

# Arginilacija kao posttranslacijska modifikacija proteina

---

Cvrtila, Adam

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:327007>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**ARGINILACIJA KAO POSTTRANSLACIJSKA MODIFIKACIJA**  
**PROTEINA**

**ARGINYLATION AS A POSTTRANSLATIONAL PROTEIN**  
**MODIFICATION**

**SEMINARSKI RAD**

Adam Cvrtila  
Preddiplomski studij biologije  
(Undergraduate Study of Biology)  
Mentor: doc. dr. sc. Boris Mildner

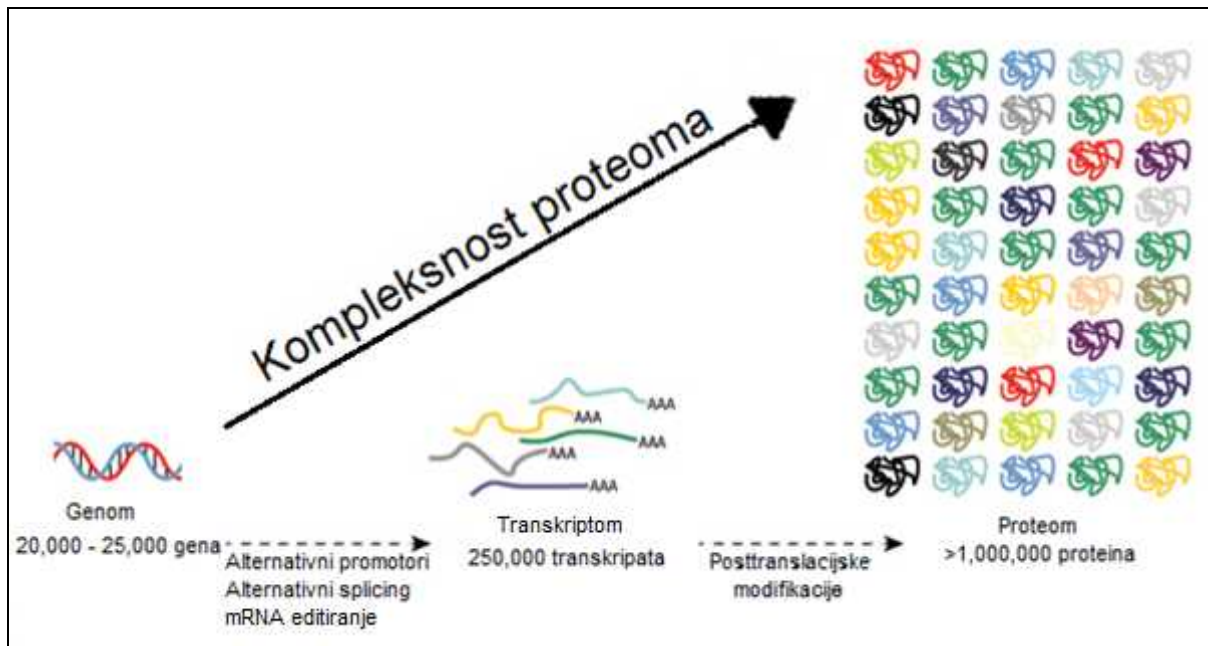
Zagreb, 2012.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>2</b>
<b>2. OPĆENITO O SVOJSTVIMA REAKCIJE ARGINILACIJE .....</b>	<b>4</b>
2.1. Otkriće tRNA ovisne posttranslacijske modifikacije .....	4
2.2. Arginiltransferaza – enzim odgovoran za reakciju arginilacije .....	4
2.3. Ugradnja arginina u protein .....	5
<b>3. FIZIOLOŠKI UTJECAJ ARGINILACIJE IN VIVO .....</b>	<b>7</b>
3.1. Utjecaj arginilacije na razvitak kardiovaskularnog sustava miševa .....	7
3.1.1. Arginilacija utječe na funkciju srčanog alfa aktina .....	7
3.1.2. Utjecaj arginilacije na strukturu i sastavljanje miofibrila .....	9
3.2. Utjecaj ATE1 knock-out-a na razvoj biljke <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	11
<b>4. USPOREDBA ARGINILACIJE I FOSFORILACIJE PROTEINA .....</b>	<b>13</b>
<b>5. ULOGA ARGINILACIJE U RAZGRADNJI PROTEINA .....</b>	<b>14</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>16</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>21</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>21</b>

# 1. UVOD

Procjenjuje se da ljudski genom sadrži oko 20,000 – 25,000 gena, a prema pretpostavci da svaki gen kodira jedan protein, tada bi ljudski proteom inilo do 25,000 proteina. Me utim, znanstvenici pretpostavljaju da cijeli ljudski proteom ini više od 1 milijun proteina (Jensen 2004) što bi zna ilo da jedan gen kodira više razli itih proteina.



**Slika 1.** Utjecaj alternativnog splicinga i posttranslacijskih modifikacija na kompleksnost proteoma (Prilago eno prema <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=7CE3FCF5-0DA0-4378-A513-2E35E5E3B49B>)

Postoje dva zna ajna mehanizma koja pove avaju raznolikost proteina eukariotskih organizama (Slika 1).

Od mnoštvo mehanizama na transkripcijskoj razini, smatra se da pre-mRNA splicing (prekrajanje) najviše doprinosi pove anju raznolikosti proteina u kralješnjaka. Pre-mRNA splicing je proces u kojem se izrezuju nekodiraju e regije gena (introni) kako bi se spojile kodiraju e regije (eksoni) i nastala zrela mRNA koja je spremna za translaciju. Alternativni pre-mRNA splicing selektivno udružuje razli ite eksone kako bi formirao mRNA koja kodira proteine s razli itim funkcijama (Maniatis i Tasic 2002).

Drugi mehanizam, o kojem u detaljnije pisati u ovom seminarskom radu, uklju uje kovalentne posttranslacijske modifikacije proteina. To su kemijske modifikacije koje imaju klju nu ulogu u funkciji proteina jer reguliraju aktivnost proteina, njihovu lokalizaciju i

interakcije s drugim molekulama. Enzimi koji sudjeluju u takvim modifikacijama uključuju 500 ljudskih protein kinaza, 150 fosfataza i 500 proteaza što čini oko 5% genoma viših eukariota (Walsh i sur. 2005).

Posttranslacijske modifikacije mogu se dogoditi u bilo kojem koraku „životnog ciklusa“ proteina. Primjerice, mnogi proteini su modificirani odmah pri završetku translacije radi pravilnog smatanja ili stabilnosti proteina ili kako bi se protein usmjerio na odgovarajuće mjesto u stanici. Kod drugih se pak modifikacije događaju nakon smatanja proteina ili lokalizacije unutar stanice radi utjecaja na biološku aktivnost proteina. Proteini su i kovalentno vezani za biljege koji predodređuju protein za degradaciju.

Modifikacije proteina mogu biti i reverzibilne, ovisno o samoj prirodi modifikacija. Primjerice, fosforilaciju, modifikaciju kojom se dodaje fosforilna skupina na određenu aminokiselinu u proteinu provode kinaze i time najčešće aktiviraju ili inaktiviraju enzime. Za razliku od njih, fosfataze uklanjaju fosforilnu grupu i time mijenjaju biološku aktivnost.

Analiza proteina i njihovih posttranslacijskih modifikacija je izuzetno važna za razumijevanje sranih bolesti, raka, neurodegenerativnih bolesti te dijabetesa. Upravo nam njihova karakterizacija omogućuje pogled u stanišnu funkciju, posebice na etiološke procese (<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=7CE3FCF5-0DA0-4378-A513-2E35E5E3B49B>).

Najpoznatije modifikacije su glikozilacija, fosforilacija, acetilacija, metilacija, ubikvitinacija i druge. U ovom radu nešto detaljnije pisati o arginilaciji proteina i njezinoj biološkoj ulozi u eukariotskim organizmima.

## **2. OP ENITO O SVOJSTVIMA REAKCIJE ARGINILACIJE**

### **2.1. Otkri e tRNA ovisne posttranslacijske modifikacije**

1963. godine je grupa znanstvenika otkrila da je u stanicama (u kojima su prethodno uklonjene komponente za konvencionalnu sintezu proteina kao što su ribosomi, mRNA, GTP...) mogu a ugradnja radioaktivno obilježenih aminokiselina u proteine. Ugradnja aminokiselina je bila neovisna od uobičajene translacije, a ovisna o tRNA molekuli. Do tada se vjerovalo da se aminokiseline ugrađuju u proteine posredstvom tRNA molekula samo u slučaju *de novo* sinteze polipeptidnog lanca na ribosomima. Ovaj fenomen je zabilježen i kod prokariota (Kaji i sur. 1963a, 1965a,b, Momose i Kaji 1966) i u sisavaca (Kaji 1968, Kaji i sur. 1963b). Uskoro su pokazali kako se tu ne radi o alternativnoj translaciji, već o prije nepoznatoj posttranslacijskoj modifikaciji koja je ograničena na samo visoko specifične aminokiseline (Kaji i sur. 1963a,b, 1965a,b). Do sada je zabilježena samo tRNA-ovisna adicija arginina (Arg) kod eukariota i leucina (Leu) i fenilalanina (Phe) u bakterija (Saha i Kashina 2011).

### **2.2. Arginiltransferaza – enzim odgovoran za reakciju arginilacije**

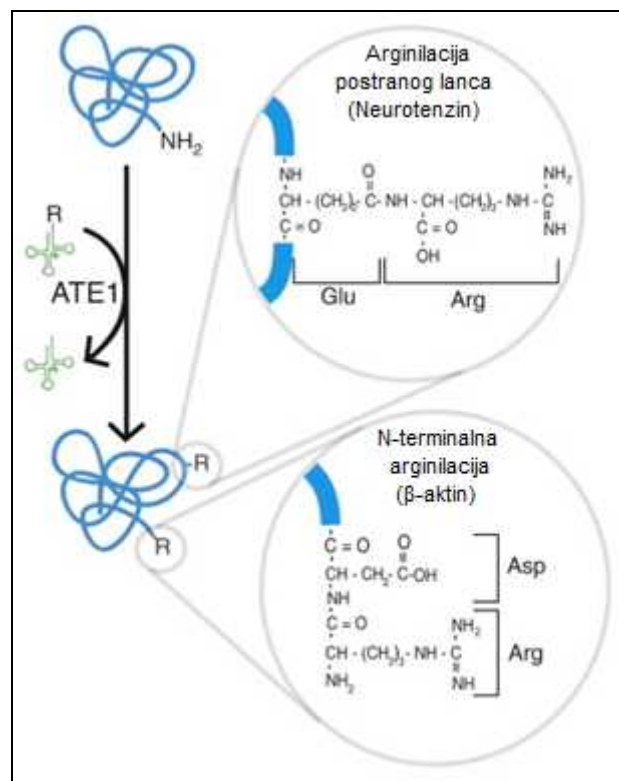
O arginilaciji proteina kao posttranslacijskoj modifikaciji se još uvijek ne zna puno jer nije dovoljno istražena zbog nedostatka dobrih biokemijskih modela. Arginilaciju katalizira enzim arginiltransferaza (ATE1) (Balzi i sur. 1990) koji je prisutan u svim eukariotskim organizmima i do sada nije utvrđena ni jedna druga arginiltransferaza u eukariotskim organizmima. Taj enzim prenosi aminokiselinu arginin (Arg) na protein s tRNA molekule (Kaji i sur. 1963a,b, Soffer 1968, Takao i Samejima 1999). Sličnu modifikaciju u prokariotima obavlja enzim L/F transferaza koji modificira proteine dodatkom aminokiselina leucin (Leu) i fenilalanin (Phe). Prema tome, možemo zaključiti da su tRNA-ovisne posttranslacijske modifikacije visoko ovisne tijekom evolucije (Saha i Kashina 2011). ATE1 je kodiran jednim genom kod nižih eukariota, dok je kod viših eksprimiran u više izoformi zahvaljujući, već spomenutom, alternativnom splicingu. Takve izoforme enzima razlikuju se po aktivnosti, specifičnosti tkiva u kojima djeluju i po smještaju unutar stanice (Hu i sur. 2006, Kwon i sur. 1999, Rai i Kashina 2005).

### 2.3. Ugradnja arginina u protein

Trenutno poznate kemijske veze arginina na proteine ukljuuju stvaranje peptidne veze između amino grupe N-kraja proteina i karboksilne grupe dodanog arginina (Kaji 1968, Soffer i Horinishi 1969) te i karboksilnog kraja postranog lanca glutaminske kiseline (Glu) i amino grupe N-kraja arginina koja je otkrivena kod neurotenzina – biološkog regulacijskog peptida (Eriste i sur. 2005) (Slika 2).

U kvasca primjerice, arginilacija N-kraja se može dogoditi samo ako protein na tom kraju nosi asparaginsku (Asp) ili glutaminsku kiselinu (Glu). Za razliku od toga u sisavaca su i cisteinski (Cys) krajevi mete za arginilaciju, što bi moglo značiti da upravo arginilacija cisteina (Cys) doprinosi esencijalnoj ulozi ATE1 u sisavaca (Rai i Kashina 2005).

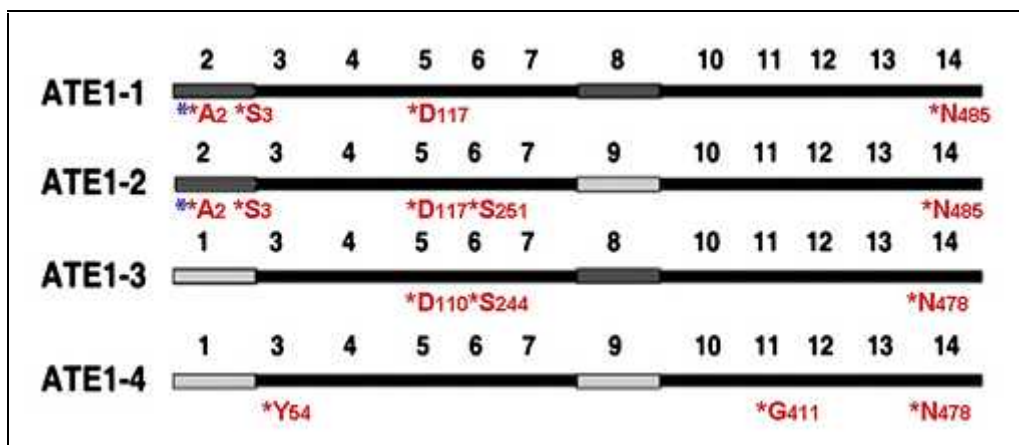
Također je otkriveno da proteini mogu biti modificirani, ne samo na N-kraju, nego i na unutarnjim mjestima u polipeptidnom lancu (Rai i sur. 2008, Wong 2007). Ovi podaci upućuju na to da je možda reakcija arginilacije kompleksnija nego što se to prije mislilo i da se vjerojatno događa pomoću nekoliko mehanizama.



**Slika 2.** Moguće reakcije arginilacije (Prilagođeno na temelju Rai i Kashina 2005)

Iako se u po etku mislilo (Ciechanover i sur. 1988) da je za reakciju arginilacije potrebna arginil sintetaza za aktivnost ATE1 tako što formira kompleks s enzimom i da je reakcija ovisna o hidrolizi ATP-a, znanstvenici su dokazali upravo suprotno. Kako bi provjerili te hipoteze napravili su pokus u dva koraka u kojem su ispitali u inkovitost ugradnje Arg u protein (gove i albumin) u *in vitro* uvjetima u prisutnosti i odsutnosti arginin sintetaze (RRS) i/ili ATP-a. Dobiveni rezultati pokazali su da u svim mogu im slu ajevima ne dolazi do neke bitne razlike u ugradnji Arg u protein. Prema tome, zaklju ili su da reakcija arginilacije ne zahtijeva stvaranje ATE1-RRS kompleksa niti ovisi o prisutnosti ATP-a (Wang i sur. 2011).

Razli itim istraživanjima na ATE1 izooblicima utvr eno je da se mogu podvrgnuti samo-arginilaciji i to bez obzira na prisutnost drugih supstrata i stani nih kofaktora. Za detekciju arginiliranih mjesta enzima pomo u masene spektrometrije korištene su pro iš eni ATE1 izooblici bez dodanih supstrata i [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N] obilježeni izotopi arginina za transfer reakciju. Analiza je pokazala nekoliko arginiliranih mjesta u svakom izoobliku ATE1 enzima, locirana na N-krajevima i na unutarnjim postranim lancima aminokiselina. Neka mjesta su bila identi na u pojedinim izooblicima (A2, S3 D117/D110, S251/S244, N485/N478), dok su druga mjesta bila specifi na za svaki ATE1-1/2/3/4 (Slika 3). Arginilacija razli itih aminokiselina u ATE1 izooblicima može djelomi no biti temelj razli itih aktivnosti pojedinih ATE1 izoenzima, a arginilacija je isto tako i esencijalna za njihovu *in vivo* funkciju (Wang i sur. 2011).



**Slika 3.** Mjesta arginilacije etiri izoformi arginiltransferaze (Wang i sur. 2011)



### 3. FIZIOLOŠKI UTJECAJ ARGINILACIJE IN VIVO

Istraživanja knock-out gena za ATE1 na različitim organizmima pokazala su da kod nižih eukariota, od kvasca (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen) do crva (*Caenorhabditis elegans* Maupas) ATE1 gen nije esencijalan za vijabilnost stanice, dok po evši od vinske mušice (*Drosophila melanogaster* Meigen) neaktivni gen rezultira smrtnoš u embrija. I kod biljaka arginilacija ima značajnu ulogu. Kod biljke arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) knock-out ATE1 gena uzrokuje odgođenu senescenciju listova (Lim i sur. 2007), abnormalni razvoj korijena i listova (Graciet i sur. 2009) i defekte u germinaciji sjemenka (Yoshida i sur. 2002).

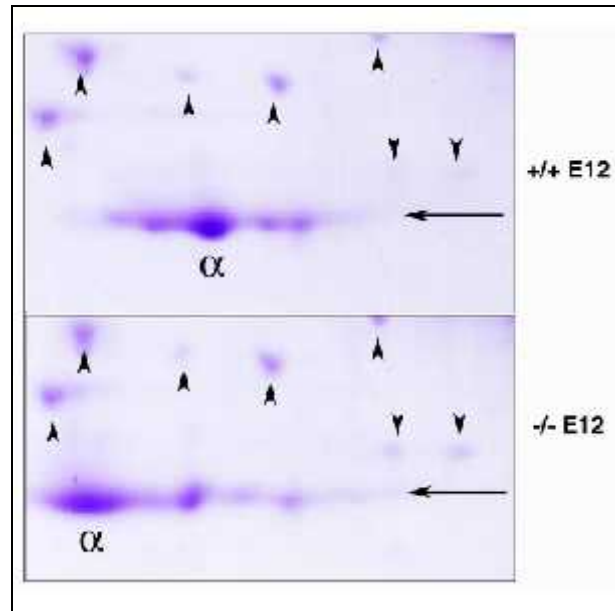
#### 3.1. Utjecaj arginilacije na razvitak kardiovaskularnog sustava miševa

Ispitivanja miševa s inaktiviranim Ate1 genom rezultiraju u smrtnosti embrija i teškim defektima u razvoju kardiovaskularnog sustava i angiogenezi. Miševi s nefunkcionalnom arginiltransferazom umiru tijekom embrionalnog razvitka zbog teških krvarenja, nepravilnosti tijekom embrionalne angiogeneze i teških srčanih defekata koji uključuju nerazvijeni miokard, septalne defekte i nerazdvajanje aorte i plućnih arterija (Kwon i sur. 2002). Molekularni mehanizmi koji su odgovorni za ovakva oštećenja još nisu poznati.

##### 3.1.1. Arginilacija utječe na funkciju srčanog alfa aktina

Veliki broj proteina u embrionalnom tkivu i tkivima odraslih miševa je modificirano procesom arginilacije (Wong i sur. 2007). Međutim, ekspresija arginiltransferaze raste i pada tijekom embriogeneze (Kwon i sur. 1999) i starenja (Lamon i Kaji 1980) te varira između različitih tkiva u embrija i odraslih organizama (Rai i Kashina 2005). Među najvažnijim supstratima za ovu reakciju je srčani alfa aktin (Actc1) koji je ključni srčani protein i glavna komponenta srčanih miofibrila. Frakcioniranjem cijelog srca mišjeg embrija starog 12.5 dana (divljeg tipa i tipa s knock-out genom za ATE1) htjelo se pokazati da li se srčani alfa aktin arginilira tijekom embriogeneze i procijeniti postotak aktina arginiliranog *in vivo*. Uzorci su bili podvrgnuti 2D gel elektroforezi pod blagim pH gradijentom kako bi se odvojile izoforme aktina i identificirale pomoću masene spektrometrije (Rai i sur. 2008).

Postoje tri izoforme aktina –  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , koje su međusobno vrlo slične. Međutim, male varijacije u položaju aminokiselina dovodi do pomaka njihovih izoelektričnih točaka (Otey i sur 1987, Otey i sur. 1986, Rubenstein i Spudich 1977, Vandekerckhove i Weber 1978) koje se mogu vidjeti zbog frakcioniranja pod blagim pH uvjetima. Iako je alfa aktin najdominantniji u odraslom srcu, tijekom embriogeneze se eksprimira u više izoformi (Hayward i Schwartz 1986, Otey i sur 1988, Sassoon i sur. 1988) od kojih se svaka pojavljuje na određenom mjestu na gelu ovisno o pH vrijednosti. Alfa aktin je najkiseliji pa se na gelu pojavljuje na lijevom kraju gela gdje je pH i najniži. Usporedba položaja alfa aktina na gelu u oba tipa pokazala je da se u miša s knock-out ATE1 genoma alfa aktin pomaknuo prema kiselijoj strani (lijevo) što odgovara gubitku pozitivnih naboja (Slika 4). Kako je arginin pozitivno nabijena aminokiselina otkriva se da se njenu ugradnju u protein povećati ukupan pozitivan naboj što će onda rezultirati pomakom prema bazičnoj (desnoj) strani gela. Takav rezultat je potvrđen i analizom u divljeg tipa. Procjena pomoću gel denzitometrije pokazuje da je oko 40% svih izooblika aktina i 50% alfa aktina u embrijima *in vivo* arginilirano što znači da taj protein tijekom embriogeneze postoji u visoko arginiliranom stanju (Rai i sur. 2008).

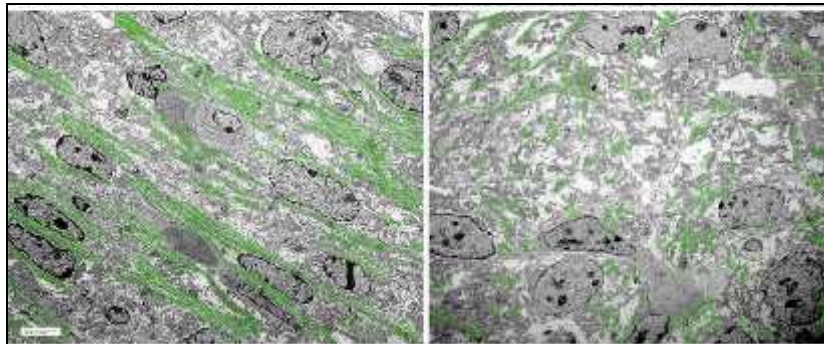


**Slika 4.** Prikaz 2D gel elektroforeze alfa aktina pod blagim pH uvjetima u mišjeg embrija divljeg tipa i knock-out-a za ATE1 (Rai i sur. 2008)

### 3.1.2. Utjecaj arginilacije na strukturu i sastavljanje miofibrila

Pomoću elektronske mikroskopije proučavana su srca miševa divljeg tipa ( $ATE1^{+/+}$ ) i knock-out miševa ( $ATE1^{-/-}$ ) kako bi se ispitalo da li arginilacija utječe na sastavljanje i/ili strukturu miofibrila. Za ispitivanje su uzeta srca embrija starih 12.5 dana i 14.5 dana. Ovi stadiji su uzeti jer knock-out embriji stari 12.5 dana fenotipski izgledaju normalno, ali se očekuje da će u tom stadiju doći do početne defekcije u razvoju miofibrila, dok su embriji stari 14.5 dana već vidljivo fenotipski abnormalni, a neki od njih počinju i ugibati pa se očekuje da će nedostaci u strukturi miofibrila u ovom stadiju biti vrlo istaknuti.

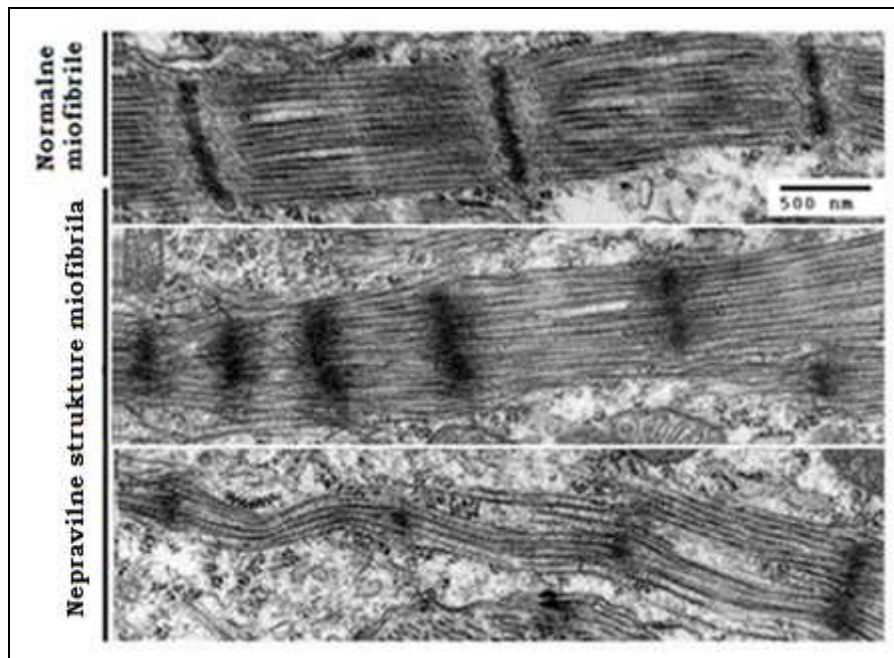
Pregledom strukture srca pri slabijem povećanju ( $\times 250$ ) potvrđeno je da u  $ATE1^{-/-}$  miševa stanice srca imaju tanke membrane zbog reduciranosti u veličini kompaktne zone miokarda što je vidljivo i u prijašnjim istraživanjima (Kwon i sur. 2002). Promatranjem pod većim povećanjem ( $\times 2500$ ) otkrivene su značajne strukturne promjene u embriju s  $ATE1^{-/-}$  u usporedbi s divljim tipom. Dok su u divljeg tipa miofibrile bile visoko razvijene i normalno se razvijale tijekom embrionalnog razvitka, u miševa s  $ATE1^{-/-}$  razvitak miofibrila se ino usporenim rezultiraju i u oskudnim i neorganiziranim miofibrilama (Slika 5). Iako su takve promjene po istaknutosti i jačini varirale između pojedinih embrija, sva analizirana srca su pokazivala slične trendove.



**Slika 5.** Prikaz snimke elektronskog mikroskopa srčanog tkiva ( $2500\times$ ). Zeleno su naglašene miofibrile kod divljeg tipa (lijevo) i knock-out-a (desno). U divljeg tipa miofibrile su istaknute i orijentirane su uz os srčanog mišića, dok su kod knock-out-a izobilne i teško ih je kontinuirano pratiti kroz srce (Prilagođeno na temelju Rai i sur. 2008)

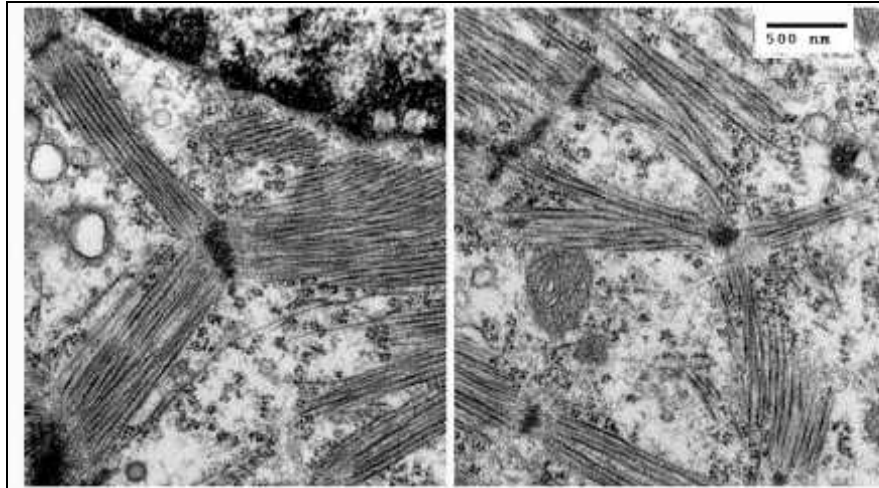
Dalje su kvantitativno analizirane duljine sarkomera, debljine Z-pruga, kutevi miofibrila i njihovih sastavnih filamenata na interkaliranim diskovima i udaljenost stanica na interkaliranim diskovima.

Zabilježeno je nekoliko istaknutih defekata u miofibrila. Kod knock-out embrija starih 12.5 dana ve ina sarkomera i Z-pruga inilo se normalnim. Za razliku od toga u starijih embrija došlo je do kolapsa sarkomera s progresivnim skra ivanjem u duljini i širenjem Z-pruga na taj na in da se inilo kao da su se odvojile od miofibrila. Neke miofibrile su postale labave i nejednake s gubitkom Z-pruga (Slika 6).



**Slika 6.** Normalne miofibrile kod divljeg tipa (gornja slika)  
Kolaps sarkomera u knock-out embrija (donje dvije slike) (Prilago eno na temelju Rai i sur. 2008)

Primije ene su i druge abnormalnosti kao što su asimetri ne sarkomere s razli itom gusto om filamenata na dva kraja iste sarkomere, grananje miofibrila na Z-prugama (Slika 7) i druge. Što se ti e interkaliranih diskova koji služe kao mjesta spajanja miofibrila izme u dvije miocite, i tamo su primje ene promjene poput razli itih kutova prilaska miofibrila interkaliranim diskovima ili u težim slu ajevima, prekida samih diskova. Sve te promjene sugeriraju defekte u kontraktilnosti i isklju enja izme u miocita u miokardu. Stoga se može zaklju iti da u ATE1 knock-out miševima dolazi do usporenog razvoja miofibrila i njihove diskontinuiranosti kroz cijelo srce te promjena u strukturi sarkomera.



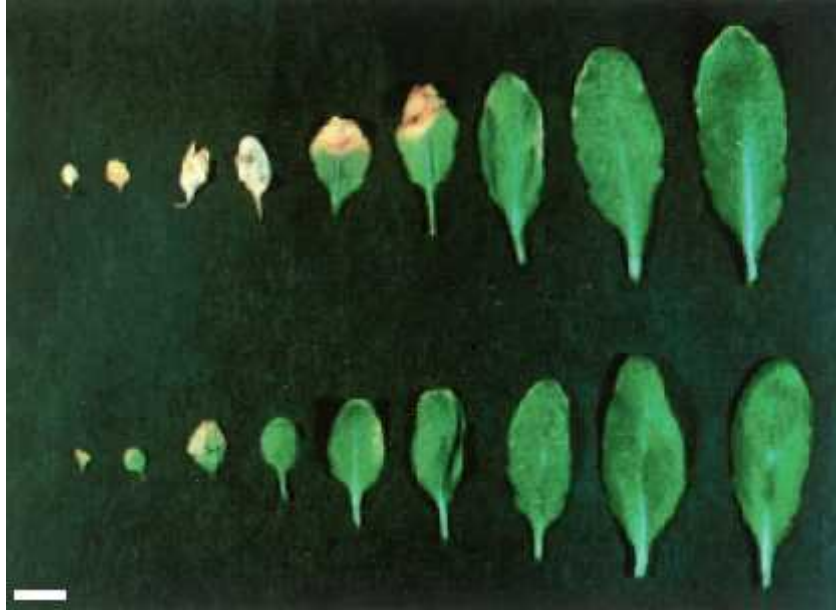
**Slika 7.** Grananje miofibrila na Z-prugama (Rai i sur. 2008)

### 3.2. Utjecaj ATE1 knock-out-a na razvoj biljke *Arabidopsis thaliana*

Kao što sam već prije spomenuo, inaktivacijom gena koji kodira za funkcionalnu arginiltransferazu nastaje mutanta biljke *Arabidopsis thaliana* kod koje je senescencija listova znatno usporena za razliku od one u divljeg tipa.

U istraživanju koje su proveli Yoshida i sur. izolirana je mutanata s usporenom senescencijom listova, označena kao *dls1* iz *Arabidopsis* T-DNA linija. Ova mutacija je uzrokovana defektom u genu za AtATE1 koji kodira arginiltransferazu. Genetske analize su otkrile da je *dls1* monogenska recesivna mutanta uzrokovana insercijom T-DNA u jedan lokus. Kako bi se provjerilo da se zaista radi o monogenskoj recesivnoj mutaciji, znanstvenici su izveli povratno križanje *dls1* mutante s divljim tipom. Od dobivenih 119 sadnica u F2 generaciji, njih 88 je pokazivalo normalan, a njih 31 mutantni fenotip, što odgovara omjeru 3:1 koji upućuje na monogensku recesivnu mutaciju.

Usporena senescencija listova javila se kod *dls1* mutanta i kad je senescencija bila uzrokovana starošću i kad je bila inducirana mrakom (Slika 8). Postotak klorofila i topljivih proteina, kao i uinkovitost fotosustava II, za koje se zna da se smanjuju prilikom senescencije ovisne o starosti, bili su mjereni u petoj rozeti listova u divljeg tipa i mutanta. Vrijednosti svih izmjenjenih parametara su bile manje i brže su se smanjivale kod divljeg tipa što znači da je kod *dls1* mutanti proces senescencije znatno sporiji.



**Slika 8.** Usporedba fenotipa rozete listova kod divljeg tipa (gore) i dls1 mutanta (dolje) (Yoshida i sur. 2002)

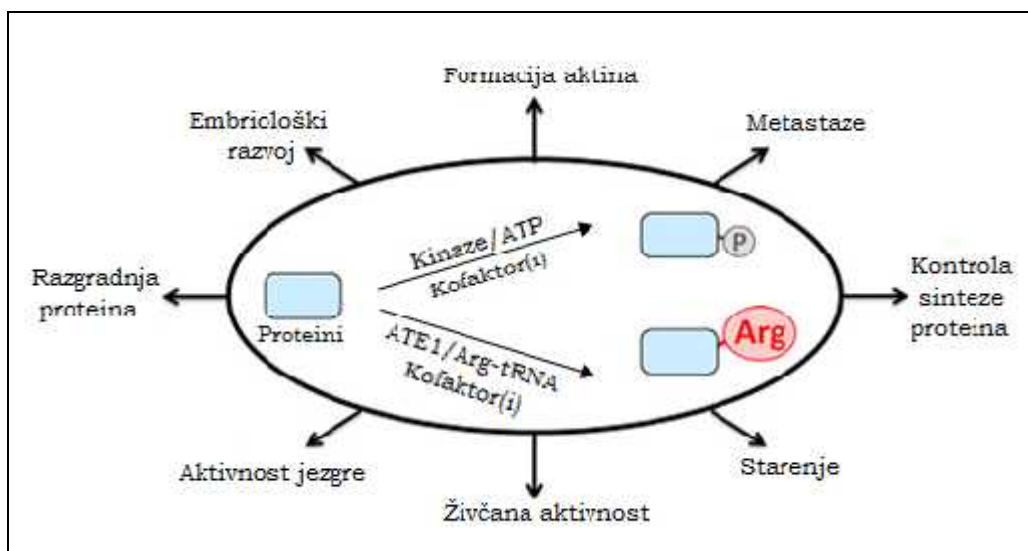
Transformiranjem dls1 mutante s AtATE1 genom divljeg tipa, znanstvenici su željeli potvrditi da defekt u ekspresiji AtATE1 dovodi do stvaranja dls1 mutanta. To su napravili tako da su PCR tehnikom umnožili fragment DNA koji sadrži cijelu AtATE1 sekvencu iz genoma divljeg tipa, prebacili u binarni vektor pPZP221 (Hajdukiewicz i sur. 1994) te transformirali u dls1 mutantu pomoću bakterije *Agrobacterium*. Rezultati su pokazali da je u transformiranih mutantima došlo do žućnjenja kotiledona i snižavanja koncentracije klorofila (na otprilike istu razinu kao i u divljem tipu), dok su kotiledoni dls1 mutante ostali zeleni. Ovi rezultati pokazuju da je AtATE1 gen divljeg tipa nadomjestio dls1 fenotip.

Prema ovim istraživanjima otkriveno je da arginiltransferaza ima važnu ulogu u progresiji senescencije listova u vrste *Arabidopsis thaliana* (Yoshida i sur. 2002).

## 4. USPOREDBA ARGINILACIJE I FOSFORILACIJE PROTEINA

Istraživanja arginilacije proteina ukazuju na mogućnost da je ova posttranslacijska modifikacija jednako važna kao i fosforilacija, jedna od najbitnijih i dosad najbolje istraženih proteinskih modifikacija. Postoji mnogo sličnosti i paralela koje se mogu povući između ove dvije različite modifikacije, a neke od njih spomenute u nadalje u tekstu.

Kao što znamo da postoji veliki broj proteina koji mogu biti fosforilirani bilo radi aktivacije ili inaktivacije, tako je dosad kroz različita istraživanja, otkriveno da arginiltransferaza modificira više od stotinu proteina. Arginilacija je iznimno važna reakcija za život, poput fosforilacije, jer bez arginilacije embrio ne može preživjeti (Kwon i sur. 2002). Jedno istraživanje pokazalo je da je translacijska mašinerija možda meta za arginilaciju, a već je otprilike poznato da fosforilacija translacijskih faktora utječe na njihovu aktivnost te tako regulira sam proces biosinteze proteina. Frakcioniranjem stanih ekstrakata u širokopojasnom saharoznom gradijentu (0-70%) dobivaju se dva pika sedimentacije izooblika arginiltransferaze te je moguće razdvojiti dvije frakcije. Analizom frakcija s različitim intracelularnim markerima pokazano je da jedan izoenzim kolokalizira s elongacijskim faktorom eEF1B2 koji je dio translacijske mašinerije. To je pokazatelj da i arginilacija igra ulogu u procesu translacije. (Wang i sur. 2011) Daljnje sličnosti ovih modifikacija uključuju sudjelovanje u procesu starenja te razvoju tumora, sličnost izoformi arginiltransferaze s fiziološki važnim izoformama protein kinaza, postojanje različitih mjesta za ugradnju arginina, odnosno, fosfatne grupe i druge (Kaji i Kaji 2011).



**Slika 4.** Višestruke regulacije arginilacije i/ili fosforilacije proteina (Prilagođeno na temelju Kaji i Kaji 2010)

## 5. ULOGA ARGINILACIJE U RAZGRADNJI PROTEINA

Razgradnja proteina bitna je za stani ni ciklus jer njome stanica regulira koncentraciju neželjenih te pogrešno smotanih proteina. Procesom razgradnje proteina obnavljaju se aminokiseline koje e poslije poslužiti u izgradnji (*de novo* sintezi) novih proteina. Vrijeme polu-života proteina može varirati od 30 sekundi pa sve do nekoliko dana (Nelson, Cox 2008).

U eukariota, u razgradnju proteina, uklju en je mali regulatorni protein – ubikvitin kojeg ine 76 aminokiselina. Veoma je konzerviran u eukariotskih vrsta i u suštini je identi an i me u najrazli itijim organizmima poput kvasca i ljudi koji dijele ak 96% sekvence (<http://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin>). Ubikvitin se kovalentno veže za protein koji e se razgraditi ATP-ovisnim putem, a proces ubikvitinilacije uklju uje tri enzima; E1 (ubikvitin-aktiviraju i enzim), E2 (ubikvitin-konjugiraju i enzim) i E3 (ubikvitin ligaza). Ubikvitinilirani protein prepoznaje proteinski kompleks, 26S proteasom, koji potom razgra uje ubikvitinilirani protein procesom proteolize pri emu se kidaju peptidne veze izme u aminokiselina (Sjögren i Neubig 2010).

Iako se još ne zna koji su sve signali odgovorni za okidanje ubikvitinilacije, otkriven je jedan jednostavan signal. Za mnoge proteine, upravo aminokiselina koja slijedi iza prve, inicijacijske aminokiseline tj. metionina je zna ajan faktor koji utje e na polu-život proteina. Veliku ulogu u tome ima i bilo kakva posttranslacijska modifikacija N-kraja proteina (Nelson, Cox 2008).

Pravilo N-kraja u degradaciji proteina prvi je predložio Alexander Varshavsky. To je skupina molekularnih komponenata koje bilježe proteine, koji nose N-degron, za proteosomalnu razgradnju. N-degroni nastaju proteoliti kim cijepanjem inicijalnog metionina otkrivaju i tako drugu aminokiselinu N-kraja. Ovisno o prirodi ove aminokiseline, novonastali N-kraj može biti stabiliziraju i ili destabiliziraju i (Varshavsky 1996, Meinnel i sur. 2006, Tasaki i Kwon 2007). N-degroni su, po definiciji, destabiliziraju i i mogu se podijeliti u primarno, sekundarno i tercijarno destabiliziraju e krajeve. Njih prepoznaju komponente puta pravila N-kraja, ubikvitiniliraju ih te usmjeravaju u proteasom.

Primarni N-degroni su direktne mete za razgradnju, a prepoznaje ih enzim ubikvitin ligaza (E3). Prema specifi nosti za razli ite razrede E3 ligaza, primarni N-degroni u stanica sisavaca podjeljeni su u dva tipa, u prvi tip spadaju arginin, lizin i histidin, a u drugi leucin, fenilalanin, trpifan, tirozin i izoleucin. Ubikvitinilacijm pomo u serije enzima (E1, E2, i E3)



proteini su određeni za razgradnju. Sekundarni krajevi (asparaginska i glutaminska kiselina) se prvo uz pomoć ATE1 enzima moraju arginilirati kako bi nastali primarni N-degroni. Cistein, koji također pripada sekundarno destabilizirajućim krajevima, se prije arginilacije treba oksidirati (Sjögren i Neubig 2010). To je i dokazano u eksperimentu u kojem su tri ista oktapeptida, s različitim prvom aminokiselinom, inkubirana s mišjom arginiltransferazom u prisutnosti ATP-a, tRNA molekula i Arg-tRNA sintetaze iz *S. cerevisiae*. Peptidi s asparaginskom kiselinom i oksidiranim cisteinom (CysO<sub>3</sub>H) su efikasno arginilirani, dok peptid s cisteinskim ostatkom nije arginiliran što je dovelo do zaključka da je oksidacija N-terminalnog cisteina esencijalna za arginilaciju. Za oksidaciju cisteina potrebni su kisik i dušikov monoksid (NO) koji nastaje iz arginina kao direktnog prekursora uz pomoć NO sintaze (Hu et al. 2005). Dva tercijarno destabilizirajuća kraja, asparagin i glutamin, prvo se deaminiraju N-terminalnim amidazama u sekundarno destabilizirajuće krajeve, asparaginsku i glutaminsku kiselinu, koji se onda mogu arginilirati ATE1 enzimom.

Važnost mašinerije koja sudjeluje u pravilu N-kraja demonstrirana je upravo činjenicom da ATE1 knockout miševi ne preživljavaju embrionalni stadij (Kwon et al. 2002). Štoviše, nekoliko tipova raka, uključujući i rak dojke, povezani su s mutacijama ili promijenjenom razinom ekspresije E3 ligaza ili drugih komponenti ubikvitin/proteasomskog puta (Chen i sur. 2006, Hoeller i sur. 2006).

## 6. ZAKLJUČAK

Iako se o arginilaciji kao postranslacijskoj modifikaciji proteina ne zna dovoljno te mnogi mehanizmi njezinog *in vivo* u inka nisu u potpunosti razjašnjeni, o ito je iz dosadašnjih istraživanja da je arginilacija esencijalna za normalan razvitak brojnih organizama.

Poznato je da reakciju provodi enzim arginiltransferaza koja katalizira prijenos arginina s molekule tRNA na protein te da za tu reakciju nije potrebna energija u obliku ATP-a niti arginil sintetaza koja bi stvorila aktivni kompleks s enzimom. Arginin se obično ugrađuje na N-kraj proteina, i to na amino grupu glutaminske i asparaginske kiseline te kod sisavaca i na cistein, međutim nedavna istraživanja pokazuju da se arginin može ugraditi na postrane lance i drugih aminokiselina.

Provedena istraživanja utjecaja aktivnosti arginiltransferaze pokazala su da arginilacija ima velik utjecaj inak kako u životinjskim tako i u biljnim organizmima. Pokusi na miševima pokazali su da inaktivacija arginiltransferaze uzrokuje letalnost u embrionalnom stadiju do koje dolazi zbog brojnih defekata pri razvoju kardiovaskularnog sustava i angiogeneze dok kod biljaka dovodi do odgođene senescencije listova.

Osim za normalno funkcioniranje proteina, arginilacija ima utjecaj i na njihovu razgradnju. Dodatak arginina je signal za kovalentno vezanje ubikvitina na ciljni protein kojeg prepoznaje proteasomski kompleks koji ga zatim i razgrađuje.

Potrebna su još daljnja istraživanja ove posttranslacijske modifikacije kako bi u potpunosti mogli razumjeti njenu ulogu u različitim fiziološkim procesima, ali već sada sa sigurnošću možemo povući paralele između arginilacije i dobro poznate regulatorne modifikacije kao što je fosforilacija.

## 7. LITERATURA

- Balzi, E., Choder M., Chen, W. N., Varshavsky, A., Goffeau, A. (1990) Cloning and functional analysis of the arginyl-tRNA-protein transferase gene ATE1 of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **265**, 7464-7471.
- Chen, C., Seth, A. K., Aplin, A. E. (2006) Genetic and expression aberrations of E3 ubiquitin ligases in human breast cancer. Mol. Cancer Res. **4**, 695-707.
- Ciechanover, A., Ferber, S., Ganoth, D., Elias, S., Hershko, A., Arfin, S. (1988) Purification and characterization of arginyl-tRNA-protein transferase from rabbit reticulocytes: its involvement in post-translational modification and degradation of acidic NH<sub>2</sub> termini substrates of the ubiquitin pathway. J. Biol. Chem. **263**, 11155–11167.
- Eriste, E., Norberg, A., Nepomuceno, D., Kuei, C., Kamme, F., Tran, D. T., Strupat, K., Jornvall, H., Liu, C., Lovenberg, T. W., Sillard, R. (2005) A novel form of neurotensin post-translationally modified by arginylation. J. Biol. Chem. **280**, 35089-35097.
- Graciet, E., Walter, F., Maoileidigh, D. C., Pollman, S., Meyerowitz, E. M., Varshavsky, A., Wellmer, F. (2009) The N-end rule pathway controls multiple functions during *Arabidopsis* shoot and leaf development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 13618-13623.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P. (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. Plant Mol. Biol. **25**, 989–994.
- Hayward, L., Schwartz, R. (1986) Sequential expression of chicken actin genes during myogenesis. J. Cell Biol. **102**, 1485-1493.
- Hu, R. G., Brower, C. S., Wang, H., Davydov, I. V., Sheng, J., Zhou, J., Kwon, Y. T., Varshavsky, A. (2006) Arginyltransferase, its specificity, putative substrates, bidirectional promoter and splicing-derived isoforms. J. Biol. Chem. **281**, 32559-32573.
- Hu, R. G., Sheng, J., Qi, X., Xu, Z., Takahashi, T. T., Varshavsky, A. (2005) The N-end rule pathway as a nitric oxide sensor controlling the levels of multiple regulators. Nature **437**, 981-986.
- Hoeller, D., Hecker, C. M., Dikic, I. (2006) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. Nat. Rev. Cancer **6**, 776-788.
- Jensen, O. N. (2004) Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. Curr Opin Chem Biol. **8**, 33-41.
- Kaji, H., Kaji, A. (2011) Protein modification by arginylation. Department of Biochemistry and Molecular Biology Faculty Papers. Paper 24.
- Kaji, A., Kaji, H., Novelli, G. D. (1965a) Soluble amino acid-incorporating system. I. Preparation of the system and nature of the reaction. J. Biol. Chem. **240**, 1185-1191.

- Kaji, A., Kaji, H., Novelli, G. D. (1965b) Soluble amino acid-incorporating system. II. Soluble nature of the system and the characterization of the radioactive product. *J. Biol. Chem.* **240**, 1192-1197.
- Kaji, H. (1968) Further studies on the soluble amino acid incorporating system from rat liver. *Biochemistry.* **7** (11), 3844-3850
- Kaji, A., Kaji, H., Novelli, G. D. (1963a) A soluble amino acid-incorporating system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **10**, 406-409.
- Kaji, H., Novelli, G. D. Kaji, A. (1963b) A soluble amino acid-incorporating system from rat liver. *Biochem. Biophys. Acta.* **76**, 474-477.
- Kwon, Y. T., Kashina, A. S., Davydov, I. V., Hu, R. G., An, J. Y., Seo, J. W., Du, F., Varshavsky, A. (2002) An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. *Science* **297**, 96-99.
- Kwon, Y. T., Kashina, A. S., Varshavsky, A. (1999) Alternative splicing results in differential expression, activity and localization of the two forms of arginyl-tRNA-protein transferase, a component of the N-end rule pathway. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 182-193.
- Lamon, K.D., Kaji, H. (1980) Arginyl-tRNA transferase activity as a marker of cellular aging in peripheral rat tissues. *Exp. Gerontol.* **15**, 53-64.
- Lim, P. O., Kim, H. J., Nam, H. G. (2007) Leaf senescence. *Ann. Rev. Plant Biol.* **58**, 115-136.
- Maniatis, T., Tasic, B. (2002) Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* **418**, 236-243.
- Meinzel, T., Serero, A., Giglione, C. (2006) Impact of the N-terminal amino acid on targeted protein degradation. *Biol. Chem.* **387**, 839-851.
- Momose, K., Kaji, A. (1966) Soluble amino acid-incorporating system. III. Further studies on the product and its relation to the ribosomal system for incorporation. *J. Biol. Chem.* **241**, 3294-3307.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2008) *Lehninger, principles of biochemistry*, 5. izd., W. H. Freeman and company, New York, str. 1107-1109.
- Otey, C. A., Kalnoski, M. H., Bulinski, J. C. (1988) Immunolocalization of muscle and nonmuscle isoforms of actin in myogenic cells and adult skeletal muscle. *Cell Motil. Cytoskeleton* **9**, 337-348.
- Otey, C. A., Kalnoski, M. H., Bulinski, J. C. (1987) Identification and quantification of actin isoforms in vertebrate cells and tissues. *J. Cell. Biochem.* **34**, 113-124.
- Otey, C. A., Kalnoski, M. H., Lessard, J. L., Bulinski, J. C. (1986) Immunolocalization of the gamma isoform of nonmuscle actin in cultured cells. *J. Cell Biol.* **102**, 1726-1737.

- Rai, R., Wong, C.C., Xu, T., Leu, N.A., Dong, D.W., Guo, C., McLaughlin, K.J., Yates III, J.R., Kashina, A. (2008) Arginyltransferase regulates alpha cardiac actin function, myofibril formation and contractility during heart development. *Development* **135**, 3881-3889.
- Rai, R., Kashina, A. (2005) Identification of mammalian arginyltransferases that modify specific subset of protein substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 10123-10128.
- Rubenstein, P. A., Spudich, J. A. (1977) Actin microheterogeneity in chick embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 120-123.
- Saha, S., Kashina, A. (2011) Posttranslational arginylation as a global biological regulator. *Developmental Biology*. **358**, 1-8.
- Sassoon, D., Garner, I., Buckingham, M. (1988) Transcripts of alpha-cardiac and alpha-skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. *Development* **104**, 155-164.
- Sjögren, B., Neubig, R. R. (2010) Thinking outside of the “RGS Box”: new approaches to therapeutic targeting of regulators of G protein signaling. *Mol. Pharmacol.* **78**, 550–557.
- Soffer, R. L., Horinishi, H. (1969) Enzymic modification of proteins. I. General characteristics of the arginine-transfer reaction in rabbit liver cytoplasm. *J. Mol. Biol.* **43**, 163-175.
- Soffer, R. L. (1968) The arginine transfer reaction. *Biochem. Biophys. Acta* **155**, 228-240.
- Takao, K., Samejima, K. (1999) Arginyl-tRNA-protein transferase activities in crude supernatants of rat tissues. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 1007-1009.
- Tasaki, T., Kwon, Y. T. (2007) The mammalian N-end rule pathway: new insights into its components and physiological roles. *Trends. Biochem. Sci.* **32**, 520-528.
- Vandekerckhove, J., Weber, K. (1978) At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* **126**, 783-802.
- Varshavsky, A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12142-12149.
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G. J. Jr. (2005) Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 7342-7372
- Wang, J., Han, X., Saha, S., Xu, T., Rai, R., Zhang, F., Wolf, Y. I., Wolfson, A., Yates III, J.R., Kashina, A. (2011) Arginyltransferase is an ATP-independent self-regulating enzyme that forms distinct functional complexes in vivo. *Chem. Biol.* **18**, 121-130.
- Wong, C.C.L., Xu, T., Rai, R., Bailey, A.O., Yates, J.R., Wolf, Y.I., Zebroski, H., Kashina, A. (2007) Global analysis of posttranslational protein arginylation. *PLoS Biol.* **5**, e258.

Yoshida, S., Ito, M., Gallis, J., Nishida, I., Watanabe, A. (2002) A delayed leaf senescence mutant is defective in arginyl-tRNA: protein arginyltransferase, a component of the N-end rule pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**, 129–137.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin>

<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=7CE3FCF5-0DA0-4378-A513-2E35E5E3B49B>

## 8. SAŽETAK

Arginilacija je tRNA ovisna posttranslacijska modifikacija u kojoj se arginin prenosi s molekule tRNA, najčešće na amino skupinu proteina određenih aminokiselina. Reakciju, koja ne zahtijeva hidrolizu ATP-a, katalizira enzim arginiltransferaza (ATE1). ATE1 je enzim koji je visoko konzerviran u eukariotskim organizmima i ne postoji niti jedna druga arginiltransferaza. Alternativnim splicingom ATE1 nastaje više izooblika enzima kod viših eukariota.

U ovom radu je ukratko prikazano zašto je aktivnost tog enzima bitna za vijabilnost stanica u velikom većini eukariotskih vrsta te na koje sve fiziološke procese utječe arginilacija i kako se to odražava na život pojedinih organizama.

Mnogo toga je još nepoznato u vezi ove posttranslacijske modifikacije, ali možemo zaključiti da je važan biološki regulator.

## 9. SUMMARY

Arginylation is a tRNA-dependent posttranslational modification in which arginine is transferred from tRNA molecule mostly onto an amino group of a specific amino acid of various proteins. Reaction, that does not require hydrolysis of ATP, is catalyzed by enzyme arginyltransferase (ATE1). ATE1 is an enzyme that is highly conserved in eukaryotes and no other arginyltransferase exists, but in higher eukaryotes, there are multiple isoforms of ATE1 that are formed by alternative splicing.

This paper briefly shows why is the activity of this enzyme essential for cells viability in vast majority of eukaryotic organisms, on which physiological processes arginylation has an impact and how it affects physiological processes of individual organisms.

A lot is still unknown about this posttranslational modification, but we can conclude that it has an important role as a biological regulator.