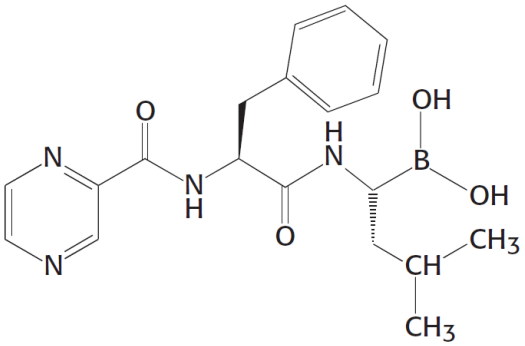
Sposobnost moduliranja eukariotskog UPS-a odlika je i drugih unutarstaničnih patogena poput bakterija roda *Legionella*, *Shigella* i EHEC/EPEC (engl. *Enterohemorrhagic E. coli/ Enteropathogenic E. coli*) stoga oni otvaraju put razvoju novih antibiotskih strategija. Bakterija *Legionella* je gram-negativna bakterija koja uzrokuje težak oblik upale pluća, poznatiji kao legionarska bolest, dok je *Shigella* također gram-negativna bakterija koja uzrokuje crijevne bolesti. EHEC/EPEC-entero-hemoragična *Escherichia coli*, gdje nakon infekcije dolazi do pojave proljeva, hemolitičko-uremičkog

sindroma, pa čak i smrtonosnog ishoda. Bakterijski efektorski proteini otimaju puteve ubikvitinacije domaćina različitim mehanizmima poput molekularne mimikrije. Nedavno je otkriveno da SdeA, efektorski protein vrste *Legionella pneumophila*, ima mogućnost prijenosa ubikvitina na domaćinske ciljne proteine u odsutnosti ATP, E1 i E2 enzima. SdeA ima fosfodiesteraznu aktivnost i prenosi Ub stvaranjem ADP-riboziliranog ubikvitina u ovisnosti o nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD). Fosforibozilirani ubikvitin se zatim prenosi na serinske (Ser) ostatke domaćinskih ciljnih proteina putem fosfodiesterske veze. Proizvodnja fosforiboziliranog ubikvitina blokira domaćinski ubikvitinski mehanizam uključujući proteasomalnu degradaciju (Bhogaraju i sur. 2016).

Da bi se uspješno borili protiv unutarnjih patogena, od ključne važnosti su daljnja istraživanja karakteristika bakterijske E3 ligaze i DUB-ova. Na primjer, E3 ligaza koja generira K63-vezani-Ub-lanca na vanjsku površinu bakterije roda *Salmonella* je još uvijek nepoznanica. Štoviše, sama manipulacija patogena domaćinskim UPS-om mora biti dalje istražena (Herhaus i Dikic 2017).

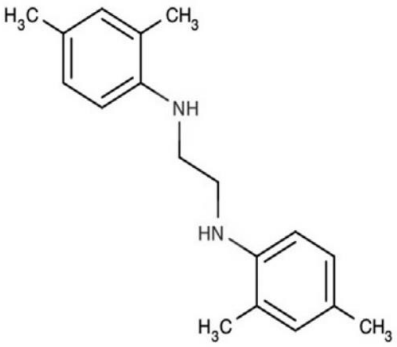
6. LIJEKOVI

Multipli mijelom je progresivna zloćudna bolest pri kojoj dolazi do nekontrolirane proliferacije plazma stanica u koštanoj srži. Liječenje ove bolesti dramatično se promijenilo u posljednjih desetak godina primjenom Bortezomiba (Slika 7), Talidomida i Lenalidomida. Bortezomib, dipeptidilboronska kiselina, je prvi odobreni lijek za liječenje mijeloma koji inhibira rad proteasoma. S obzirom da rast tumora ovisi o razgradnji proteina koji reguliraju staničnu proliferaciju i preživljavanje, proteasomi su znanstvenicima postali ciljne molekule za razvoj antitumorskih strategija. Međutim, multipli mijelom ostao je neizlječiv zbog stečene kemoterapijske otpornosti (Uematsu i sur. 2018; Cooper i sur. 2010).

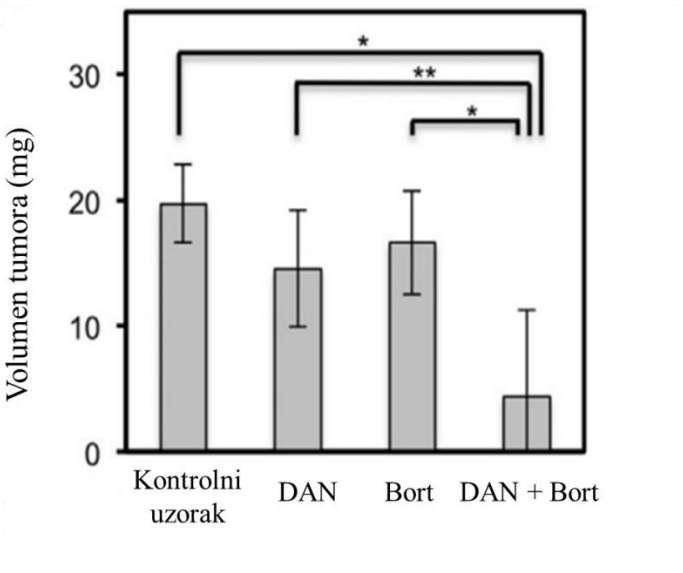


Slika 7. Bortezomib (preuzeto iz Stryer i sur. 2013).

Isto tako, poznato je da NF-kB igra ključnu ulogu u patogenezi bolesti. Uematsu i sur. (2018) utvrdili su kako DANFIN (N,N0-bis-(2,4-dimetil-pentil)-etan-1,2-diamin) (Slika 8) funkcionira kao inhibitor p65 obitelji proteina i inducira kemijsku osjetljivost Bortezomiba u liječenju multiplog mijeloma. DANFIN inhibira interakciju p65 i I-kB bez inhibicije DNA vezujućeg djelovanja proteina p65. Osim toga, DANFIN je utjecao na I-kB vezujuću regiju RHD (engl. *Rel Homology Domain*) i potisnuo nuklearnu translokaciju p65 u stanici. Dakle, u stanicama multiplog mijeloma, DANFIN je suzbio ekspresiju NF-kB ciljnih gena i izazvao apoptozu. Kombinacijom DANFIN-a i Bortezomiba u terapiji liječenja multiplog mijeloma povećala se apoptoza stanica bolesti i terapeutici su pokazali izvanredni anti-tumorski učinak na modelu miša (Slika 9).



Slika 8. DANFIN (preuzeto iz Uematsu i sur. 2018).



Slika 9. Volumen tumora u odnosu na kombinaciju Bortezomiba (Bort) i DANFIN-a (DAN) ((preuzeto i prilagođeno prema Uematsu i sur. 2018).

7. ZAKLJUČAK

Transkripcija gena, napredovanje staničnog ciklusa, stvaranje organa, supresija gena, metabolizam kolesterola, obrada antigena samo su neki od brojnih fizioloških procesa koje nadzire ubikvitin-proteasom sustav. Među posttranslacijskim modelima, uključujući fosforilaciju, acetiliranje i metilaciju, upravo UPS ima najveću ulogu u kontroli funkcioniranja stanica. Stoga znanstvenici više napora ulažu u dodatna otkrića i spoznaje o UPS kako bi razvili učinkovite metode liječenja neurodegenerativnih bolesti, tumora i imunoloških poremećaja kojima bi „metu“ predstavljala upravo ubikvitinacija. Isto tako, bilo bi poželjno razviti nove antibakterijske lijekove koji specifično inhibiraju bakterijske efektorske proteine, a koji su otporni na konvencionalne antibiotike. Efektori s novim enzimatskim aktivnostima, kao Ipah obitelj E3 ligaza, mogu biti privlačni jer se njihov molekularni mehanizam razlikuje od E3 ligaze sisavaca, a prisutni su u brojnim bakterijskim patogenima. Terapeutski pristup koji cilja E3 ubikvitin ligaze i dalje ima prepreke u odnosu na druge ciljne molekule poput kinaza. Važno je da potencijalni lijekovi iskoriste razlike enzima kod sisavaca i prokariota. Stoga je neophodno razumjeti kako bakterijski efektorski proteini obavljaju svoju funkciju. Uspješan primjer lijeka je spoj *oxathiazol-2-one*, koji inhibira proteasome bakterija tuberkuloze, ali ne i ljudske proteasome. Nažalost, bakterija tuberkuloze je jedini bakterijski patogen za koji se zna da sadrži proteasom, stoga se ovaj spoj ne može koristiti za tretiranje drugih infekcija. Zaključno, bakterijski efektorski proteini, koji manipuliraju domaćinskim ubikvitinacijskim mehanizmom, su snažan alat koji omogućuje proliferaciju patogena, stoga je od vitalnog značaja za daljnji razvoj antibakterijskih terapeutskih strategija, razumijevanje ovog molekularnog mehanizma (Herhaus i Dikic 2017).

8. LITERATURA

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2013) Biokemija, 1. izdanje. Zagreb, Školska knjiga.

Besser, J. M. (2018) *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. Food Microbiology 71: 55-59.

Bhogaraju, S., Kalayil, S., Liu, Y., Bonn, F., Colby, T., Matic, I., Dikic, I. (2016) Phosphoribosylation of Ubiquitin Promotes Serine Ubiquitination and Impairs Conventional Ubiquitination. Cell 167: 1636-1649.

Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2010) Stanica – Molekularni pristup, 5. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada.

Damjanov, I., Jukić, S., Nola, M. (2008) Patologija, 2. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada.

Haglund, K., Dikic, I. (2005) EMBO Journal 7: 3353-3359.

Herhaus, L., Dikic, I. (2017) Regulation of *Salmonella*-host cell interactions via the ubiquitin system. International Journal of Medical Microbiology 308: 176-184.

Holler, D., Dikic, I. (2014) Cell Adaptation, Injury, and Death: Ubiquitin–Proteasome System. Pathobiology of Human Disease 79-87.

Pollack, S. F., Grocott, O. R., Parkin, K. A., Larson, A. M., Thibert, R. L. (2018) Myoclonus in Angelman syndrome. Epilepsy & Behavior 82: 170-174.

Uematsu, A., Kido, K., Manabe, E., Takeda, H., Takahashi, H., Hayashi, M., Imai, Y., Sawasaki, T. (2018) DANFIN functions as an inhibitor of transcription factor NF-kB and potentiates the antitumor effect of bortezomib in multiple myeloma. Biochemical and Biophysical Research Communications 495: 2289-2295.