

# Ribosom kao platforma za smatanje i upućivanje proteina

---

Vitković, Zrinka

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

*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:217:961775>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



**ZRINKA VITKOVIĆ**

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Sveučilište u Zagrebu

**RIBOSOM KAO PLATFORMA ZA SMATANJE I UPUĆIVANJE  
PROTEINA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2016.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:	26. kolovoza 2016.
Datum predaje korigirane verzije Završnog rada:	7. rujna 2016.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:	16. rujna 2016.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:

## Sadržaj

§ Sažetak .....	iv
§ 1. Uvod.....	1
1.1. Translacija – sinteza proteina .....	1
§ 2. Modificiranje, smatanje i upućivanje proteina na ribosomu.....	3
2.1. Struktura ribosoma .....	3
2.2. Enzimske kotranslacijske modifikacije .....	5
2.3. Kotranslacijsko smatanje proteina.....	9
2.4. Usmjeravanje proteina.....	15
2.5. Zaključak .....	24
§ 3. Literaturna vrela .....	25

## § Sažetak

Ribosom je supramolekulski ribonukleoproteinski kompleks na kojemu se odvija biosinteza proteina. Za vrijeme njihove biosinteze, proteini se i modificiraju (može doći do, primjerice, acetilacije N-kraja), ali započinje i njihovo smatanje. Budući da proteini imaju različite uloge unutar i izvan stanice, oni se moraju usmjeriti prema svom konačnom odredištu.

Ribosom igra veliku ulogu u "životu" novosintetiziranog polipeptida – smatra se da ribosom potiče stvaranje sekundarne strukture, te da orkestrira vezanje raznih enzima koji ko-translacijski modificiraju polipeptid u nastajanju. Osim što može potaknuti stvaranje sekundarne strukture dok se polipeptid nalazi u izlaznom tunelu, ribosom može i privremeno vezati šaperone koji pomažu u daljnjem smatanju proteina za vrijeme njihove sinteze. Iako se proteini, teoretski, mogu i sami početi smatati za vrijeme sinteze, u stanici im najčešće ipak pomažu različiti šaperonski sustavi.

U usmjeravanju proteina veoma je bitan SRP (eng. *signal recognition particle*), koji se veže za ribosom, privremeno zaustavlja translaciju i usmjerava ribosom i polipeptid prema staničnoj membrani (kod prokariota), odnosno endoplazmatskom retikulumu (kod eukariota).

Iz navedenog se može vidjeti da ribosom uistinu jest svojevrsna platforma, na koju se vežu mnogi faktori i enzimi koji zatim na razne načine utječu na konačnu strukturu i funkciju proteina. U ovom radu se razmatra uloga ribosoma u modificiranju, smatanju i usmjeravanju proteina te, često veoma složen, međusobni odnos tih procesa, u svrhu njihovog boljeg razumijevanja.

## § 1. Uvod

### 1.1. Translacija – sinteza proteina

Translacija, ili sinteza proteina, je od velike važnosti za svaki organizam. Ona se događa u pet faza: aktivacija aminokiselina, inicijacija, elongacija, terminacija i otpuštanje polipeptida te smatanje i posttranslacijsko modificiranje.

Za sintezu bioloških molekula potrebni su aktivirani prekursori i proteini nisu iznimka – zato je prvi korak biosinteze proteina upravo aktivacija njihovih monomera, aminokiselina. Aktivacija aminokiselina potrebna je jer karboksilne skupine aminokiselina moraju biti aktivirane da bi došlo do stvaranja peptidne veze i mora postojati veza između svake aminokiseline i dijela mRNA koji kodira za tu aminokiselinu. Zbog ovoga se veže tRNA na aminokiselinu i to je izuzetno važan dio biosinteze proteina jer se nakon stvaranja aminoacil-tRNA identitet aminokiseline više ne provjerava i ugrađuje se na mjesto određeno identitetom tRNA. Ova reakcija događa se u citosolu i za kovalentno vezanje aminokiseline na određenu tRNA troši se ATP, a tu reakciju kataliziraju aminoacil-tRNA-sintetaze. tRNA imaju između 73 i 93 nukleotidna ostatka, aminokiselinsku ruku s terminalnim slijedom CCA na 3'-kraju gdje se esterificira aminokiselina, antikodonsku ruku, T $\psi$ C ruku i D ruku, dok neke imaju i varijabilnu ruku. Antikodon je zadužen za specifično prepoznavanje kodona na mRNA.

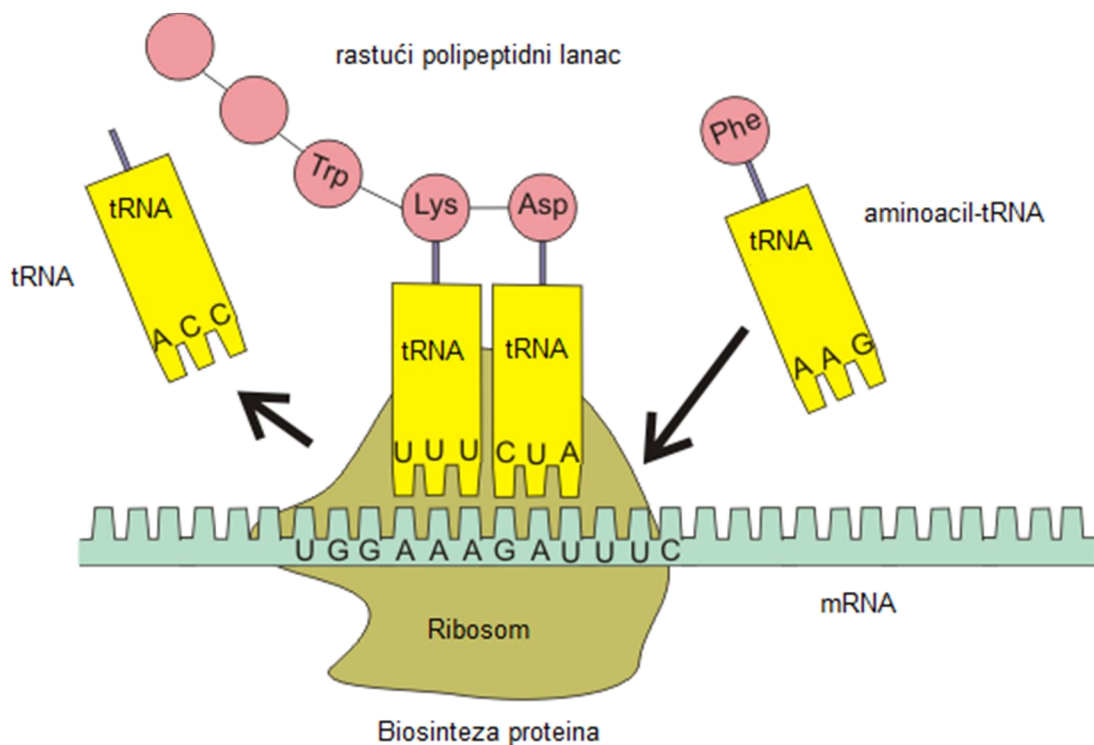
Inicijacija translacije uključuje vezanje mRNA na manju podjedinicu ribosoma i inicijacijsku metionil-tRNA, a zatim se veže velika podjedinica ribosoma pri čemu nastaje inicijacijski kompleks. Inicijacijska tRNA veže se na kodon AUG na mRNA, što znači da je prva aminokiselina u polipeptidu metionin (kod eukariota). Kod prokariota radi se o N-formil-metioninu (fMet) i ta formilna skupina uklanja se ko-translacijski pomoću peptid-deformilaza, o čemu će biti više riječi kasnije u radu. Za proces inicijacije je potreban GTP i tri inicijacijska faktora, koji su citosolni proteini.

Za vrijeme elongacije na polipeptid se dodaju aminokiseline prema slijedu kodona mRNA i između aminokiselina stvaraju se peptidne veze. Elongacija se događa u tri koraka – vezanje

aminoacil-tRNA, stvaranje peptidne veze i translokacija. Za proces elongacije potrebni su elongacijski faktori, također citosolni proteini. Hidroliza GTP-a osigurava pomicanje ribosoma po mRNA i vezanje dolazećih aminoacil-tRNA.

Signali za terminaciju translacije su stop kodoni na mRNA (UAA, UGA, UAG). Protein se otpušta s ribosoma pomoću proteinskih faktora otpuštanja. Ti faktori olakšavaju hidrolizu terminalne peptidil-tRNA veze, otpuštanje polipeptida i tRNA iz P mjesta ribosoma i disocijaciju velike i male podjedinice ribosoma.

Zadnji dio biosinteze proteina je njihovo smatanje i usmjeravanje. On je bitan jer da bi protein mogao vršiti svoju biološku funkciju, prvo se mora smotati u svoj aktivni oblik. Za vrijeme ili nakon translacije te prije ili nakon smatanja, protein se i enzimatski modificira, što uključuje uklanjanje jedne ili više aminokiselina (obično s N-kraja), adiciju acetilinih, fosforilnih i drugih skupina, proteolitičko cijepanje, glikozilaciju, dodatak prostetičkih skupina... Po završetku svih ovih faza, protein je "gotov" i spreman za obavljanje svoje biološke funkcije.



Slika 1. Shematski prikaz translacije. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>9</sup>.

## § 2. Modificiranje, smatanje i upućivanje proteina na ribosomu

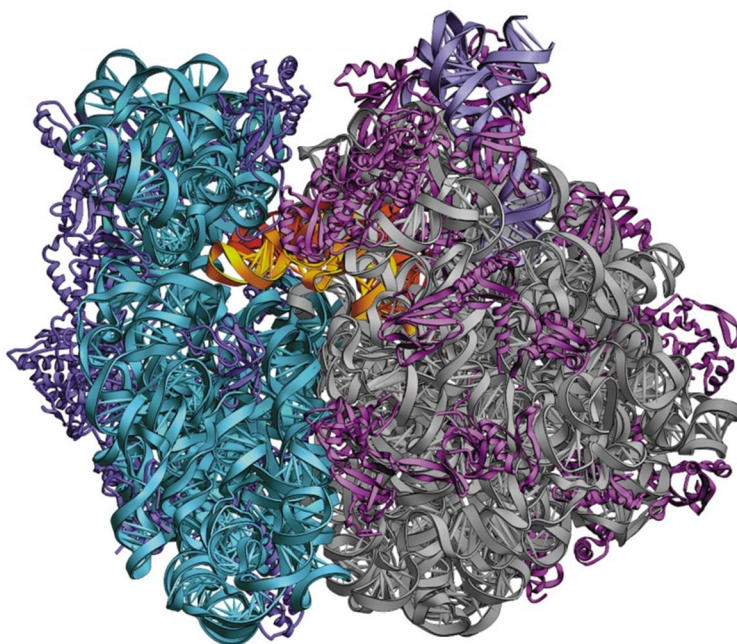
### 2.1. Struktura ribosoma

Ribosomi se sastoje od dvije podjedinice – male (30S, odnosno 40S kod eukariota) i velike (50S, odnosno 60S za eukariote). Bakterijski ribosomi (70S) manji su od eukariotskih (80S). U 50S podjedinici 5S i 23S rRNA čine strukturnu jezgru. Proteini su sekundarni elementi u strukturi i uglavnom se nalaze na površini. Bakterijski ribosomi sadrže oko 55, a eukariotski oko 88, različitih proteina.

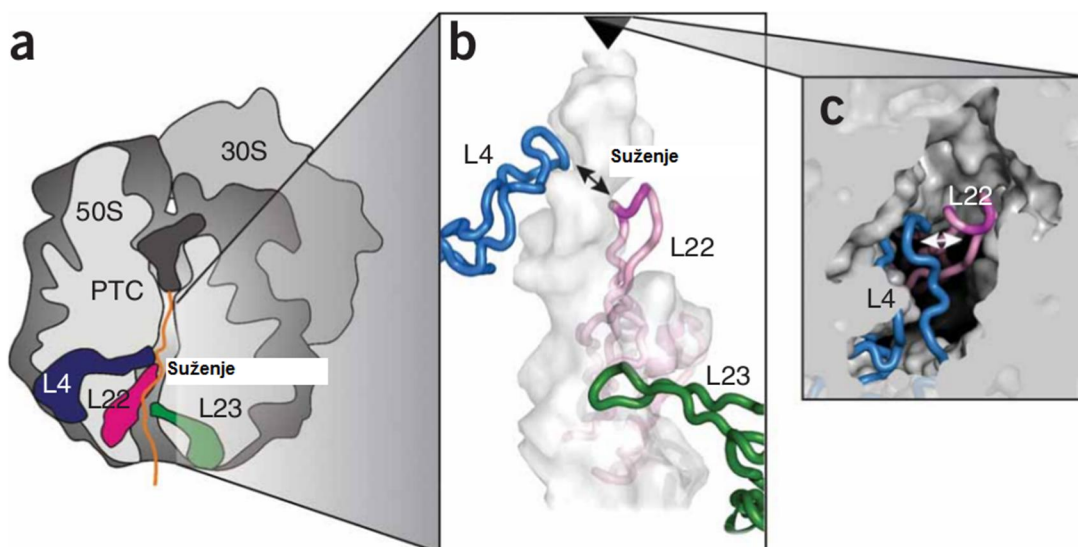
Mala podjedinica zadužena je za dekodiranje mRNA, a u velikoj podjedinici nalazi se peptidiltransferazni centar s aktivnim mjestom za stvaranje peptidne veze. Zanimljivo je da se to aktivno mjesto sastoji od ribosomske RNA i da upravo rRNA ima katalitičku funkciju. Ribosomi imaju i ribosomski izlazni tunel kroz koji izlaze novosintetizirani polipeptidi. Ponekad više ribosoma translatira istu mRNA.

Izlazni tunel dugačak je od 80 do 100 Å i širok oko 10 Å na najužem, odnosno oko 20 Å na najširem dijelu. Tunel je dovoljno dugačak da se u njemu može nalaziti dio polipeptida od oko 30 aminokiselina, ili ako je moguće stvaranje sekundarne strukture, čak 60 aminokiselina u strukturi  $\alpha$ -zavojnice. Kod bakterijskih ribosoma, stijenka tunela sastoji se uglavnom od 23S rRNA i dijelova ribosomskih proteina L4, L22 i L23 u obliku petlji. Između petlje proteina L4 i  $\beta$ -ukosnice proteina L22 postoji suženje tunela; ono se nalazi otprilike 30 Å od peptidiltransferaznog centra. Izlazni tunel se na svom distalnom kraju širi, a sam njegov rub se sastoji od RNA i prstena četiri očuvana ribosomska proteina – L22, L23, L24 i L29. Neki od ovih proteina imaju važnu ulogu u modifikaciji, smatanju i usmjeravanju proteina kao mjesta vezanja raznih faktora.





Slika 2. Prikaz 70S ribosoma, pogled s desne strane. Velika podjedinica obojena je sivo, a mala plavo. Preuzeto iz <sup>10</sup>.

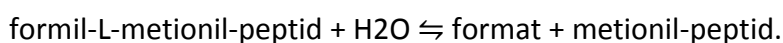


Slika 3. **(a)** Prikaz prolaska novosintetiziranog polipeptida (narančasto) kroz ribosom (sivo) od peptidil-transferaznog centra (PTC) do izlaza iz ribosomskog tunela. Vidi se da proteini L4 (plavo), L22 (ružičasto) i L23 (zeleno) dolaze u interakciju s polipeptidom. **(b)** Pogled na ribosomski tunel (sivo), s označenim petljama ribosomskih proteina L4 (plavo) i L22 (roza). Strelicom je označeno suženje tunela. Na izlazu iz tunela nalazi se protein L23 (zeleno). **(c)** Suženje tunela gledano od PTC-a. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>1</sup>.

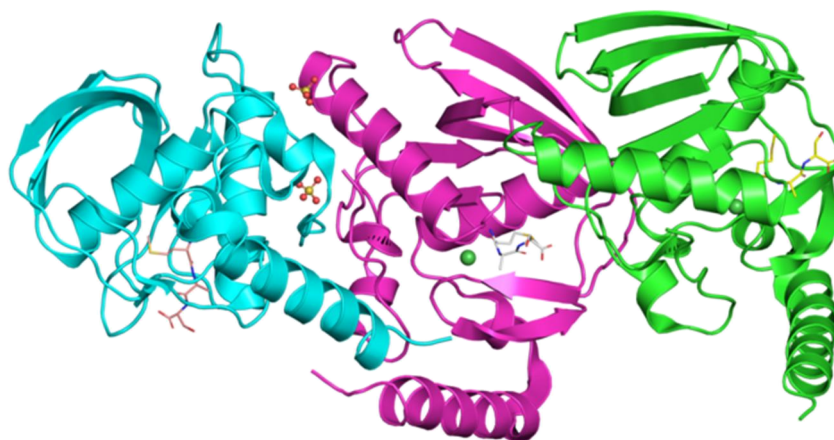
## 2.2. Enzimske kotranslacijske modifikacije

### 2.2.1. Peptid-deformilaze

Peptid-deformilaze (PDF) su metaloenzimi koji kataliziraju uklanjanje formilne skupine s N-formil-metionina koji se veže na ribosom pri inicijaciji translacije. Ova ko-translacijska modifikacija nužna je za kasnije uklanjanje metionina na N-kraju proteina pomoću metionin-aminopeptidaza. PDF pripadaju klasi hidrolaza koje djeluju na ugljik-dušik veze u linearnim amidima. Reakcija koju kataliziraju glasi:



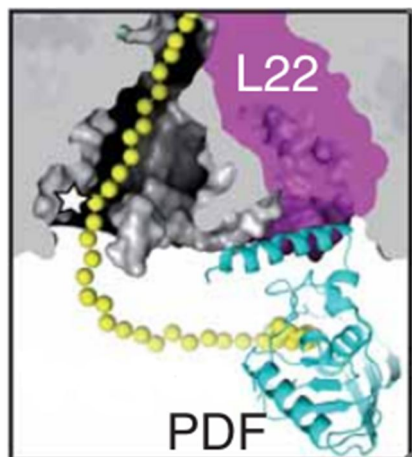
PDF u bakteriji *Escherichia coli* može imati ione  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  u aktivnom mjestu, ali se enzimski aktivnost smanjuje značajno ako je vezan ion  $\text{Zn}^{2+}$ .



Slika 4. Tri molekule PDF (ružičasto, zeleno i plavo) s ionima  $\text{Ni}^{2+}$  u aktivnom mjestu, u kompleksu s Met-Ala-Ser tripeptidom i dva sulfatna iona. Preuzeto iz <sup>11</sup>.

Kod bakterije *E. coli* PDF se veže preko svojeg C-kraja na veliku podjedinicu ribosoma, i to između proteina L22 i L23, koji se nalaze na izlaznom tunelu ribosoma. Način vezanja enzima veoma je bitan za obavljanje njegove funkcije, a ovakvo vezanje omogućuje da aktivno

mjesto PDF bude u blizini izlaznog tunela ribosoma i time spremno za interakciju s izlazećim novosintetiziranim polipeptidom.

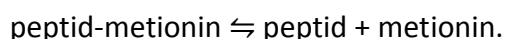


Slika 5. Prikaz interakcije PDF s novosintetiziranim proteinom (žuto) i ribosomom (sivo). Prikazan je i ribosomski protein L22 (ljubičasto), a izlaz iz ribosomskog tunela je označen zvjezdicom. Preuzeto iz <sup>1</sup>.

O važnosti ovog proteina za stanicu možda najbolje govori podatak da je delecija gena za PDF kod bakterije *E. coli* letalna, kao i da inhibicija PDF-a aktioninom usporava rast bakterija i fotosintezu u kloroplastima biljaka i zelenih algi.

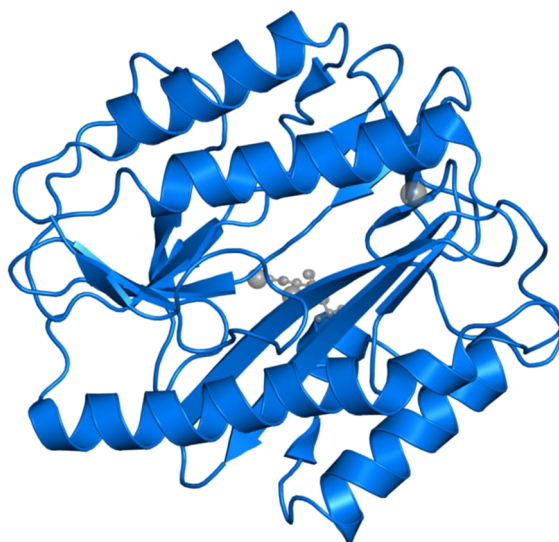
### 2.2.2. Metionin-aminopeptidaze

Metionin-aminopeptidaze (MAP) su citosolni metaloenzimi koji kataliziraju uklanjanje metionina s N-kraja novosintetiziranih proteina. Zanimljivo je da sam novosintetizirani protein regulira ovu reakciju<sup>1</sup>, a njoj prethodi reakcija peptid-deformilaze, kao što je opisano u prethodnom odjeljku. MAP pripadaju obitelji dimetalohidrolaza. Kataliziraju sljedeću reakciju:



Iako neki podatci upućuju na to da se ovi enzimi vežu na ribosome (primjerice, kod kvasca<sup>8</sup>), nisu poznata točna mjesta gdje dolazi do interakcije između MAP i ribosoma. Slično kao u slučaju PDF enzima, delecija gena za MAP kod bakterije *E. coli* dovodi do smrti stanice.

U ljudskom MAP-u katalitički metalni ion veže se na His331, Glu364, Glu459, Asp263 i premošćujuću molekulu vode ili hidroksilnu skupinu. Još nije utvrđeno koji se metalni ioni nalaze u aktivnom mjestu MAP-a u fiziološkim uvjetima i smatra se da bi se moglo raditi o  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ili  $\text{Zn}^{2+}$ .



Slika 6. MAP (plavo) u kompleksu s 5-(2-(trifluorometil)fenil)furan-2-karboksilnom kiselinom (sivo), pogled s prednje strane. Preuzeto iz <sup>12</sup>.

### 2.2.3. Acetiltransferaze

Acetilacija N-kraja veoma je česta kotranslacijska modifikacija proteina; čak 80-90% citosolnih proteina sisavaca i 40% proteina kvasca je acetilirano, dok je kod prokariota ova modifikacija rijetka. Reakciju acetilacije N-kraja kataliziraju neesencijalne hetero-oligomerne acetiltransferaze (NAT). Različite vrste ovih enzima razlikuju se po specifičnosti za supstrate i smatra se da su NAT vezani na ribosome te da se uistinu radi o ko-translacijskoj, a ne post-translacijskoj, modifikaciji.

Mišljenje da su ovi enzimi vezani na ribosome potvrđuju eksperimentalni dokazi – nađeno je da se NatA iz kvasca veže i na ribosome koji translatiraju mRNA i na one neaktivne, te da su i NatB i NatC također vezani na ribosome<sup>6</sup>. Nadalje, poznato je i da se NatA unakrsno povezuje (eng. *cross-linking*) s novosintetiziranim proteinom<sup>7</sup>. Postoje i dokazi da ribosomski proteini L23 i L29 imaju ulogu u vezanju NAT na ribosom<sup>1</sup>.

NatA glavna je acetiltransferaza u citosolu kvasca i katalizira acetilaciju mjesta u proteinu gdje su prisutni serin, alanin, treonin ili glicin. NatA sastoji se od tri podjedinice – kod kvasca su to Nat1p (98 kDa), Ard1p (27 kDa) i Nat5p. Nat1p služi za vezanje na ribosom, Ard1p ima katalitička svojstva, a funkcija Nat5p još nije poznata.



Slika 7. NatA u kompleksu s melanotropinom alfa, gvanozin-5',3'-tetrafosfatom, acetil koenzimom A i karboksimetil koenzimom A. Vidljive su i različite podjedinice NatA - Nat1p (zeleno), Ard1p (plavo) i Nat5p (ružičasto). Preuzeto iz<sup>13</sup>.

## 2.3. Kotranslacijsko smatanje proteina

### 2.3.1. Utjecaj brzine sinteze proteina na njegovo smatanje i načini usporavanja sinteze

Budući da se za vrijeme sinteze proteina on počinje smatati, modificirati, pa čak i usmjeravati, potrebni su mehanizmi usklađivanja tih procesa. Primjerice, sinteza proteina na ribosomu može se usporiti pojavom rijetkih kodona ili strukture mRNA koja je lokalno stabilna na ribosomu.

Sinteza se često usporava pojavom kodona koji se sporije translataju, i to na dijelovima mRNA koje kodiraju buduće granice različitih domena proteina ili neke specifične elemente sekundarne strukture (npr.  $\beta$ -ploče). Obilje eksperimentalnih dokaza podupire ovu tvrdnju; tako, npr., zamjena rijetkog kodona nekim učestalim u genima organizama *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae* ima za posljedicu bržu translaciju, ali smanjenu specifičnu aktivnost konačnih proteinskih produkata translacije<sup>1</sup>. Još jedan zanimljiv primjer je tiha mutacija ljudskog gena ABCB1 (MDR1), koja uzrokuje drugačije smatanje konačnog P-glikoproteina<sup>1</sup>.

Osim već spomenutih načina regulacije brzine translacije, i sam izlazni tunel na ribosomu ima ulogu u tom procesu<sup>1</sup>. On može olakšati vezanje nekih faktora i enzima na polipeptid koji se sintetizira na ribosomu i potaknuti stvaranje sekundarne strukture. Do privremenog usporavanja, ili čak zaustavljanja, translacije može doći ako se u polipeptidu pojavi određena sekvenca dok je u izlaznom tunelu. To mogu biti nabijeni aminokiselinski ostatci, primjerice lizin ili arginin, koji imaju pozitivan naboj. Smatra se da u tom slučaju do zaustavljanja translacije dolazi zbog interakcije naboja na tim aminokiselinskim ostacima i tunela. Sličnim mehanizmom dolazi do pauziranja translacije kada se translira poliadeninski (poli(A)) rep mRNA bez stop kodona jer se tada sintetizira polilizin pa, opet, dolazi do interakcije pozitivnih naboja na polilizinu i tunela.

Osim lizina i arginina, i druge aminokiseline i kratke sekvence polipeptida mogu imati utjecaj na brzinu translacije. Tako kod bakterije *E. coli* ciljni peptid TnaC može privremeno zaustaviti translaciju kada je prisutan triptofan, što pospješuje translaciju nizvodnog gena u

istom operonu<sup>1</sup>. Drugi primjeri uključuju prolin (i to Pro166) kod translacije gena *secA* i argininski atenuator iz kvasca koji može zaustaviti translaciju i u lizatu zečjeg retikulocita<sup>1</sup>, što sugerira da je ovaj mehanizam očuvan kroz sve domene života, i kod prokariota i kod eukariota.

Drugačija, ali jednako zanimljiva, je interakcija izlaznog tunela i polipeptida u nastajanju kojom se regulira afinitet SRP-a za vezanje na ribosom. U ovom slučaju dolazi do prijenosa signala preko ribosomskog proteina L23, o čemu će biti više riječi kasnije u radu. No, bitno je naglasiti da je ovaj prijenos signala neovisan o sekvenci polipeptida te da čak i polipeptidi koji nisu dovoljno dugački da dosegnu kraj izlaznog tunela mogu povećati afinitet SRP-a za vezanje na ribosom (i to oko 100 puta<sup>1</sup>).

### 2.3.2. Bakterijski šaperoni

Prokarioti i eukarioti imaju različite, strukturno nepovezane, šaperonske sustave koji se često privremeno vežu na ribosome. Kod prokariota razvio se šaperon *Trigger* faktor, a kod eukariota Hsp70 i sustavi koji koriste J-protein.

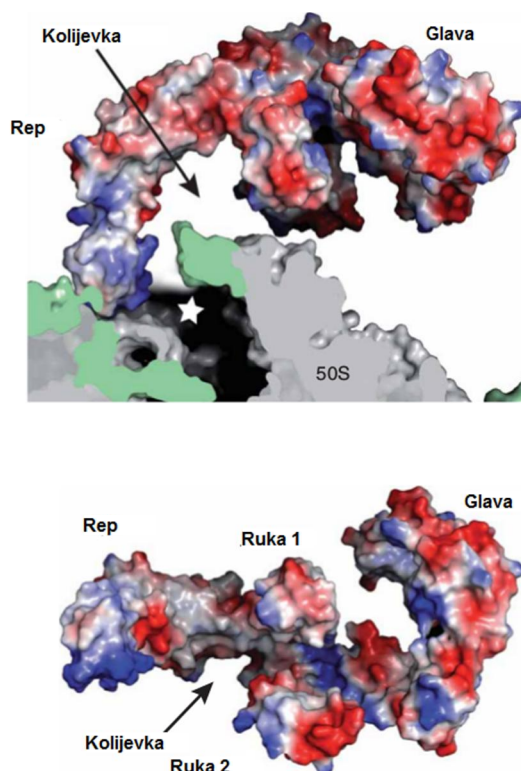
*Trigger* faktor veže se privremeno za ribosom i to je ključno za njegovu aktivnost. Čak i kada se na ribosomu ne sintetizira polipeptid, *Trigger* faktor se opetovano veže na ribosom i zatim disocira s njega. Kada se na ribosomu sintetizira polipeptid, on može, ovisno o dužini polipeptidnog lanca, ubrzati vezanje *Trigger* faktora na ribosom i usporiti njegovu disocijaciju s njega, što povećava afinitet *Trigger* faktora za vezanje na ribosom od 9 do 30 puta<sup>1</sup>. Ovaj mehanizam zanimljiv je jer omogućuje polipeptidu da za vrijeme svoje sinteze sam kontrolira vezanje *Trigger* faktora na ribosom. Smatra se da je ovakav mehanizam moguć jer se *Trigger* faktor, kako je već i spomenuto, može brzo vezati na ribosom i disocirati s njega te jer može brzo vezati i otpuštati polipeptide koji imaju puno aromatskih i bazičnih aminokiselinskih ostataka<sup>1</sup>, što znači da *Trigger* faktor može sam "pretraživati" nastajući polipeptid kako bi pronašao mjesta za koja se može vezati. Nadalje, ovo omogućuje *Trigger* faktoru da razlikuje prazne ribosome i one na kojima se događa sinteza proteina te se tako može preferentno vezati na aktivne ribosome.

Za vezanje svojih supstrata, *Trigger* faktor koristi cijeli svoj unutrašnji dio, koji stvara šupljinu u koju se može vezati supstrat. Ovo mu omogućuje da stvara i hidrofilne i hidrofobne interakcije sa supstratom jer u toj šupljini *Trigger* faktor ima i hidrofilne i hidrofobne ostatke. Zanimljiv je podatak da novosintetizirani proteini mogu ostati vezani u šupljini *Trigger* faktora čak i nakon smatanja, za što se vjeruje da štiti te proteine od razgradnje nekom proteazom. No, zbog svojih kinetičkih svojstava on disocira s novosintetiziranog proteina i veže se na aktivni ribosom. Smatra se da je ovakvo "kruženje" *Trigger* faktora iskorišteno pri smatanju proteina koji imaju više domena.

Molekula *Trigger* faktora ima izduženu strukturu, koja se često naziva strukturom zmaja. "Rep" zmaja čini N-kraj na kojem se nalazi sekvenca pomoću koje se veže na ribosom, a C-



kraj tvori svojevrsnu "kolijevku" s dvije helikalne "ruke". Stoga se C-kraj naziva još i "leđima" zmaja, dok je peptidil-prolil-izomerazna (PPI-azna) domena "glava" zmaja.



Slika 8. Struktura *Trigger* faktora. Gornja slika prikazuje *Trigger* faktor iz bakterije *E.coli* vezan na ribosom iz bakterije *E. coli* u kompleksu s novosintetiziranim polipeptidom. Ribosomski proteini su prikazani zeleno, a rRNA sivo. Zvezdica označava ribosomski tunel. Donja slika prikazuje kristalnu strukturu *Trigger* faktora gledano iz ribosomskog tunela. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>1</sup>.

N-kraj se veže na ribosom putem interakcije s proteinom L23, u blizini izlaza iz ribosomskog tunela. Uloga PPI-azne domene nije još sasvim razjašnjena – ona nije ključna za funkciju *Trigger* faktora i, zapravo, *Trigger* faktor može obavljati svoju funkciju bez PPI-azne domene *in vivo*<sup>10</sup>. Pretpostavlja se da PPI-azna domena služi kao pomoćno mjesto za vezanje supstrata, a moguće je i da ona pomaže smatanje određenih proteina, samo što takvi proteini još nisu pronađeni. C-kraj *Trigger* faktora čini najveći dio "zmaja" i nalazi se između PPI-azne domene i N-kraja, no, za razliku od ove dvije komponente *Trigger* faktora, izoliran i stabiliziran C-kraj pokazuje šaperonsku aktivnost *in vitro*. Nadalje, skraćivanje C-kraja

uzrokuje smanjenu aktivnost *Trigger* faktora, dok fragmenti *Trigger* faktora s očuvanim C-krajem omogućuju ponovno smatanje denaturiranih supstrata<sup>10</sup>.

### 2.3.3. Eukariotski šaperoni

Kvasac, *S. cerevisiae*, ima dva sustava šaperona – šaperonsku trijadu Ssb/Ssz/Zuotin i *nascent polypeptide-associated complex* (NAC). Oni služe kao pokazni modeli eukariotskih šaperona, ali njihove uloge u smatanju proteina još nisu sasvim razjašnjene.

Ssb se veže direktno na ribosome i može se vezati na novosintetizirane polipeptide kako bi ih zaštitio od krivog smatanja i, konačno, ubikvitinacije. Ssz i Zuotin stvaraju heterodimerni kompleks koji se naziva *ribosome-associated complex* (RAC). Zuotin je u interakciji s ribosomskim proteinom Rp131 pa je njegova uloga vezanje RAC-a na ribosom. No, vjerojatno postoje i dodatna mjesta na koje se Zuotin veže budući da se Zuotin veže na ribosom čak i kada je protein Rp131 uklonjen. RAC i Ssb rade zajedno – RAC je košaperon Ssb-a i stimulira njegovu ATP-aznu aktivnost. Da bi došlo do stimulacije ATP-azne aktivnosti Ssb-a, dostatan je samo Zuotin, ali Ssz je potreban da bi taj proces bio učinkovitiji.

Aktivnost Ssb kod kvasca se regulira pomoću tri faktora za izmjenu nukleotida (eng. *nucleotide-exchange factors*, NEF), iako još nije razjašnjeno koja je njihova točna uloga u regulaciji. Poznato je da NEF-ovi ubrzavaju izmjenu ADP-a i ATP-a te da se radi o NEF-ovima Fes1, Snl1 i Sse (koji je član Hsp110 obitelji proteina). Postoje i mišljenja da se u slučaju Sse i Ssb radi o šaperonskoj kaskadi, i to tako da se supstrat vezan na Ssb prenosi na Sse.

Ssb, Ssz i Zutoin su dio stanične mreže šaperona uključenih u sintezu proteina (eng. *cellular network of chaperones linked to protein synthesis*, CLIPS). Budući da su geni koji kodiraju CLIPS potisnuti u uvjetima stresa i transkripcijski ko-regulirani, smatra se da oni uistinu imaju ulogu u smatanju novosintetiziranih proteina. Delecija bilo kojeg od gena koji kodiraju CLIPS povećava osjetljivost stanice na antibiotike koji inhibiraju translaciju i na azetidin-2-karboksilnu kiselinu, analog prolina koji se ugrađuje u novosintetizirane proteine i sprečava njihovo pravilno smatanje. Zanimljivo je da svi CLIPS migriraju s polisomima u procesu translacije.

No, ovi sustavi nisu prisutni samo u kvascu – postoji i ljudski ortolog Zuotina iz kvasca, J-protein MPP11, a Ssz je povezan s ljudskim Hsp70L1. MPP11 i Hsp70L1 čine stabilan kompleks, a MPP11 se veže na ribosom. MPP11 "surađuje" s citosolnim Hsp70 Ssa.

Osim opisane šaperonske trijade, u kvascu postoji i NAC, koji se također veže na ribosom. Točnije, NAC veže novosintetizirane polipeptide i ribosome u omjeru 1:1. Ovisno o tome govorimo li o eukariotskom ili arhejskom NAC-u, on se sastoji od dvije različite ( $\alpha$  i  $\beta$ ), odnosno dvije jednake ( $\alpha$ ), podjedinice. Eukariotski NAC veže se na ribosom pomoću  $\beta$  podjedinice, a obje podjedinice dolaze u kontakt s novosintetiziranim polipeptidom.

Točna uloga NAC-a u smatanju proteina još nije sa sigurnošću utvrđena. Poznato je da delecija gena koji ga kodiraju ne uzrokuje velike nedostatke organizmu – radi se o nedostacima vidljivima samo pri višim temperaturama i kod određenih sojeva. S druge strane, ako govorimo o oblicima, voćnim mušicama i miševima, nedostatak NAC-a uzrokuje smrt embrija<sup>1</sup>.

Nakon opisa eukariotskih i prokariotskih šaperona, nameće se pitanje o razlogu postojanja dva različita sustava za smatanje proteina kod eukariota, kada bakterije imaju samo jedan. Odgovor bi mogao ležati u činjenici da eukarioti imaju "kompliciranije" proteine, tj. češće imaju proteine koji imaju više domena. Očito je da će takvi, "komplicirani" proteini zahtijevati i kompliciraniju mrežu šaperona koja će posao smatanja proteina obavljati brže i učinkovitije – iako je moguće da su se prvo razvile ovakve šaperonske mreže i da je time omogućen razvoj proteina s više domena koji zahtijevaju složenije šaperonske mreže za svoje smatanje. Osim toga, treba napomenuti i da eukariotski šaperoni imaju i dodatne uloge u stanici – primjerice, transport proteina u organele ili regulacija signalnih putova. Kada se sve to uzme u obzir, čini se logično da su eukarioti razvili složeniju i specijaliziraniju šaperonsku mrežu.

## 2.4. Usmjeravanje proteina

Usmjeravanje proteina potrebno je jer različiti proteini obavljaju različite funkcije na različitim mjestima u stanici i izvan nje, zbog čega im veći dio njihovih biosintetskih puteva nije zajednički. Primjerice, proteini koji su namijenjeni mitohondriju, kloroplastu i jezgri imaju tri različita mehanizma sinteze<sup>3</sup>.

### 2.4.1. Struktura SRP

*Signal recognition particle* (SRP) je ribonukleoproteinski kompleks koji kotranslacijski upućuje membranske proteine i proteine za sekreciju do stanične membrane (kod prokariota), odnosno do endoplazmatskog retikuluma (kod eukariota). SRP i njegov receptor, SR, orkestriraju prijenos translirajućih ribosoma sa signalnim sekvencama na translokone na ciljanoj membrani - za taj proces potreban je GTP.

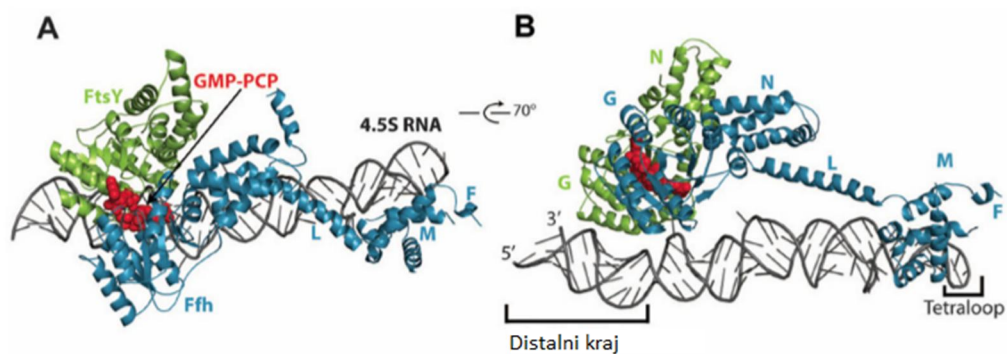
SRP i SR imaju dijelove koji su strukturno i funkcionalno očuvani u različitim domenama života. U bakteriji *E. coli* SRP ima dvije komponente – obje su očuvane i u drugim organizmima – protein Ffh (kod eukariota je to SRP54) i 4,5S SRP RNA. Protein Ffh ima regiju bogatu metioninom (M domena), helikalnu N domenu i GTP-aznu (G) domenu. M domena je domena pomoću koje dolazi do vezanja RNA i prepoznavanja signalnih sekvenci, a na N domeni dolazi do interakcije s ribosomom. SR kod bakterije *E. coli* se sastoji od jednog proteina, FtsY, koji ima domene slične N i G domenama kod Ffh i dodatnu, A, domenu koja je zadužena za interakcije s membranom i translokomom. Kada imaju vezan GTP, SRP i SR tvore stabilan heterodimerni kompleks jer se među njihovim N i G domenama ostvaruju brojne interakcije. Na mjestu gdje se SRP i SR spajaju, nastaje aktivno mjesto pomoću kojeg SRP i SR mogu recipročno aktivirati jedan drugog<sup>2</sup>. Da bi došlo do GTP-azne aktivacije u SRP-SR kompleksu, mora doći do konformacijskih promjena i u SRP-u i u SR-u. No, bitno je naglasiti da su te promjene drugačije od onih koje se događaju da bi došlo do stvaranja SRP-SR kompleksa. Ova GTP-azna aktivacija izuzetno je bitna za translokaciju proteina jer je

pokazano da mutacije koje blokiraju GTP-aznu aktivaciju jako ometaju usmjeravanje i translokaciju proteina<sup>2</sup>.

RNA u SRP-u je ključna i *in vivo* i *in vitro*. Potrebna je za usmjeravanje i translokaciju proteina *in vitro* i za održivost stanice *in vivo*. Kod bakterije *E. coli* 4,5S RNA ubrzava interakciju između Ffh i FtsY jer ubrzava stvaranje i disocijaciju kompleksa, i stimulira GTP-aznu aktivnost kada se stvori SRP-SR kompleks. Osim toga, smatra se da 4,5S RNA ima dodatnu ulogu platforme na kojoj se događaju konformacijske promjene u proteinima Ffh i FtsY nakon što M domena prepozna signalnu sekvencu.

Kod proteina Ffh i FtsY, M domena se veže blizu *tetra*loop regije (u blizini zavojnice 8) 4,5S RNA, a NG heterodimer je u dodiru sa suprotnim krajem 4,5S RNA. Kod Ffh proteina, poveznica između M i NG domena je zavojnica od 30 aminokiselina koji utječe na sposobnost SRP RNA da stimulira stvaranje SRP-SR kompleksa i hidrolizu GTP-a<sup>2</sup>, ali nije još sasvim jasno kako. Sigurno je jedino da ova zavojnica aktivirane NG domene proteina Ffh i FtsY stavlja na distalni kraj 4,5S RNA. Brzina GTP-azne reakcije određena je brzinom stvaranja kompleksa. *Tetra*loop regija ključna je za ubrzavanje stvaranja SRP-FtsY kompleksa, ali povećava brzinu GTP-azne aktivacije tek dva puta nakon što je GTP-azni kompleks stvoren. Skraćivanje SRP-FtsY kompleksa za do deset parova baza nemaju značajan utjecaj na brzinu GTP-azne reakcije, ali kada se taj kompleks skрати za dodatnih pet parova baza, dolazi do velikog smanjenja  $k_{cat}$  – čak do osam puta<sup>2</sup>. Iz ovoga se može zaključiti da je ova regija na distalnom kraju od presudne važnosti za hidrolizu GTP-a pomognutu sa SRP RNA. Nadalje, ova je regija glavno mjesto za vezanje NG domene SRP-SR kompleksa na distalnom kraju RNA. Pri skraćivanju SRP RNA nije došlo do znatnih promjena u vrijednosti  $K_m/k_{cat}$  za GTP-aznu reakciju dok RNA nije skraćena za više od 56 nukleotida<sup>2</sup>. Brzina stvaranja SRP-FtsY kompleksa limitira vrijednost  $K_m/k_{cat}$  za GTP-aznu reakciju, pa rezultati dobiveni u eksperimentu sa skraćivanjem SRP RNA sugeriraju da distalni kraj SRP RNA ubrzava korak katalize GTP-om, ali ne ubrzava i stvaranje SRP-FtsY kompleksa. Iz svega navedenog može se zaključiti da SRP RNA regulira interakciju SRP-FtsY na dva načina – *tetra*loop regija ubrzava stvaranje kompleksa, a distalni kraj utječe na GTP-aznu aktivaciju nakon stvaranja kompleksa.

Zanimljiv podatak o SRP RNA je činjenica da je sekvenca RNA u distalnoj regiji očuvana, i radi se o sekvenci GUGCCG. Ova sekvenca prisutna je u cijelom nizu 4,5S RNA (i to najčešće u zavojnici 5), a pored toga, nalazi se i u prokariotskoj 6S SRP RNA.



Slika 9. **(a)** Pogled na SR-SRP kompleks s gornje strane. Ffh je obojen plavo, 4,5S RNA sivo, FtsY zeleno. **(b)** Pogled na SR-SRP kompleks sa strane. N je N-domena, G je G-domena, M je M-domena, L je fleksibilna *linker* regija, a F je *finger* petlja. Preueto i prilagođeno prema <sup>2</sup>.

### 2.4.2. Interakcija SRP-a s ribosomom i ciklus SRP-a

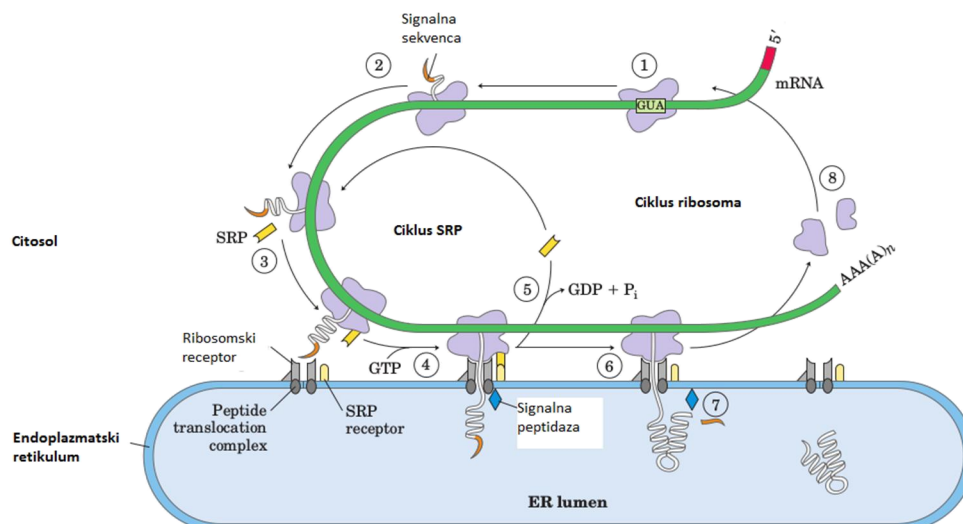
Signalni slijed je kratki aminokiselinski slijed (obično sadrži 13-36 aminokiselina) koji usmjerava protein na njegovo mjesto u stanici. Kao što je već spomenuto, kod prokariota on upućuje membranske proteine i proteine za sekreciju prema staničnoj membrani. Kod eukariota signalni slijed upućuje proteine prema endoplazmatskom retikulumu, bilo da se radi o sekrecijskim proteinima ili onima koji će ostati u stanici.

Kod eukariota signalni slijed obično sadrži oko 10 do 15 hidrofobnih aminokiselina, jednu ili više pozitivno nabijenih aminokiselina, obično bliže N-kraju proteina i to prije hidrofobne sekvence te kratku, relativno polarnu, sekvencu na karboksilnom kraju koja obično sadrži aminokiseline s kratkim bočnim lancima, osobito alanin. Karboksilni kraj signalnog slijeda određen je mjestom cijepanja, tj. mjestom gdje proteaza uklanja signalni slijed nakon unosa proteina u lumen endoplazmatskog retikuluma. Signalni slijed se pojavljuje rano pri sintezi proteina jer se obično nalazi na N-kraju, a on se prvi sintetizira. Često se signalni slijedovi uklanjaju posttranslacijskim modifikacijama. Većina membranskih i sekrecijskih proteina ima signalnu sekvencu na N-kraju koja ih preodređuje za slanje u lumen endoplazmatskog retikuluma. Proteini s ovakvim signalnim slijedovima sintetiziraju se na ribosomima na endoplazmatskom retikulumu.

Treba naglasiti da kod prokariota interakcija SRP-a s ribosomom može biti i neovisna o signalnoj sekvenci – interakcija samog polipeptida koji se sintetizira na ribosomu s ribosomskim tunelom može regulirati vezanje SRP-a. Kod bakterije *E. coli* čak i lanci koji su prekratki da dosegnu kraj izlaznog tunela mogu povećati afinitet SRP-a za vezanje na ribosome za čak sto puta<sup>1</sup>. To je moguće jer se signal prenosi iz unutrašnjosti ribosomskog tunela do površine ribosoma preko petlje u proteinu L23 koja prodire u izlazni tunel.

No, budući da je za vezanje SRP-a često ipak potrebna signalna sekvencu, potrebno je nešto reći i o ciklusu SRP. Kod eukariota on se može podijeliti na četiri dijela: vezanje SRP na ribosom, pauziranje translacije, usmjeravanje prema endoplazmatskom retikulumu i disocijacija SRP. Usmjeravanje proteina započinje inicijacijom translacije na ribosomu; signalni slijed pojavljuje se rano u sintezi jer se nalazi na N-kraju koji se sintetizira prvi. Pri

izlasku signalnog slijeda iz izlaznog tunela dolazi do vezanje signalnog slijeda i samog ribosoma na SRP – SRP tada hidrolizira GTP i zaustavlja elongaciju polipeptida kada on sadržava oko 70 aminokiselina i signalni slijed je u potpunosti izašla iz izlaznog tunela. SRP tada usmjerava ribosom prema SRP receptorima na citosolnoj strani endoplazmatskog retikuluma. Novosintetizirani polipeptid se tada prenosi na peptidni translokacijski kompleks (eng. *peptide translocation complex*, PTC), a SRP disocira s ribosoma i svojeg receptora (SR) što je povezano s hidrolizom GTP-a. Elongacija polipeptida se tada nastavlja, pri čemu translokacijski kompleks koristi ATP da bi unosi polipeptid u lumen endoplazmatskog retikuluma sve dok se ne sintetizira cijeli polipeptid. Signalni slijed uklanja signalna peptidaza u lumenu endoplazmatskog retikuluma i ribosom disocira s endoplazmatskog retikuluma.

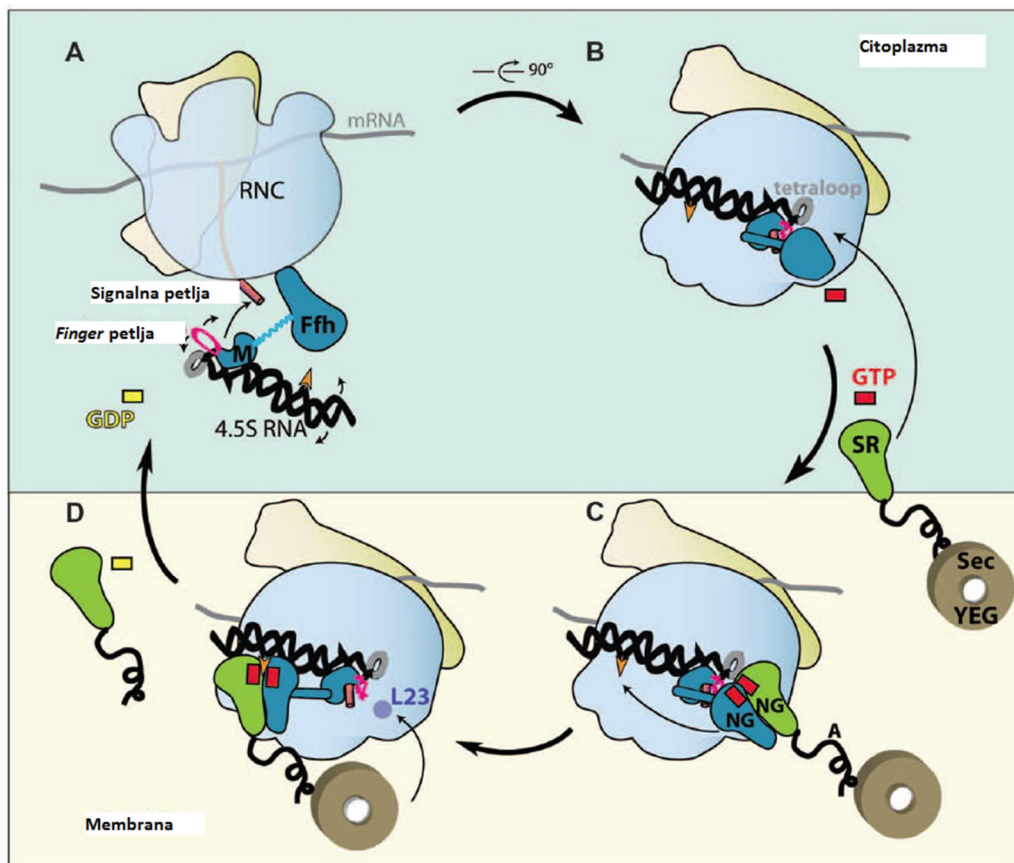


Slika 10. Pojednostavljeni prikaz ciklusa SRP-a kod eukariota. **(1)** Inicijacija translacije. **(2)** Pojava signalnog slijeda. **(3)** Vežanje SRP-a na ribosom i rastući polipeptidni lanac. **(4)** SRP usmjerava ribosom prema SR na citosolnoj strani endoplazmatskog retikuluma. **(5)** SRP disocira s ribosoma. **(6)** Nastavlja se elongacija polipeptida. **(7)** Uklanja se signalni slijed. **(8)** Disocijacija ribosoma. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>3</sup>.

Gore je opisan ciklus SRP-a na malo jednostavnijoj razini – detaljniji ciklus SRP se može vidjeti na slici 11. Kao što se vidi na slici, SRP se na ribosom u kompleksu s polipeptidom kojeg sintetizira veže preko N domene proteina Ffh na ribosomske proteine L23 i L29. Osim toga, dolazi i do interakcije M domene proteina Ffh sa signalnom sekvencom. G domena proteina



Ffh je tada u blizini *tetra*loop regije 4,5S RNA i može doći u interakciju sa SR. Vežanje SR olakšava *tetra*loop regija RNA jer dolazi do stabilizacije nove konformacije NG heterodimera zbog interakcije sa SR. Aktivirani NG heterodimer se zatim odvaja s izlaza iz ribosomskog tunela, ali ostaje povezan sa SRP RNA preko M domene, i premjesti se na alternativno vezno mjesto na distalnom kraju 4,5S RNA. Pomicanje NG domene za posljedicu ima prijenos translokona prema njegovom veznom mjestu na ribosomu (protein L23) jer se A domena proteina FtsY veže na translokon. Nadalje, interakcija aktiviranog NG heterodimera s distalnom regijom 4,5S RNA stimulira GTP-aznu aktivnost u proteinima Ffh i FtsY, što dovodi do njihove disocijacije i time završava ciklus usmjeravanja.



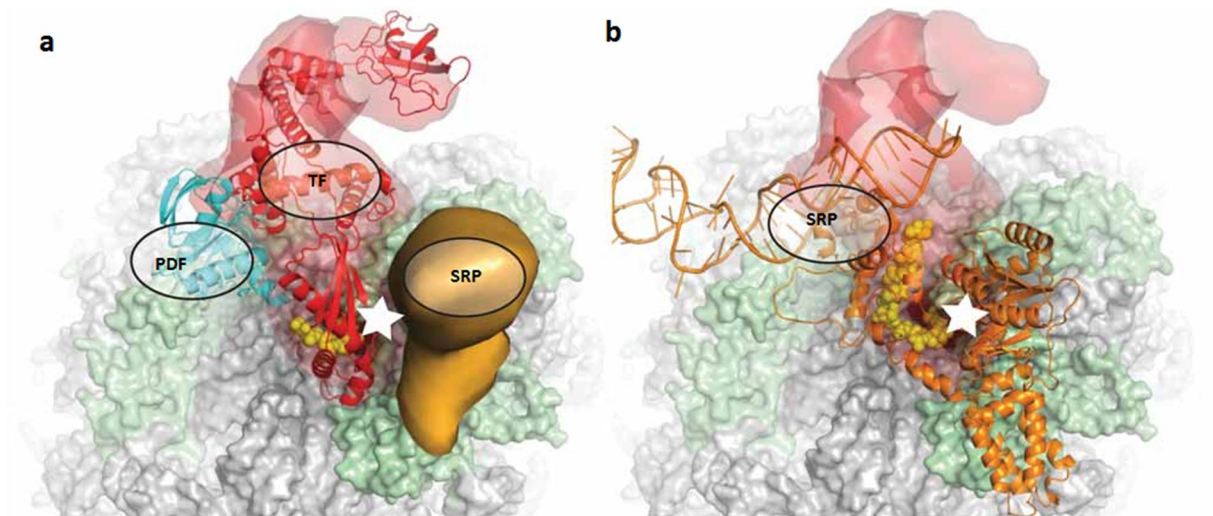
Slika 11. Detaljniji prikaz ciklusa SRP. **(a)** SRP prepoznaje ribosom u kompleksu s novosintetiziranim polipeptidom (RNC) i M-domena dolazi u interakciju sa signalnim peptidom. **(b)** N-domena je u interakciji s L23 i *linker* regija prekriva M-domenu. **(c)** SRP vezan na RNC se prenosi u blizinu membrane pomoću interakcije SRP-a sa SR. **(d)** Promjene ovisne o GTP-u u kompleksu omogućuju odvajanje N-domene proteina Ffh od proteina L23 i RNA *tetra*loop regije i premještanje NG kompleksa. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>2</sup>.

### 2.4.3. Interakcija SRP-a i Trigger faktora

Jedna od najvažnijih "odluka" koja se donosi na ribosomu je sudbina novosintetiziranog proteina – protein se može smatati u citosolu ili se pak može kotranslacijski translocirati u membranu ili preko nje. Drugi od spomenutih procesa zahtijeva interakciju SRP-a s ribosomom, pri čemu SRP prepoznaje hidrofobnu signalnu sekvencu na N-kraju novosintetiziranog polipeptida pri njegovom izlasku iz ribosomskog tunela. No, SRP nije jedini stanični faktor kojeg "zanimaju" hidrofobne sekvence na novosintetiziranom polipeptidu – *Trigger* faktor mu kompetira za vezanje na takve polipeptidne lance.

Kada se pojavi hidrofobna signalna sekvencu u novosintetiziranom lancu, dolazi do stabilizacije interakcije između SRP-a i ribosoma i, istovremeno, smanjenog vezanja *Trigger* faktora na ribosom. No, pri pojavi manje hidrofobnih sekvenci, *Trigger* faktor inhibira vezanje SRP-a na novosintetizirani lanac. Dapače, postoje dokazi da *Trigger* faktor utječe na usmjeravanje proteina prema Sec translokonu – kada nema *Trigger* faktora *in vivo*, dolazi do ubrzanja izlaska proteina iz stanice, povećanja broja ribosoma na membrani i smanjuje se potreba za faktorom usmjeravanja SecB1.

Iako se SRP i *Trigger* faktor mogu vezati istovremeno na ribosom, oba faktora vežu se na isto mjesto – ribosomski protein L23, pa je očito da je takav slučaj rijedak i malo vjerojatan. Strukturni modeli pokazuju da bi u slučaju vezanja oba faktora na ribosom došlo do značajnih smetnji<sup>1</sup>. Nadalje, pri vezanju SRP-a na signalnu sekvencu u polipeptidnom lancu dolazi do dodatnih interakcija između površine ribosoma (rRNA) i SRP-a, te između ribosomskih proteina L22, L24 i L32, što znači da bi moralo doći do značajnih konformacijskih promijena na jednom od faktora da bi se SRP i *Trigger* faktor vezali istovremeno. Do konformacijskih promjena pri vezanju na ribosom dolazi u slučaju SRP-a, ali ne zna se kako te promjene utječu na interakcije SRP-a i *Trigger* faktora, ako uopće imaju utjecaja.



Slika 12. Interakcija faktora vezanih na ribosom u blizini izlaznog tunela (označen zvjezdicom). **(a)** Za kratke polipeptidne lance (žuto), *Trigger* faktor (crveno) koordinira ko-translacijske promjene koje radi PDF (plavo) i traženje signalnih sekvenci koje obavlja SRP (narančasto). **(b)** SRP se veže na duže polipeptidne lance sa signalnim sekvencama. U ovoj konformaciji bi se preklapao s *Trigger* faktorom, da je on vezan na ribosom. Preuzeto iz <sup>1</sup>.

#### 2.4.4. Interakcija SRP-a i NAC-a

NAC, osim što sudjeluje u kotranslacijskom smatanju proteina, može regulirati i aktivnost SRP-a. Odsutnost NAC-a *in vitro* uzrokuje nepravilnu interakciju SRP-a s ribosomima u kompleksu s novosintetiziranim proteinima koji nemaju signalne sekvence i krivo usmjeravanje takvih proteina na membranu endoplazmatskog retikuluma ili preko te membrane<sup>1</sup>.

Iz ovoga se može zaključiti da NAC kontrolira translokaciju proteina na i preko endoplazmatskog retikuluma i to tako da povećava specifičnost SRP-a. Ovo dodatno potkrepljuje činjenica da NAC i SRP kompetiraju za vezanje na istom mjestu na ribosomu.

U ovome se mogu vidjeti i neke sličnosti između NAC-a i *Trigger* faktora i načina na koji su povezani sa SRP-om.

## 2.5. Zaključak

Ribosom je mjesto na koje se vežu mnogi faktori kojima je zadaća usmjeravanje, smatanje ili modificiranje proteina. Iako se dosta zna o načinu interakcije ribosoma i tih faktora, te samih procesa koji se događaju kotranslacijski na ribosomu ili odmah po završetku translacije, puno je još neodgovorenih pitanja. Primjerice, mehanizmi koji omogućuju tim faktorima da obavljaju svoju zadaću još nisu razjašnjeni, kao ni mehanizmi interakcije faktorâ i ribosoma.

Zato je potrebno provoditi daljnja istraživanja u ovom području kako bi se u potpunosti odgovorilo na sva pitanja koja okružuju ovu zanimljivu ulogu ribosoma u životu novosintetiziranih polipeptidnih lanaca, što bi moglo imati primjenu u razvoju još boljih makrolidnih lijekova ili, pak, sasvim novih lijekova koji bi djelovali na neki od kotranslacijskih i posttranslacijskih procesa opisanih u ovom radu. No, sigurno je da ovo područje nudi pregršt mogućnosti za daljnja istraživanja.

## § 3. Literaturna vrela

1. G. Kramer, D. Boehringer, N. Ban, B. Bukau, The ribosome as a platform for co-translational pre-processing, folding and targeting of newly synthesized proteins, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16** (2009) 589-597
2. S. Ataide, N. Schmitz, K. Shen, A. Ke, S. Shan, J. Doudna, N. Ban, The Crystal Structure of the Signal Recognition Particle in Complex with its Receptor, *Science* **331** (2011) 881-886
3. D. L. Nelson, M. M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry fifth edition, W. H. Freeman and Company, New York, 2008., str. 1096-1109.
4. J. Stenesh, Biochemistry IV Transfer of Genetic Information, Plenum Press, New York, 1998., str. 496-497.
5. J. A. Vetro, Y. H. Chang, Yeast methionine aminopeptidase type 1 is ribosome-associated and requires its N-terminal zinc finger domain for normal function in vivo, *J. Cell. Biochem.* **85** (2002) 678-688
6. B. Polevoda, S. Brown, T. S. Cardillo, S. Rigby, F. Sherman, Yeast N $\alpha$ -terminal acetyltransferases are associated with ribosomes, *J. Cell. Biochem.* **103** (2008) 492-508
7. M. Gautschi et al., The yeast N $\alpha$ -acetyltransferase NatA is quantitatively anchored to the ribosome and interacts with nascent polypeptides, *Mol. Cell. Biol.* **23** (2003) 7403-7414
8. A. Hoffman, B. Bukau, G. Kramer, Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor, *Biochim. Biophys. Acta* **1803** (2010) 650-661
9. [https://en.wikipedia.org/wiki/Ribosome#/media/File:Peptide\\_syn.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Ribosome#/media/File:Peptide_syn.png) (preuzeto 25.8.2016.)
10. [http://rna.ucsc.edu/rnacenter/images/figs/70s\\_atrna\\_nolabels.jpg](http://rna.ucsc.edu/rnacenter/images/figs/70s_atrna_nolabels.jpg) (preuzeto 25.8.2016.)
11. [http://www.ebi.ac.uk/pdbe/static/entry/1bs6\\_deposited\\_chain\\_side\\_image-800x800.png](http://www.ebi.ac.uk/pdbe/static/entry/1bs6_deposited_chain_side_image-800x800.png) (preuzeto 25.8.2016.)
12. [http://www.ebi.ac.uk/pdbe/static/entry/2evc\\_entity\\_1\\_front\\_image-800x800.png](http://www.ebi.ac.uk/pdbe/static/entry/2evc_entity_1_front_image-800x800.png) (preuzeto 25.8.2016.)
13. [http://www.ebi.ac.uk/pdbe/static/entry/4xpd\\_deposited\\_chain\\_front\\_image-800x800.png](http://www.ebi.ac.uk/pdbe/static/entry/4xpd_deposited_chain_front_image-800x800.png) (preuzeto 25.8.2016.)