

Stanični mehanizmi održavanja homeostaze proteina kod bakterija

Sinković, Paola

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:898214>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Paola Sinković

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Stanični mehanizmi održavanja homeostaze proteina kod bakterija

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: Prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2018.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 29. lipnja 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 21. rujna 2018.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	8
1.1. Sastav i struktura proteina.....	8
1.1.1. Primarna struktura proteina.....	9
1.1.2. Sekundarna struktura proteina	9
1.1.3. Tercijarna i kvaterna struktura proteina	10
1.2. Biosinteza proteina.....	11
1.2.1. Transkripcija.....	12
1.2.2. Translacija	14
1.3. Smatanje proteina	19
1.3.1. Regulacija smatanja proteina	20
1.4. Agregacija proteina.....	22
1.4.1. Nastanak agregata	23
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	26
2.1. Dijelovi staničnog aparata za kontrolu kvalitete proteina	26
2.1.1. Šaperoni	26
2.1.2. Šaperonini	28
2.1.3. Proteaze	29
2.2. Stanični mehanizmi očuvanja homeostaze proteina	32
2.2.1. Stanični odgovor na agregaciju.....	32
2.2.2. Smatanje novოსინтетизированог протеина (smatanje de novo).....	35
2.2.3. Uklanjanje pogrešno smotanog proteina.....	44
2.3. Utjecaj okoline na stanicu	45
2.3.1. Stanični odgovor na temperaturni stres.....	46
2.3.2. Stanični odgovor na oksidacijski stres.....	47
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	L

§ Sažetak

Proteini su jedni od najvažnijih makromolekula u živim sustavima jer obavljaju bitne funkcije u svim biološkim procesima. Oni djeluju kao katalizatori, prenose i pohranjuju ostale molekule, osiguravaju mehaničku potporu te kontroliraju rast i diferencijaciju stanice. Homeostaza proteina je stanje stanice u kojem je proteom (skup svih proteina koje organizam proizvodi tijekom života odnosno u određenoj fazi života) stabilan i funkcionalan. Drugim riječima održavanje homeostaze proteina zapravo predstavlja održavanje ravnoteže između sinteze, smatanja, translatiranja, agregacije i razgradnje proteina. Iz tog razloga vrlo je bitno održavanje homeostaze proteina kako ne bi došlo do gubitka određenih funkcija brojnih proteina, a time i do smrti stanice. Bakterijske stanice razvile su sofisticirane sustave pomoću kojih održavaju i reguliraju homeostazu proteina. Takvi sustavi potpomažu u smatanju novosintetiziranih proteina čime stanica sprječava nastanak nefunkcionalnih proteina. No, stanica često biva izložena vanjskom utjecaju zbog čega dolazi do promjene uvijeta u stanici koji dovode do narušavanja native strukture proteina. Proteini narušenih struktura izlažu svoje hidrofobne regije na površinu te na taj način uzrokuju interakciju s drugim proteinima i agregaciju. Iz tog razloga stanica indicira šaperone kako bi smanjila agregaciju. Molekularni šaperoni su proteini koji olakšavaju smatanje drugih proteina te se pojačano sintetiziraju u uvjetima stresa. Bakterija *Escherichia coli* svakodnevno je izložena ovakvoj situaciji te je uspješno riješila ovaj problem. Naime, u stanicama bakterije *E. coli* razvijeni su sustavi koji međusobnom suradnjom uklanjaju takve aggregate razgradnjom ili staničnom diobom. Sustavi koji održavaju homeostazu proteina u bakterijama bit će detaljno objašnjeni u daljnjem tekstu ovog rada.

§ 1. UVOD

1.1. Sastav i struktura proteina

Proteini su linearni polimeri izgrađeni od monomernih jedinica nazvanih aminokiselinama, koje su kovalentno vezane jedna za drugu preko ugljika iz α -karboksilne skupine jedne aminokiseline i dušika iz α -amino skupine druge. Takva veza naziva se peptidna veza. Aminokiseline su dakle gradivni blokovi proteina. Svaka α -aminokiselina sastoji se od središnjeg ugljikova atoma, zvanog α -ugljikov atom, na koji su vezani amino-skupina, karboksilna skupina, vodikov atom, te specifična skupina R, tzv. bočni ogranak.¹ Iako postoji velik broj različitih aminokiselina u stanici nađeno je da svega dvadeset aminokiselina gradi proteine, a razlikuju se u strukturi bočnih ogranaka. Takvi bočni ogranci međusobno se razlikuju oblikom, nabojem, sposobnošću za stvaranje vodikovih veza, hidrofobnošću i kemijskom reaktivnošću. Tako proteinogene aminokiseline možemo podijeliti u nekoliko skupina:

1. Aminokiseline s alifatskim bočnim ograncima: glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, metionin i prolin
2. Aminokiseline s aromatskim bočnim ograncima: fenilalanin, tirozin i triptofan
3. Aminokiseline s polarnim, ali nenabijenim bočnim ograncima: serin, treonin, cistein, asparagin i glutamin
4. Aminokiseline s nabijenim bočnim ograncima: lizin, arginin, histidin, aspartat i glutamat

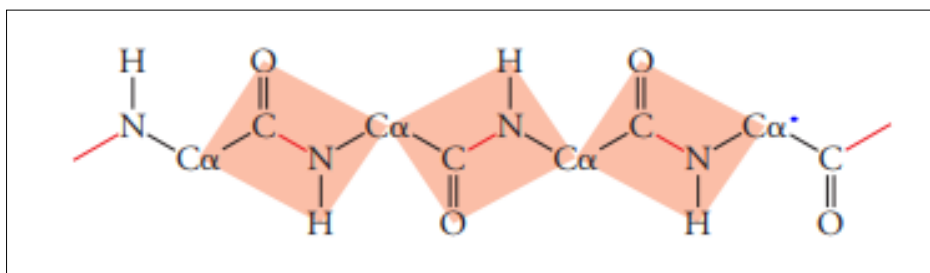
Alifatski bočni ogranci uglavnom su hidrofobni, zbog čega se nastoje međusobno zbližiti, a izbjeci vodu. S druge strane bočni ogranci koji sadrže polarne skupine ne izbjegavaju vodu, što ih čini hidrofilnima.

Za razumijevanje funkcije proteina potrebno je poznavati njihovu trodimenzionalnu strukturu. Za utvrđivanje strukture proteina koriste se tehnike kao što su spektroskopija NMR ili difrakcija rentgenskih zraka na kristalu proteina. Određenim eksperimentima ustanovljeno je da slijed aminokiselina (primarna struktura) u nekom proteinu određuje njegovu trodimenzionalnu strukturu. Proteini posjeduju četiri razine strukture koje određuju izgled

proteina u prostoru kao i njegovu funkciju, a to su: primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura.

1.1.1. Primarna struktura proteina

Primarna struktura proteina je kovalentni slijed aminokiselina koji je nastao vezanjem α -karboksilne skupine jedne aminokiseline s α -amino-skupinom druge (slika 1.). Taj tip veze naziva se peptidnom vezom. Niz aminokiselina povezanih peptidnom vezom čine polipeptidni lanac koji posjeduje polarnost jer su mu krajevi različiti. Dogovorno se amino-kraj smatra početkom polipeptidnog lanca, pa se slijed aminokiselina u polipeptidnom lancu piše počevši od toga kraja. Polipeptidni lanac sastoji se od glavnog dijela ili okosnice te varijabilnog dijela, koji čine različiti bočni ogranci. Svaki dio polipeptidne okosnice sadrži karbonilnu skupinu, koja je dobar akceptor u vodikovoj vezi, te, uz iznimku prolina, amino skupinu, koja je dobar donor u vodikovoj vezi. Dodatna stabilizacija polipeptidnog lanca postiže se stvaranjem disulfidnih veza, nastalih oksidacijom para cisteinskih ostataka. Disulfidna veza može nastati između dva polipeptidna niza ili unutar jednog lanca. Izvanstanični proteini obično imaju nekoliko disulfidnih veza, dok ih unutarstanični proteini nemaju. Primarna struktura proteina određuje strukturu i funkciju proteina te je ona određena slijedom nukleotida u molekuli DNA koja nosi informaciju o tom proteinu.



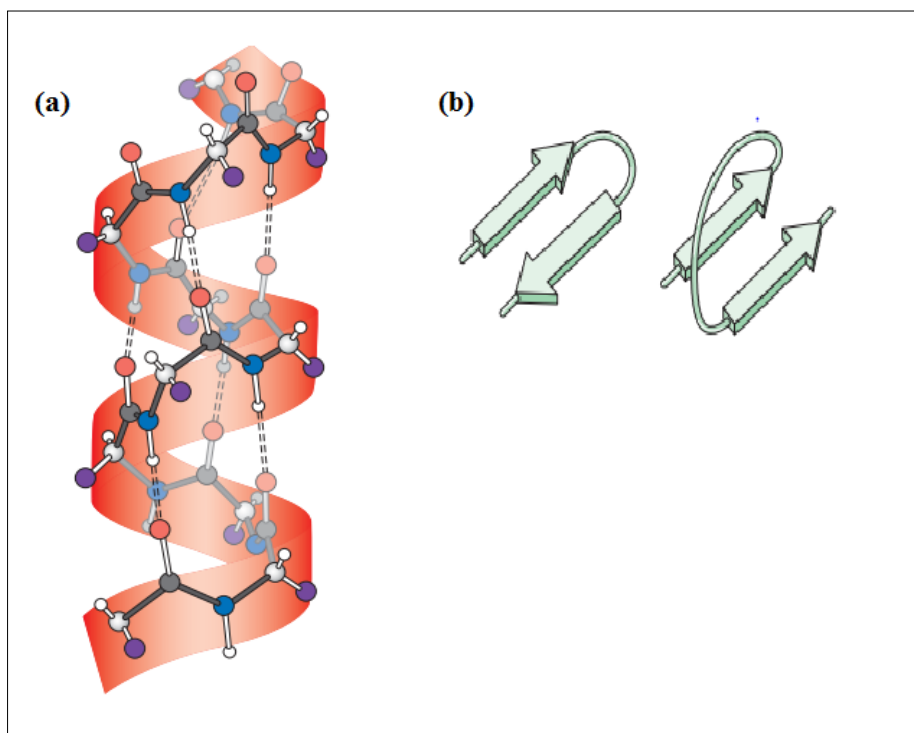
Slika 1. Primarna struktura proteina sastavljena od aminokiselina povezanih peptidnom vezom. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (2))

1.1.2. Sekundarna struktura proteina

Sekundarna struktura proteina jest prostorni raspored aminokiselina koje se u aminokiselinskom slijedu međusobno nalaze u blizini. Glavni elementi sekundarne strukture jesu α -uzvojnica i β -nabrana struktura (β -ploča) (slika 2.).

Alfa-uzvojnica je periodička struktura stabilizirana vodikovim vezama između amino skupine (NH) i karboksilne skupine (C=O) glavnog lanca. Odnosno, karboksilna skupina svake aminokiseline tvori vodikov most s amino skupinom četvrte po redu aminokiseline. Dodatne interakcije koje stabiliziraju α -zavojnici mogu biti elektrostatske interakcije i interakcije bočnih ogranaka n i $n+3$ ($n+4$). Sterički efekt susjednih skupina te prisutnosti glicina i prolina također utječu na stabilnost α -zavojnice zbog toga što oni određuju konformacijsku slobodu.

Beta-nabrana struktura ili β -ploča građena je od dvaju ili više polipeptidna lanca koja se povezuju vodikovim vezama između karbonilne skupine i amino skupine okosnice β -lanca. U β -nabranoj strukturi polipeptidni je lanac gotovo u potpunosti izdužen. Susjedne niti u β -nabranoj strukturi mogu teći u suprotnim smjerovima (antiparalelna β -ploča) ili u istom smjeru (paralelna β -ploča).



Slika 2. Shematski prikaz sekundarne strukture proteina, (a) struktura α -zavojnice, (b) struktura antiparalelne i paralelne β -ploče. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (2))

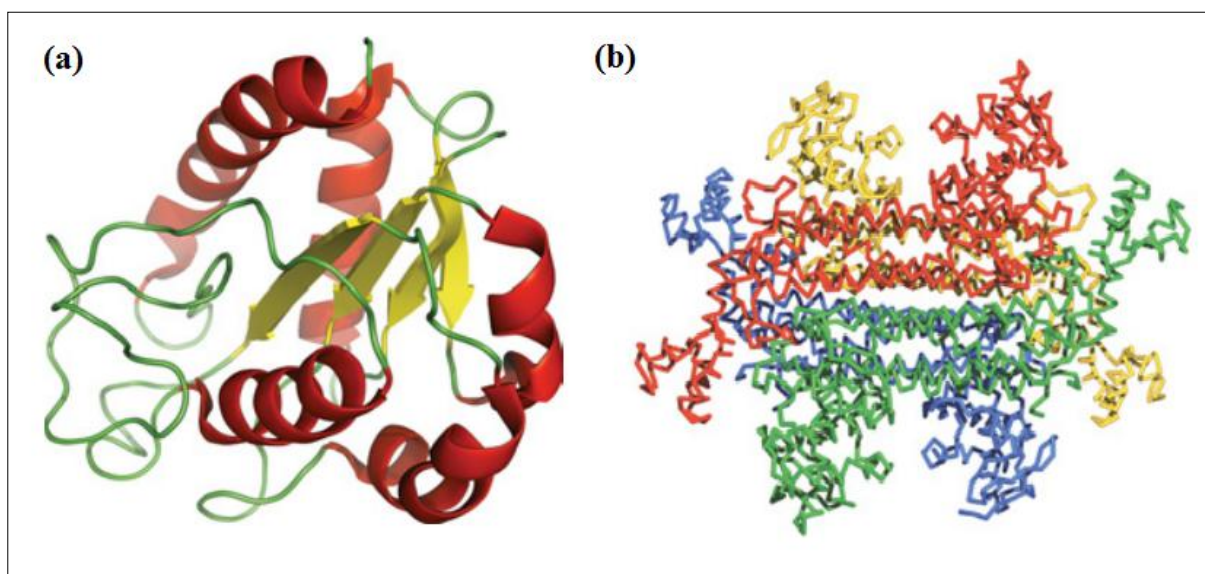
1.1.3. Tercijarna i kvaterna struktura proteina

Tercijarna struktura proteina je trodimenzionalna struktura jednog polipeptidnog lanca (slika 3. (a)). Unutrašnjost takvog polipeptidnog lanca sastoji se uglavnom od nepolarnih

aminokiselinskih ostataka dok su nabijeni ostatci na površini. Objašnjenje takve raspodjele potječe od toga što hidrofobni ostatci imaju veliku tendenciju izbjegavanja vode u vodenom mediju kao što je citosol stanice. S druge strane određeni proteini, najčešće membranski proteini, izvana su pokriveni hidrofobnim ograncima dok im središte proteina sadrži uglavnom polarne i hidrofilne aminokiseline. Razlog takve raspodjele jest to što su membranski proteini okruženi fosfolipidima, skupinama koje izgrađuju staničnu membranu. Fosfolipidi posjeduju hidrofobni "rep" izgrađen od masnih kiselina koje se nalaze u središtu membrane te zbog toga membranski protein izvana posjeduje nenabijene hidrofobne ogranke.

Mnogi se polipeptidni lanci sklapaju u dvije ili više međusobno povezane jedinice. Takve kompaktne jedinice nazivamo domenama.¹

Kvaterna struktura proteina jest prostorni razmještaj više polipeptidnih lanaca u trodimenzionalnom prostoru (slika 3. (b)). Najjednostavniji primjer kvaterne strukture jest dimer, koji se sastoji od dvije jedinice, koje mogu i ne moraju biti istovjetne.



Slika 3. Razine struktura proteina, (a) tercijarna struktura proteina flavodoksin, (d) kvaterna struktura proteina iz bakterije *E. coli*. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (2))

1.2. Biosinteza proteina

Biosinteza proteina jedan je od najvažnijih bioloških procesa u svakom organizmu. To je proces u kojem nastaje polipeptidni lanac, koji zatim uz složene procese smatanja postaje funkcionalan protein. Biosintezu proteina zapravo možemo smatrati vrlo složenim procesom

nastanka proteina koja mora biti dobro/precizno regulirana kako bi stanica normalno funkcionirala. Pravilno smatanje proteina do native forme i posttranslacijske modifikacije proteina važni su procesi koje također možemo smatrati dijelom biosintetskog puta proteina.

Biosinteza proteina može se podijeliti na dva procesa: transkripciju i translaciju. Često za samu biosintezu proteina kažemo da se naziva translacija (prevođenje), jer se informacija sadržana u slijedu nukleotida prevodi na drugi jezik, tj. u slijed aminokiselina u proteinu.¹ Takav složeni proces moguć je zahvaljujući koordiniranim međudjelovanjem više od stotinu makromolekula, uključujući mRNA, nekoliko različitih rRNA, tRNA, aminoacil-tRNA-sintetaza te proteinskih kofaktora. Transkripcija je proces u kojem se prepisuje genetička informacija sadržana u nekom genu, koji se nalazi u molekuli DNA, u molekulu mRNA. Ona je ujedno i ključno mjesto regulacije same biosinteze proteina. Translacija je, kao što smo već rekli, prevođenje informacije sadržane u nukleinskoj kiselini u slijed aminokiselina u proteinu. Ovaj proces odvija se na ribosomu gdje ribosom ugrađuje pojedine aminokiseline u rastući polipeptidni lanac, zahvaljujući kodon-antikodon interakcijama aminoacil-tRNA i mRNA.

1.2.1. Transkripcija

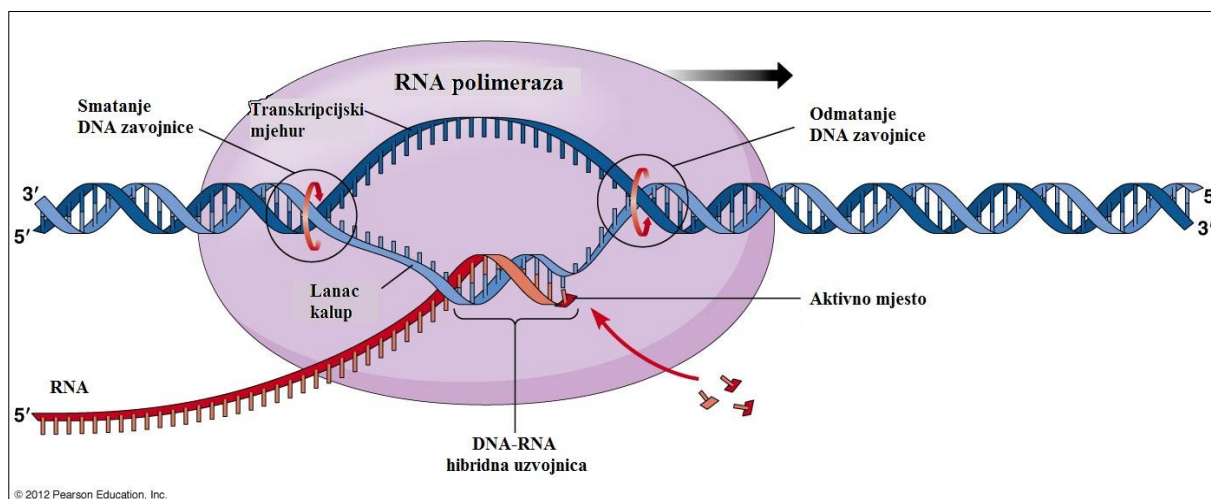
Sinteza RNA, ili transkripcija, proces je u kojem se prepisuje ili transkribira informacija dana u obliku nukleotidnog slijeda u molekuli DNA u informaciju prikazanu slijedom nukleotida u RNA. Temelji sinteze RNA jednaki su kod eukariota i prokariota, no regulacija u eukariota mnogo je složenija. Sintezu RNA katalizira enzim zvan RNA-polimeraza (slika 4.). To je vrlo velik i složen enzim, koji se sastoji od četiri podjedinice: $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Sinteza RNA, baš poput i drugih složenih procesa, odvija se u tri faze: inicijacija, elongacija i terminacija.

Početak transkripcije započinje inicijacijom, odnosno vezanjem srži RNA-polimeraze na promotor. Promotori su nukleotidni sljedovi na DNA koji usmjeravaju RNA-polimerazu na ispravna inicijacijska mjesta za transkripciju. Podjedinica koja je zaslužna za vezanje RNA-polimeraze na promotor jest σ podjedinica. Ona prepoznaje promotorske regije DNA te se otpušta s enzima nakon što lanac rastuće RNA dostigne 9-10 nukleotida. Na taj način srž enzima, $\alpha_2\beta\beta'$, nastavlja procesivnu polimerizaciju te započinje druga faza transkripcije, elongacija. Povezivanjem 3'-OH skupine riboze i α -fosfata nadolazećeg nukleozid-5'-trifosfata (NTP) nastaje fosfodieterska veza odnosno veza između dva nukleotida. U ovoj fazi dolazi

do nastanka tzv. transkripcijskog mjehura (slika 5.), koji sadrži RNA-polimerazu, DNA i rastući lanac RNA. Transkripcijski mjehur kreće se duž kalupa DNA brzinom od oko 50 nukleotida u sekundi. Novosintetizirana RNA stvara hibridnu uzvojniciu s lancem DNA kalupa, koja pri svakom novo dodanom nukleotidu, rotira tako da 3'-kraj RNA ostaje u katalitičkome mjestu.



Slika 4. Tercijarna struktura holoenzima RNA polimeraze iz bakterije *E. coli*, PDB: 4Q7J (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (3))



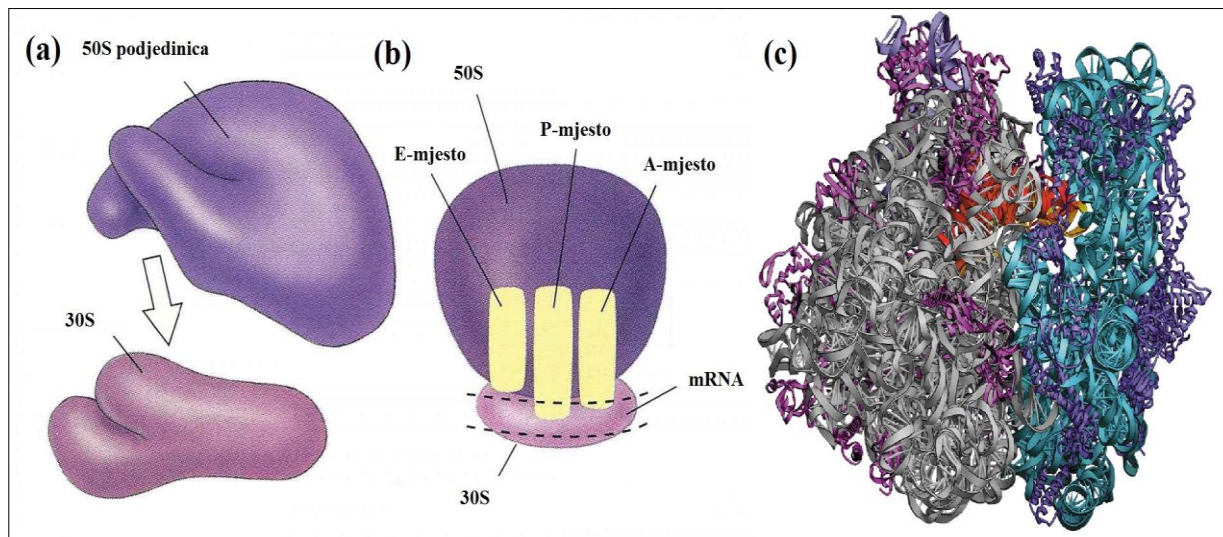
Slika 5. Shematski prikaz transkripcijskog mjehura i katalitičko djelovanje enzima RNA polimeraze. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (4))

Novonastali lanac RNA u sebi sadrži signal za završetak transkripcije s kojim započinje treća faza, terminacija. Najjednostavniji primjer takvog terminalnog signala jest regija bogata s GC parovima baza nakon čega slijedi AT-bogata regija, koje zbog toga tvore strukturu ukosnice. Terminacijom transkripcije obustavlja se stvaranje fosfodiesterskih veza, te dolazi do disocijacije hibrida RNA-DNA nakon čega RNA-polimeraza otpušta novonastalu RNA. U nekim slučajevima, za terminaciju transkripcije potrebno je sudjelovanje dodatnog faktora, tako zvanog proteina ρ (ρ), koji posjeduje ATP-aznu aktivnost. Protein ρ hidrolizira molekule ATP u prisutnosti jednolančane RNA te djeluje kao helikaza. Dakle uloga proteina ρ jest razmatanje RNA-DNA hibrida te na taj način uzrokuje transkripciju. Hidroliza ATP-a ne događa se u prisutnosti dvolančane DNA ili dvolančane RNA. Vežući se tako na novosintetizirani lanac RNA, protein ρ nastoji dosegnuti RNA-polimerazu na transkripcijskom mjehuru.¹ U trenutku kada protein ρ dosegne RNA-polimerazu dolazi do kidanja hibridne uzvojnice RNA-DNA te RNA-polimeraza otpušta novosintetiziranu RNA.

1.2.2. Translacija

Translacija je kao što smo već rekli prevođenje informacije sadržane u mRNA u slijed aminokiselina u proteinu. Cijeli taj složeni proces biosinteze proteina, odnosno translacije, odvija se na ribosomima, golemim kompleksima koji sadrže tri velike molekule RNA (rRNA) i više od 50 proteina. Ribosom je ribonukleoproteinski kompleks koji je sastavljen od male

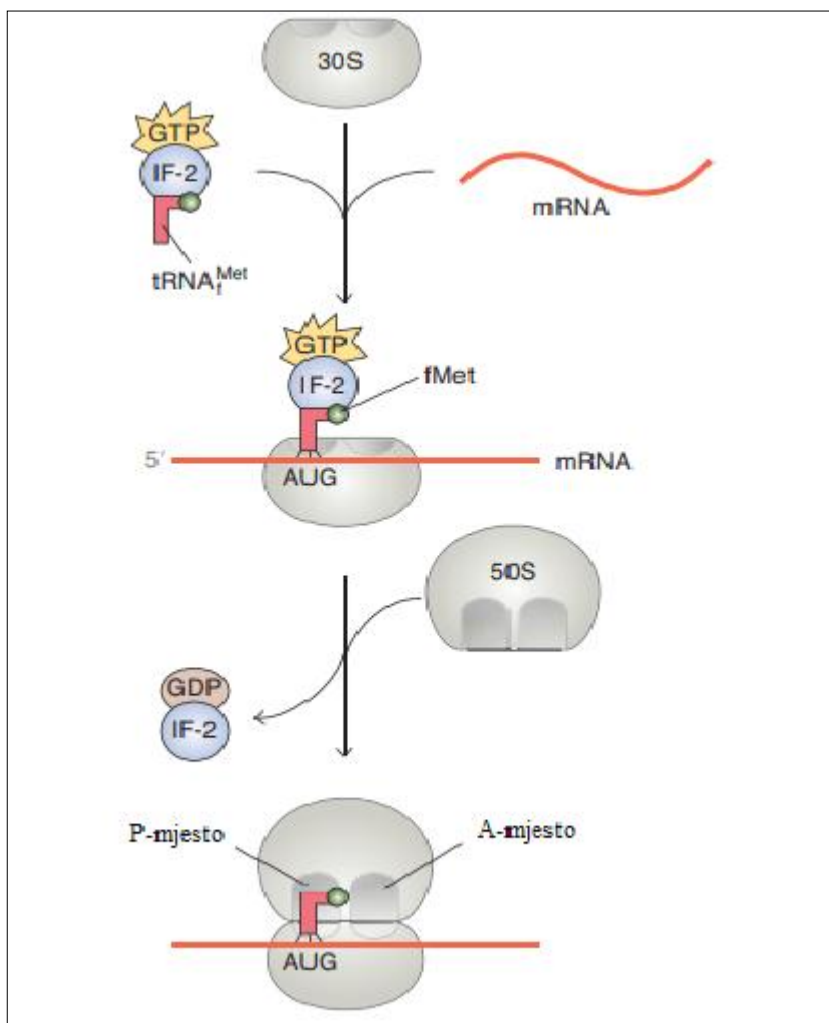
(30S) i velike (50S) podjedinice na koje može disocirati (slika 6., (a), (b)). Podjedinica 30S sadrži oko 20 različitih proteina i molekulu 16S rRNA, dok podjedinica 50S sadrži oko 30 različitih proteina i dvije molekule rRNA, 23S i 5S. Upravo te ribosomske molekule RNA imaju ključnu ulogu u translaciji zajedno sa mnogim proteinskim faktorima. Translacija se baš poput transkripcije odvija u tri koraka: inicijacija, elongacija te terminacija.



Slika 6. Ribosom iz bakterije *Escherichie coli*: (a) Shematski prikaz male 30S i velike 50S podjedinice, (b) Shematski prikaz 70S ribosoma nastalog spajanjem tijekom inicijacije translacije, slika također prikazuje aktivna mjesta formirana na 50S podjedinici nakon spajanja ribosoma u 70S kompleks, (c) terciarna struktura 70S kompleksa, podjedinica obojana sivom bojom predstavlja 50S, dok je 30S plave boje, PDB: 4V5D. (preuzeto i prilagođeno prema Ref. (5) i (6))

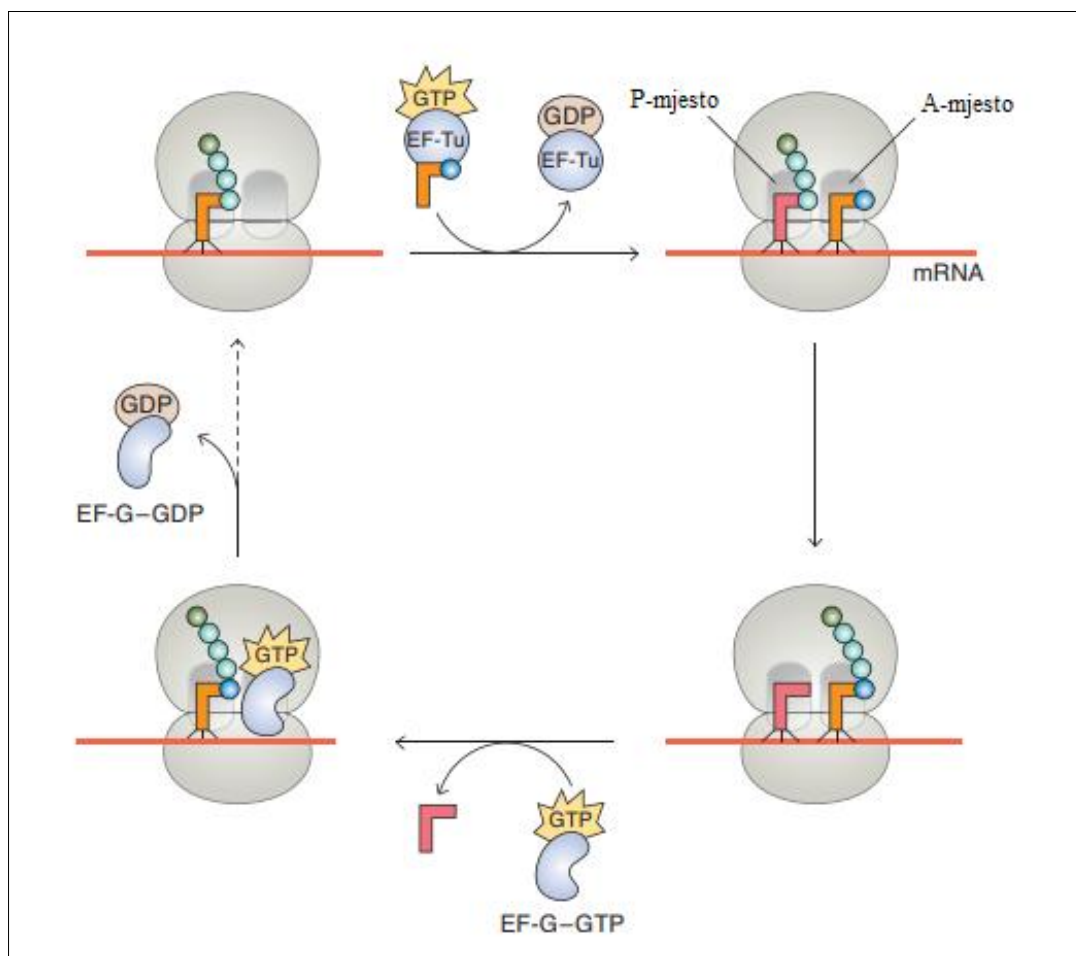
Inicijacija translacije započinje vezanjem mRNA i formilmetionil-tRNA^{fMet} na ribosom pri čemu sudjeluju i inicijacijski proteinski faktori: IF1, IF2 i IF3. Interakcijom 30S podjedinice s mRNA nastaje kompleks na koji se inicijacijska molekula fMet-tRNA^{fMet}, aminoacilirana formilmetioninom, veže na inicijacijski kodon AUG, a podjedinica 50S veže se na podjedinicu 30S te dolazi do stvaranja cijelovitog ribosoma 70S. Tijekom procesa povezivanja dvije podjedinice, dolazi do stvaranja tri vezna mjesta na ribosomu. Ta vezna mjesta nazivaju se A-mjesto (mjesto na koje se veže aminoacilirana tRNA^{fMet}), P-mjesto (peptidno mjesto, odnosno mjesto na koje se veže inicijacijska tRNA) i E-mjesto (tzv. izlazno mjesto). Na slici 6., (b), shematski je prikazana struktura cjelovitog ribosoma 70S s formiranim veznim mjestima. No, kako bi uopće došlo do povezivanja mRNA i fMet-tRNA^{fMet} potrebni su prethodno spomenuti inicijacijski faktori. Ribosomska podjedinica 30S najprije stvara kompleks s IF1 i IF3. IF1 veže se na ribosom u blizini A-mjesta i na taj način

usmjerava inicijacijsku tRNA ($fMet$ -tRNA^{fMet} u P-mjesto). Proteinski faktor IF3, vezanjem na ribosomsku 30S podjedinicu, sprječava njezino preuranjeno spajanje s podjedinicom 50S i stvaranje kompleksa 70S. S druge strane inicijacijski faktor IF2 ima potpuno drugačiju ulogu. To je protein iz porodice G-proteina, koji veže na sebe GTP te se time mijenja njegova konformacija čime raste afinitet vezanja formilmetionil-tRNA^{fMet}. Kompleks IF2-GTP-inicijacijska $fMet$ -tRNA^{fMet} veže se na mRNA, koja se zbog interakcije sekvencije Shine-Dalgarno (purinski bogata regija komplementarna sekvenci na ribosomu) sa 16S rRNA pravilno smješta na ribosom. Zatim nastaje inicijacijski kompleks koji stimulira strukturne promjene na 30S podjedinici čime dolazi do disocijacije proteinskih faktora IF1 i IF2, a hidrolizom GTP-a na IF2 dolazi do otpuštanja IF2 s prethodno formiranog kompleksa (slika 7.). Rezultat svega toga jest nastanak inicijacijskog kompleksa 70S čime započinje druga faza biosinteze proteina, elongacija.



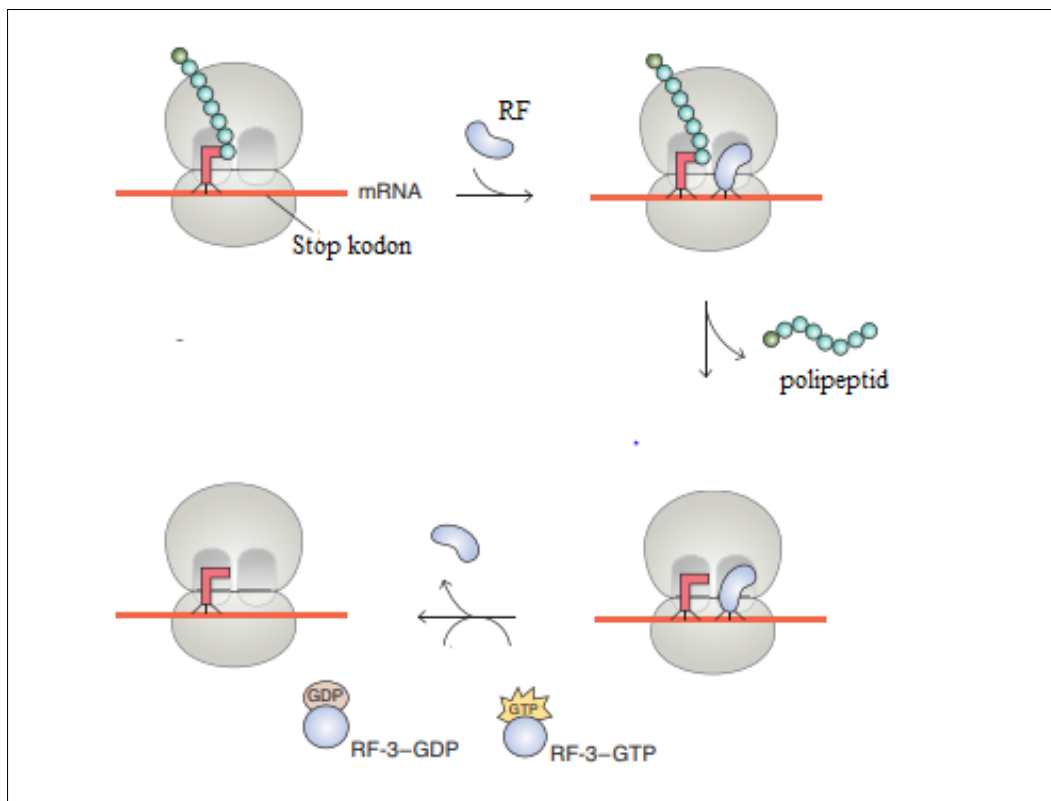
Slika 7. Shematski prikaz inicijacije translacije. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (2)).

Stvaranjem inicijacijskog kompleksa sve je spremno za stvaranje jedne od najvažnijih veza, peptidne veze. Stvaranje peptidne veze termodinamički je spontana reakcija katalizirana s 23S rRNA, koja gradi peptidil-transferazni centar ribosoma. Amino-skupina aminoacil-tRNA veže se u A-mjesto te nukleofilno napada karbonilni C atom peptidil-tRNA u P-mjestu, koja je prilikom nastajanja prve peptidne veze formilmetionin-tRNA^{fMet}. Nastankom peptidne veze, peptidni se lanac vezan za tRNA u A-mjestu translatira u P-mjesto pri čemu se i mRNA translatira tako da se kodon za sljedeću aminokiselinu smješta u A-mjesto. Kada ne bi bilo translacije peptidnog lanca u P-mjesto, proces elongacije, tj. sinteze peptidnog lanca ne bi bio moguć. Proces elongacije potpomognut je proteinskim enzimom zvanim elongacijski faktor G (EF-G), nazvan još i translokazom. No, to nije jedini proteinski kofaktor jer u procesu elongacije sudjeluju još dva važna proteinska faktora. Jedan od njih je protein molekulske mase 43 kDa, a naziva se elongacijski faktor Tu (EF-Tu) te je i on također član porodice G-proteina. Njegova uloga jest prijenos pripadne aminoacil-tRNA sa aminoacil-tRNA-sintetaze, enzima zaslužnog za stvaranje aminoacilirane-tRNA, do A-mjesta na ribosomu. Vezanje GTP-a na EF-Tu omogućava proteinu vezanje aminoacil-tRNA te povezivanje takvog kompleksa s ribosomom. Na slici 8. shematski je prikazana uloga elongacijskog faktora EF-Tu. Nastankom ispravnog kompleksa između EF-Tu-aminoacil-tRNA i ribosoma, GTP vezan na EF-Tu hidrolizira u GDP. Ukoliko antikodon nije ispravno sparen s kodonom, do hidrolize ne dolazi te aminoacil-tRNA ne ostvaruje snažne interakcije s ribosomom pa disocira. Hidrolizom GTP-a dolazi do otpuštanja EF-Tu s ribosoma. Da bi se proces elongacije nastavio, točnije vezanje nove aminoacil-tRNA u A-mjesto na ribosomu, potreban je i drugi elongacijski faktor, EF-Ts. On se veže na EF-Tu i tako potiče disocijaciju GDP-a te se GTP ponovno može vezati na EF-Tu i time se otpušta EF-Ts. Cijeli taj proces nastavlja se sve dok traje elongacijska faza nakon koje slijedi završna faza, terminacija.



Slika 8. Uloga elongacijskih faktora EF-G i EF-Tu u elongacijskoj fazi translacije. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (2))

Biosintezu proteina terminiraju faktori otpuštanja, koji prepoznaju terminacijske (STOP) kodone UAA, UGA i UAG te tako uzrokuju hidrolizu esterske veze između polipeptida i tRNA. Iako mehanizam otpuštanja još nije poznat, pretpostavlja se da faktori otpuštanja, RF-1 i RF-2, aktiviraju molekule vode za nukleofilni napad na estersku vezu i na taj način oslobode polipeptidni lanac koji napušta ribosom kroz tunel formiran na 50S podjedinici ribosoma. Za razliku od njih, RF-3 posjeduje GTP-aznu aktivnost te vežući GTP uzrokuje konformacijske promjene koje potiču disocijaciju ribosoma na podjedinice kako je shematski prikazano na slici 9.

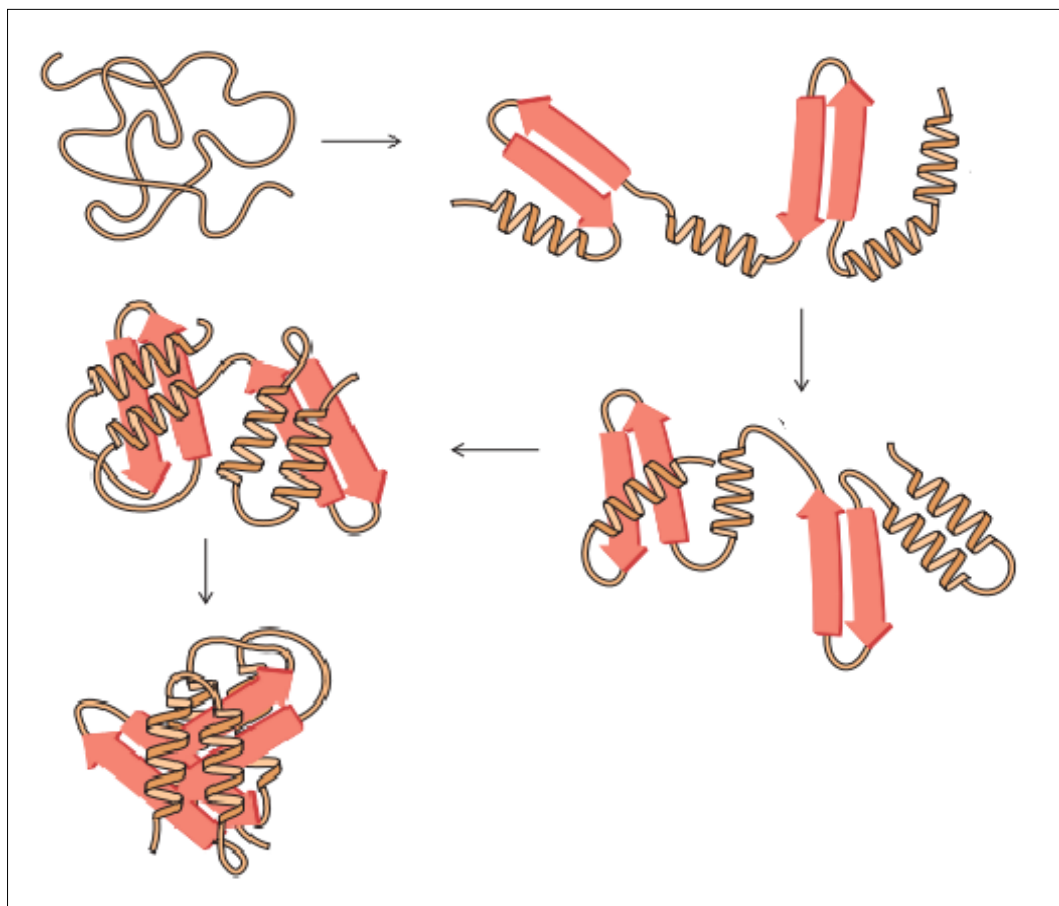


Slika 9. Shematski prikaz terminacije translacije i uloga RF faktora. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (2))

1.3. Smatanje proteina

Biosinteza proteina je kao što smo već rekli proces u kojem nastaje novi protein. Dakle, translacijom završava prijenos genetičke informacije unutar stanice te je slijed nukleotida iz DNA sada preveden u slijed aminokiselina u polipeptidnom lancu. No, novosintetizirani protein biološki je neaktivan sve dok ne poprimi svoju trodimenzionalnu strukturu. Stoga novosintetizirani polipeptid nakon napuštanja ribosoma kreće u novi proces, a to je proces smatanja (slika 10.). Postoji više teorija koje objašnjavaju proces smatanja, a jedna od njih temelji se na hijerarhijskoj raspodijeli. Ta teorija kaže da najprije nastaju sekundarne strukture (α -zavojnice i β -ploče), koje se zatim udružuju u supersekundarne strukture pod utjecajem hidrofobnih i ionskih interakcija. Hidrofobne interakcije dominiraju u procesu smatanja dok ionske interakcije mogu utjecati na formiranje strukture dajući određene elemente specifičnosti tijekom procesa smatanja. Proces smatanja proteina završava nastankom trodimenzionalne strukture cijelog proteina. S druge strane postoji teorija koja kaže da proces

smatanja proteina započinje spontanom procesom tzv. hidrofobnim kolapsom zbog težnje hidrofobnih aminokiselina da se udruže i na taj način smanje izloženost interakciji s vodenim otapalom. Danas se u obzir uzimaju obje teorije s pretpostavkom da je proces smatanja zapravo kombinacija istih.

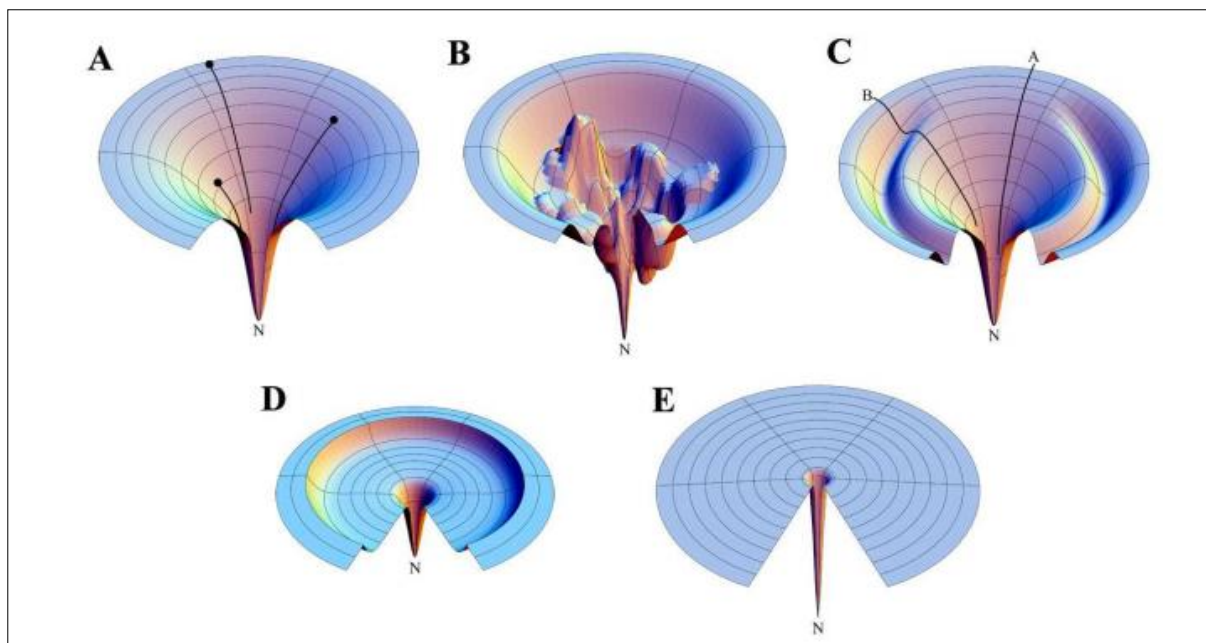


Slika 10. Prikaz smatanja proteina, najprije nastaju sekundarne strukture koje se udružuju u superstrukture. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (2))

1.3.1. Regulacija smatanja proteina

Informacija koja regulira proces smatanja proteina i određuje njegovu tercijarnu strukturu sadržana je u primarnoj strukturi proteina, odnosno slijedu nukleotida gena koji ga kodira. Proces smatanja proteina može biti spontan, no u većini slučajeva nije. Proteini koji posjeduju mogućnost spontanog smatanja većinom su mali i urođeno stabilni. Ostali proteini za pravilno smatanje zahtijevaju pomoć drugih proteina, tzv. molekulskih šaperona. Smatanje proteina može se promatrati kao proces do kojeg dovodi progresivna stabilizacija međuprodukata. Oni zapravo slijede putanju kojom se može doći od razmotanog do smotanog oblika. Putanja ima

mnogo te je to slikovito prikazano lijevkom slobodne energije. Energijska raspodjela ovog procesa može se prikazati poput lijevka. Najširi dio lijeva prikazuje raspon mogućih struktura kod nesmotanog ili denaturiranog proteina. Kako se slobodna energija proteina smanjuje tako se proteini gibaju u užem prostoru s manjim brojem mogućih struktura. Na dnu lijevka nalaziti će se struktura koja odgovara nativnoj strukturi (ili skupini nativnih struktura) smotanog proteina (slika 11.).



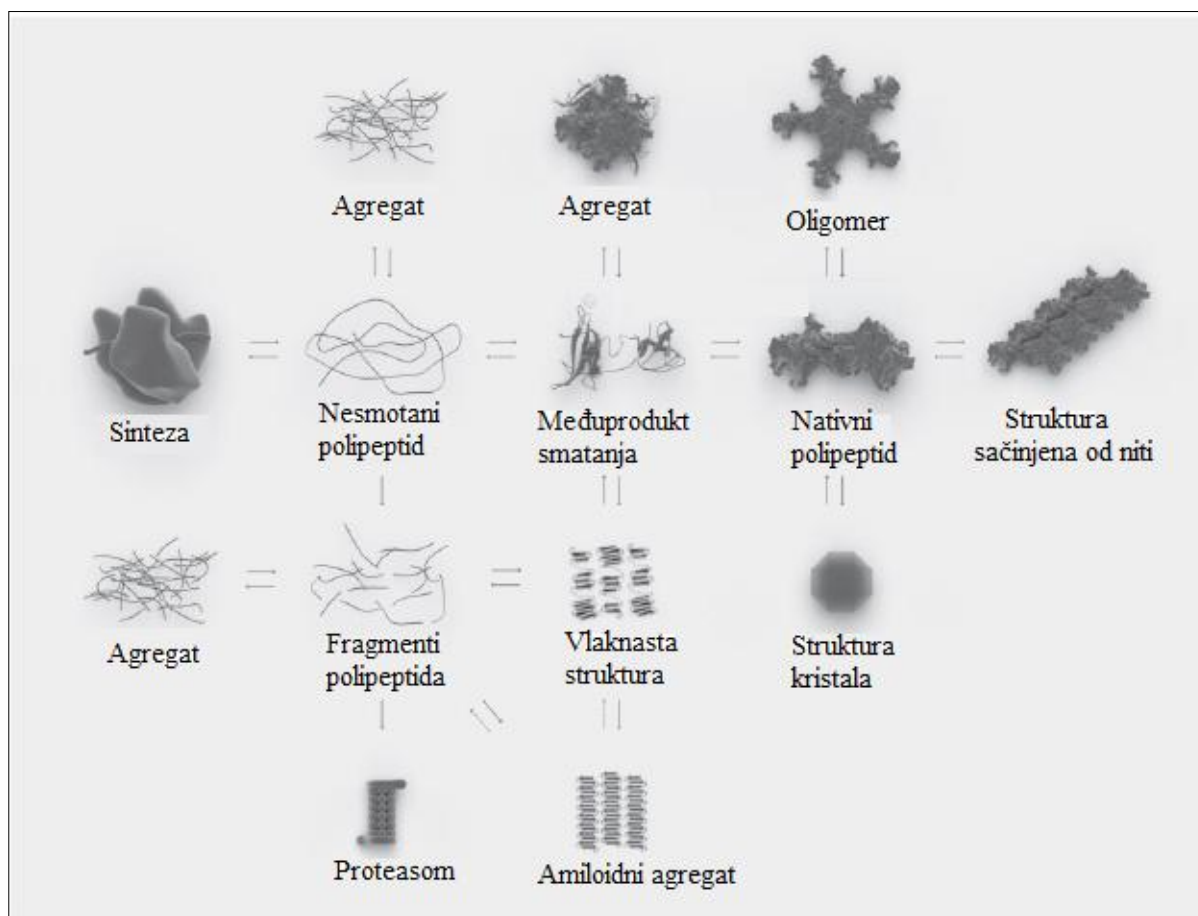
Slika 11. Proces smatanja proteina prikazan termodinamski pomoću lijevka slobodne energije, (A) idealni prikaz, (B) grublji prikaz lijevka s potencijalnim energetske barijerama, (C) suma prikaza pod (A) i (B), (D) prikaz u kojem promjena konformacije oslobađa energetske barijere, (E) prikaz globalnog minimuma, kojeg je gotovo nemoguće pronaći nasumičnim traženjem nativne strukture. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (8)).

Smatanje proteina zapravo je neefikasna stohastička metoda koja često vodi do pogrešnog smatanja čiji rezultat može biti manje aktivan ili inaktivan protein i/ili protein sklon agregaciji. Razlog takvog ishoda jest u tome što su struktura i funkcija proteina čvrsto povezane. Primarna struktura u potpunosti određuje strukturu proteina, a time i njegovu funkciju. Narušavanje strukture može narušiti i funkcija proteina. Npr., inaktivnost proteina često je posljedica pogrešne raspodjele hidrofobnih dijelova polipeptidnog lanca. Također pogrešnom raspodjelom hidrofobnih dijelova polipeptidnog lanca dolazi do nastanka proteina koji je kao takav skloniji agregaciji. Stoga tako krivo smotan protein može stvoriti agregate koji mogu imati smrtonosan učinak na stanicu. Iz tog razloga stanice su razvile sofisticirane mehanizme u kojima se "bore" s krivo smotanim proteinima.

1.4. Agregacija proteina

Agregacija proteina jest posljedica pogrešnog smatanja pod utjecajem mutacije, pogreške u biosintezi proteina, nepravilne posttranslacijske modifikacije ili djelovanja okoline (stres) u kojoj se protein nalazi. Pogrešno smatanje i agregacija proteina često dovode do smrti stanice. Agregacija jednog proteina u stanici može potaknuti agregacije ostalih proteina što zapravo dovodi do propadanja stanice, a time i do smrti. Proučavajući bakterijske stanice otkriveno je kako se bakterija nosi s toksičnim utjecajem agregacije.

Proteinski agregati često su opisivani kao vrlo dobro strukturirani amiloidi ili kao golemi, amorfni agregati.⁹ No, danas je takva podjela nezgodna jer je otkriveno da proteini mogu graditi cijeli spektar strukturno različitih agregata čija morfologija ovisi o fizikalno-kemijskim uvjetima u stanici, kao što je prikazano na slici 12. Bez obzira na strukturu, većina agregata ima tendenciju biti netopljiva i metabolički stabilna u stanici.⁹ Također, jedna od spoznaja, koja je dovela do boljeg razumijevanja agregacije jest činjenica da je jedan element sekundarne strukture gotovo uvijek uključen u izgradnju agregata, a to je β -ploča. Iz tog razloga se agregacija koja u sebi sadrži β -ploče naziva β -agregacija. Danas je prihvaćena i činjenica da je u nastanku β -agregacije prisutan dio proteina koji je sklon agregaciji, nazvan **APRs** iz engleskog *aggregation-prone polypeptide stretches*, te je taj mehanizam nastajanja agregata u stanici najučestaliji. Taj dio proteina skriven je u unutrašnjosti proteina te ako se izloži na površinu proteina dolazi do β -agregacije.



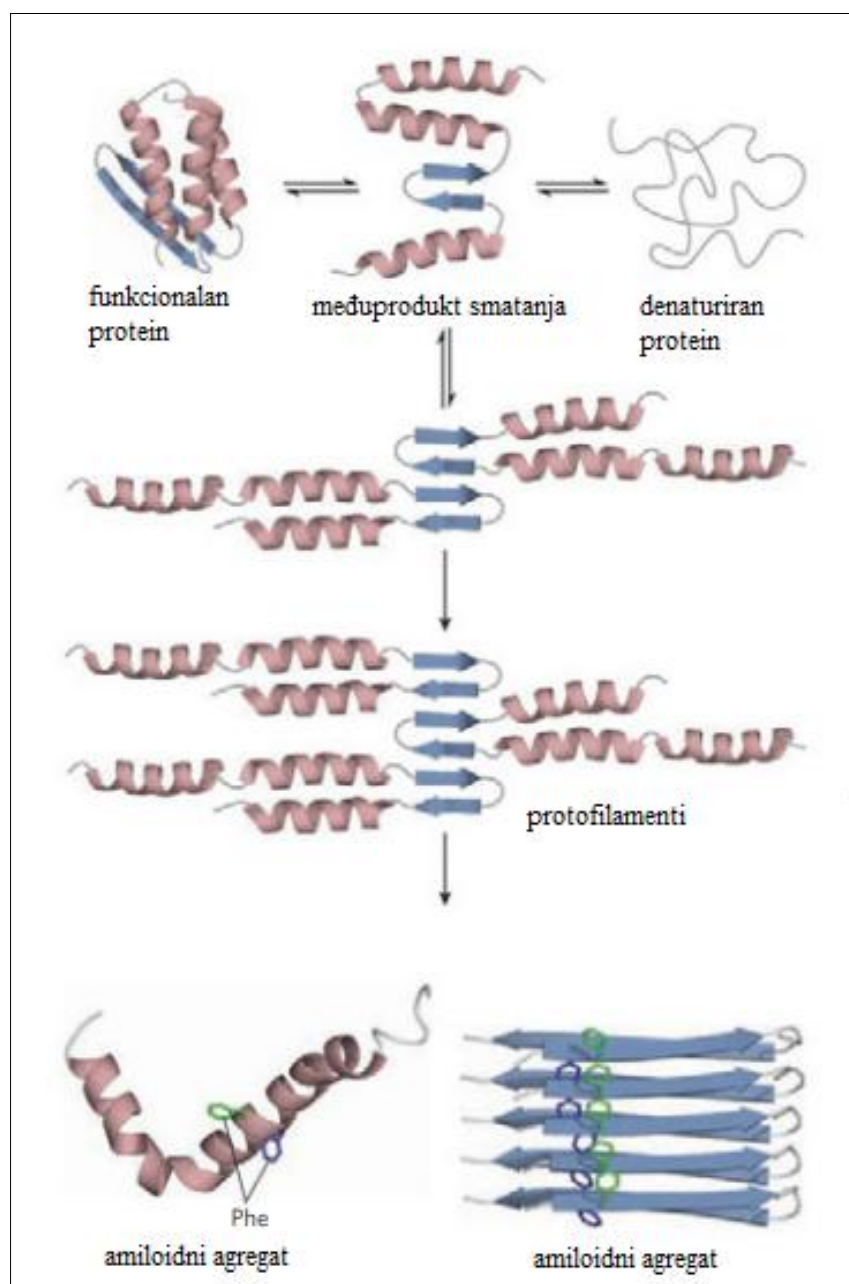
Slika 12. Shematski prikaz nekih od mogućih struktura polipeptidnih agregata. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (9))

1.4.1. Nastanak agregata

Proces smatanja proteina je, kao što je već objašnjeno, od iznimne važnosti za proizvodnju funkcionalnih proteina. Ako se prisjetimo što je primarna struktura proteina postaje jasno kako je upravo informacija za stvaranje tercijarne strukture sadržana u primarnoj. No, često informacija može pogriješiti, odnosno protein se može pogrešno smotati pri čemu nastaju agregati. Točnije, površinsko izlaganje pogrešnih dijelova polipeptidnog lanca dovodi do pogrešne trodimenzionalne strukture koja kao takva može dovesti do stvaranja agregata bilo izlaganjem hidrofobnih dijelova koji se međusobno lijepe ili **APRs** sljedova koji se mogu smatati u uredene beta strukture koje stvaraju uredene intermolekulske beta strukture (osnovice agregata). Ranije je spomenut peptidni slijed koji sudjeluje u stvaranju β -agregata, a to je **APRs**. Nativni protein, globularne strukture, zaštićen je od agregacije sve dok se **APRs**

nalazi u srži proteina. No, u trenutku kada se **APRs** izloži okidaču agregacije, protein gubi svoju sigurnost te može nastati agregacija.⁹ Spomenuti okidač agregacije je zapravo nukleacija β -ploča, odnosno povezivanje β -ploča vodikovim vezama. Takvo povezivanje je termodinamički stabilno te se dugo vremena smatralo da upravo to određuje trenutak agregacije. Daljnjim istraživanjima otkriveno je da u danim uvjetima na agregaciju također utječu i bočni ogranci aminokiselinskih ostataka. Drugim riječima, agregacija proteina određena je utjecajem **APRs**-a jednako koliko i primarnom strukturom.

Amiloidni agregati su agregati koji nastaju postupno pod utjecajem intrinzičnih proteinskih parametara poput hidrofobnog efekta, elektrostatskih interakcija, sklonosti formiranju β -ploča te vanjskog utjecaja kao što su temperatura, pH, ionska jakost i koncentracija proteina. Kada nastane pogrešno smotani protein, on se zbog nestabilnosti u vodenom mediju udružuje s drugim molekulama jer ga te interakcije stabiliziraju. Daljnjim rastom takvog agregata nastaju protofilamenti, prekursori amiloidnih agregata. Amiloidni agregati sačinjeni su od više protofilamenata međusobno obavijenih jedan oko drugoga u strukturu nalik užeta (slika 13.). Većina amiloidnih agregata netopljiva je u vodi te posjeduje karakteristično svojstvo bojanja s Kongo crvenom bojom i fluorescentnom tioflavin-T bojom.



Slika 13. Shematski prikaz nastanka amiloidnih agregata. (Preuzeto i Prilagođeno prema Ref. (7))

Suprotno amiloidnim agregatima, amorfni agregati nemaju uređenu strukturu. Oni nastaju gubitkom funkcije određenog proteina. Proučavanjem agregacije proteina u uvjetima *in vitro* ustanovljeno je da gotovo svi proteini mogu tvoriti amorfne agregate ukoliko je njihova koncentracija dovoljno visoka. No, isto tako ustanovljeno je da samo određeni proteini u istim uvjetima stvaraju uređene strukture, amiloidne agregate.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

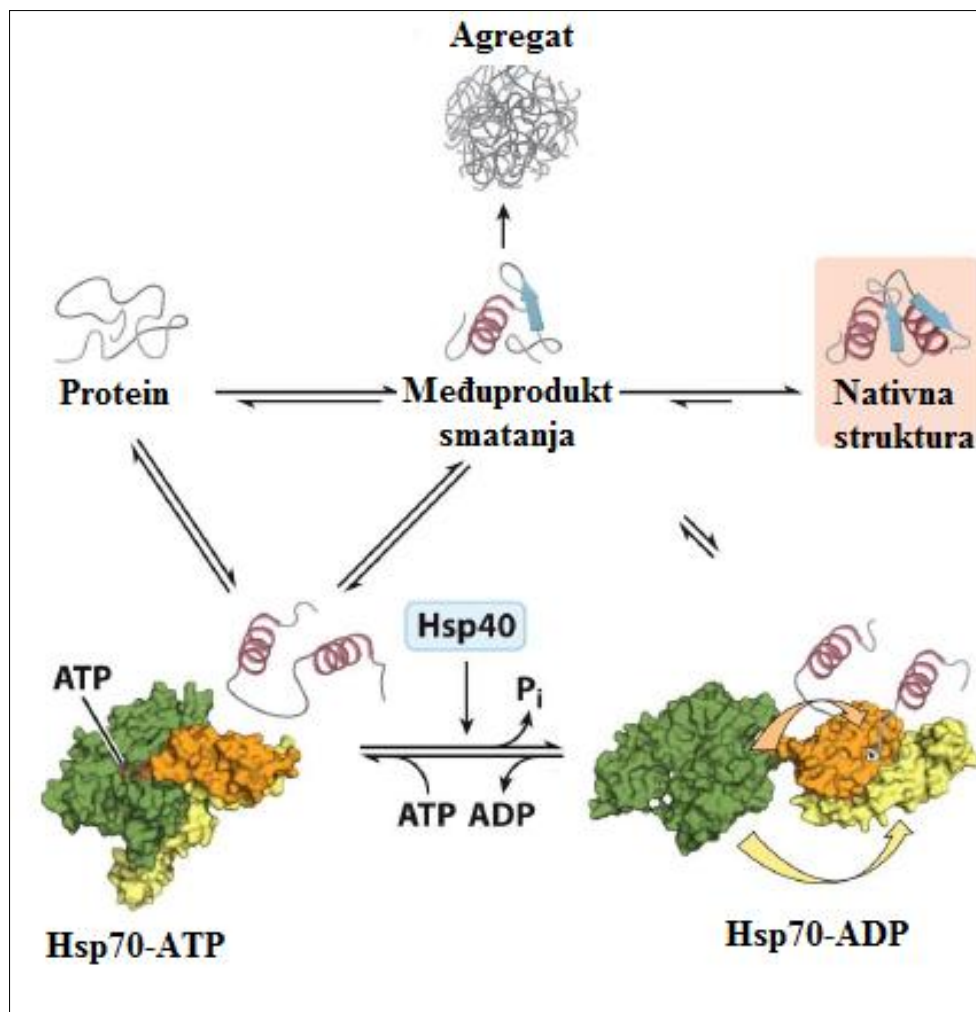
2.1. Dijelovi staničnog aparata za kontrolu kvalitete proteina

Glavni principi smatanja proteina gotovo su jednaki u svim organizmima. No, bez obzira na to, bakterijske stanice razlikuju se od eukariotskih u regulaciji smatanja. Kao primjer možemo navesti činjenicu da je sinteza polipeptidnog lanca kod bakterija efikasnija, jer tijekom sinteze proteina kod bakterija postiže se brzina ugradnje i do 20 aminokiselina po sekundi, dok je kod eukariotskih stanica brzina ugradnje 4 aminokiseline po sekundi. Upravo zbog brze sinteze proteina kod bakterija, stanica ne može uvijek spontano proizvesti funkcionalne proteina. Bakterijske stanice razvile su sofisticirane metode tijekom kojih drugi proteini usmjeravaju polipeptidni lanac do nativne konformacije. Iste metode koriste i eukarioti no regulacija tih metoda znatno je složenija.

2.1.1. Šaperoni

Molekularni šaperoni su proteini koji olakšavaju smatanje drugih proteina. Pojam "šaperon" upotrijebljen je prvi puta prilikom opisivanja proteina koji je bio potreban za stvaranje nukleosoma iz histona i DNA. Taj protein veže se na histone i posreduje njihovo udruživanje u nukleosome, ali se sam ne ugrađuje u konačnu strukturu nukleosoma. Kasnije je objašnjeno da šaperoni djeluju upravo takvim mehanizmom, kao medijatori koji olakšavaju udruživanje, a da se pri tome ne ugrađuju u kompleks. Danas se šaperonima smatraju svi proteini koji posreduju u mnogim različitim procesima udruživanja, a posebice u smatanju proteina. Valja napomenuti da šaperoni ne posjeduju dodatne informacije potrebne za smatanje proteina. Dakle, šaperoni potpomažu u procesu smatanja proteina bilo u procesu smatanja *de novo* ili u procesu kada stres izazove narušavanje strukture proteina. Uloga šaperona u procesu smatanja proteina *de novo* jest vezanje na novosintetizirani polipeptidni lanac tijekom sinteze istog. Na taj način šaperoni pasivno sprječavaju agregaciju, pružajući polipeptidu okruženje u kojem ni izlaganje hidrofobnih regija na površinu neće dovesti do agregacije jer neće biti drugih proteina da se stvori agregat.¹⁰ S druge strane šaperoni aktivno sudjeluju u procesu smatanja

proteina kada stres izazove narušavanje strukture. Oni tada potpomažu u odmatanju krivo smotanih proteina te ponovnom smatanju i/ili stabilizaciji nesmotanih ili djelomično smotanih dijelova polipeptidnog lanca. Kod proteina koji generalno imaju problema sa smatanjem, izostanak šaperona doveo bi do nestabilnog polipeptidnog lanca sklonog agregaciji. Na slici 14. shematski je prikazan put smatanja proteina uz pomoć šaperona.



Slika 14. Proces smatanja proteina uz pomoć šaperona. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref.

(7))

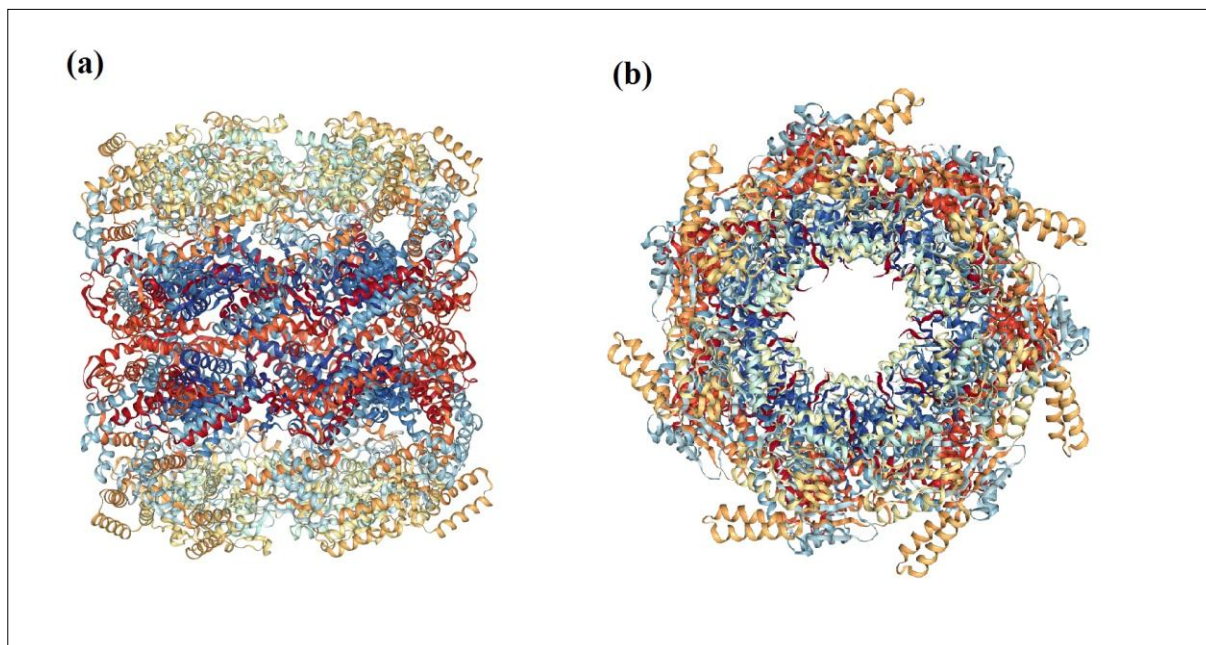
Danas poznajemo velik broj različitih šaperona koji djeluju različitim mehanizmima. Zasigurno najzanimljiviji šaperoni jesu oni koji se vežu na tek sintetizirani polipeptid koji se još nalazi na ribosomu, čiji ćemo mehanizam obraditi malo kasnije u jednom od sljedećih poglavlja. Nadalje, također zanimljiva skupina proteina za koje se danas zna da djeluju poput šaperona, nazivaju se proteinima toplinskog stresa. Ime su dobili zbog toga što su otkiveni upravo u stanici nakon što je stanica bila izložena povišenoj temperaturi. Dakle, to su proteini

koji se eksprimiraju u stanicama koje su bile izložene povišenim temperaturama ili drugim oblicima stresa iz okoline. Uloga ovih proteina jest stabilizacija i olakšavanje smatanja prethodno denaturiranih/ili djelomično denaturiranih proteina kao posljedica povišenja temperature. No, ovi molekularni šaperoni jednako su važni i prilikom normalnih uvjeta u stanici zbog toga što oni omogućavaju i ispravno smatanje nekih novosintetiziranih proteina. Molekulske šaperone možemo podijeliti u različite porodice na temelju njihove molekulske mase. Tako na primjer postoji porodica Hsp70 (u *E. coli*), Hsp40 (u *E. coli*), Hsp90 (u *E. coli*) i mali protein Hsps (u *E. coli*).¹¹ U ovu podijelu nije uključen jedan od zanimljivih šaperona otkiven u *E. coli*, a to je SecB. Iako, nije direkto uključen u proces smatanja proteina *de novo*, njegova uloga u održavanju homeostaze je iznimno važna. Naime, nakon translacije mnogi proteini bivaju translocirani u druge stanične odjeljke putem membrane. Proteini moraju biti u nesmotanom obliku kako bi prošli kroz prenositelj koji se nalazi u membrani. SecB omogućava translokaciju proteina na sljedeći način. SecB je tetramerne strukture što mu omogućava da oko sebe namota nesmotani polipeptidni lanac. Na taj način SecB održava polipeptid u nesmotanom stanju. Nakon toga SecB prenosi takav polipeptid do SecA koji uz pomoć ATP-a i SecY-a translocira željeni polipeptid kroz unutrašnju membranu. Ovaj primjer šaperona jedan je od rijetkih koji pomažu u translociranju proteina kroz membrane. DnaK i DnaJ šaperoni su važni šaperoni temperaturnog stresa te će detaljnije biti obrađeni u nastavku ovog rada.

2.1.2. Šaperonini

Šaperonini su molekularni šaperoni koji aktivno sudjeluju u procesu smatanja proteina. Sačinjeni su od dva prstena, koja tako spojena u središtu čine centralnu šupljinu u koju se smješta polipeptidni lanac. Šaperonini posjeduju ATP-aznu aktivnost što im omogućava da zarobe supstrat (polipeptid) u svoju centralnu šupljinu čime proteinu omogućavaju izoliranu sredinu za pravilno smatanje. Načelno su podijeljeni u dvije skupine, koje se nazivaju grupa I i grupa II. Grupu I sačinjavaju šaperonini nađeni u bakterijskim stanicama te u organelima eukariotskih stanica dobivenih endosimbiozom.¹² Predstavnik grupe I jest protein GroEL, čiji ćemo mehanizam djelovanja objasniti malo kasnije. Što se tiče strukture, GroEL je izgrađen od dva prstena od kojih se svaki sastoji od sedam podjedinica. Konformacijske promijene koje se događaju na GroEL-u tijekom vezanja ATP-a uzrokuju zamjenu hidrofilnih i

hidrofobnih dijelova takvog oligomernog proteina, čime unutrašnjost postaje hidrofilna što pogoduje smatanju supstrata. Slika 15. prikazuje tercijarnu strukturu šaperonina GroEL. Na slici je vidljiva šupljina što je stvaraju dva prstena. Za razliku od grupe I, grupu II čine šaperonini koji se nalaze isključivo u eukariotskim stanicama i stanicama arheja.



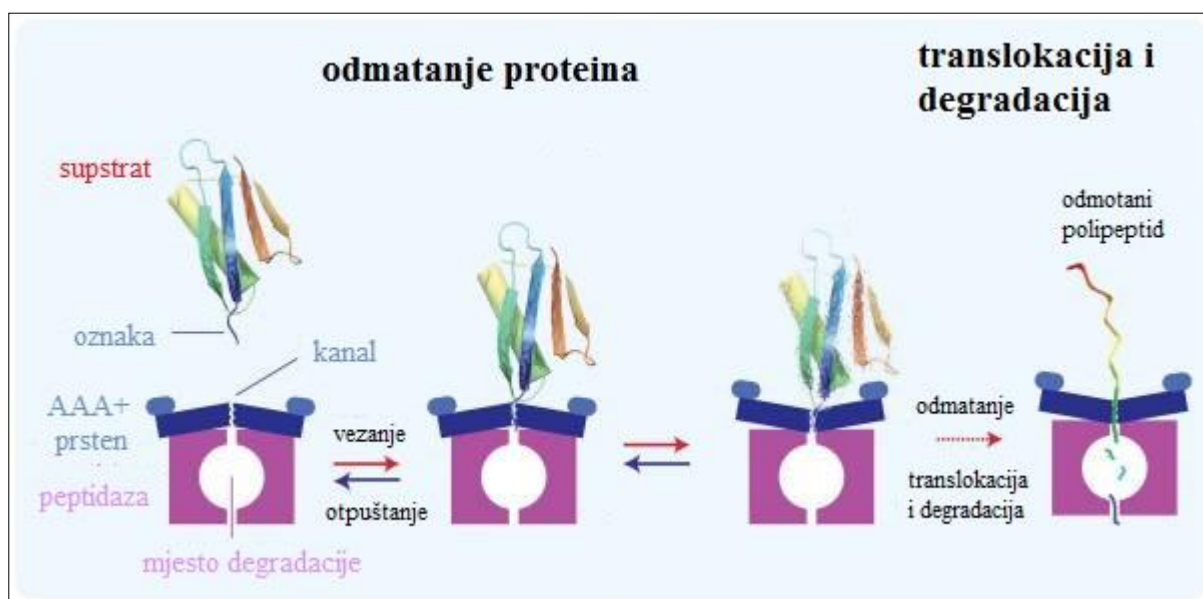
Slika 15. Kvaterna struktura šaperonina GroEL, bez uključenog kofaktora šaperonina GroES, iz bakterije *E. coli*, (a) okomiti prikaz tercijarne strukture, (b) prikaz centralne šupljine na koju se s jedne strane veže GroES i tako zatvara šupljinu PDB: 1XCK, (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (13))

2.1.3. Proteaze

Proteaze su enzimi koji kataliziraju razgradnju proteina, odnosno proteolizu. Postoji velik broj različitih proteaza podijeljenih u skupine prema načinu djelovanja, odnosno katalitičkom mehanizmu. Usprkos takvoj podjeli svim proteazama zajedničko svojstvo je da hidrolizom peptidne veze razgrađuju polipeptidne lance. Svaki organizam sadrži velik broj proteaza zbog toga što one sudjeluju u velikom broju reakcija, od najjednostavnijih poput razgradnje unesene hrane, pa sve do složenih procesa regulacija određenih kaskada.

Bakterije posjeduju proteaze koje su ključne u regulaciji kontrole kvalitete proteina. Jedna od takvih proteaza od iznimne je važnosti, a to je AAA⁺ proteaza. AAA⁺ proteaza jest enzim koji proteolitičkim mehanizmima razgrađuje specifične proteine koristeći pritom energiju dobivenu hidrolizom ATP-a. Mehanizam djelovanja AAA⁺ proteaze istraživan je na

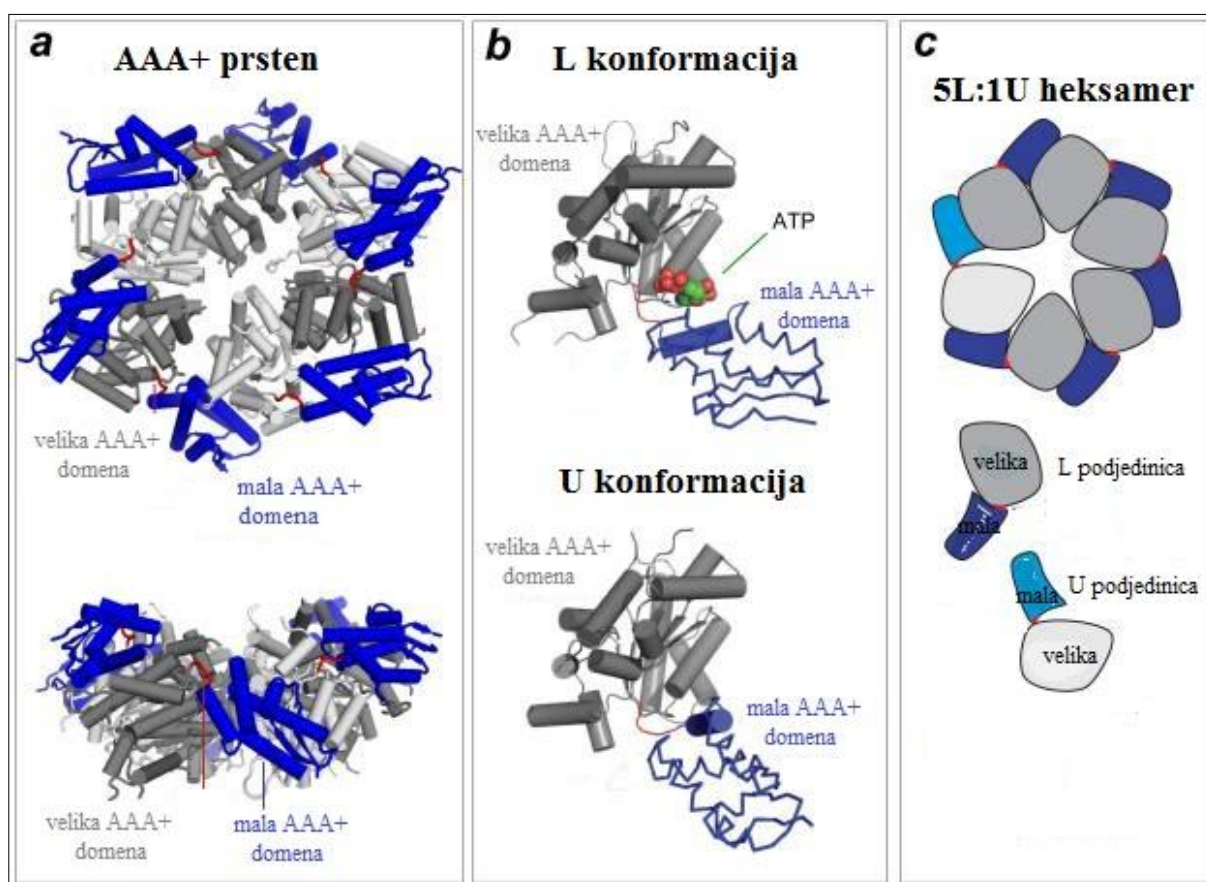
primjeru ClpXP proteaze u *E. coli*. ClpXP proteaza sastoji se od ClpP (peptidaze) i ClpX (mjesto gdje dolazi do odmatanja proteina). Svaka podjedinica ClpX-a sadrži veliku i malu AAA+ domenu kojih je ukupno šest te na taj način zatvaraju šesteročlani prsten s kanalom, koji na sebe veže protein kojeg je potrebno razgraditi. Struktura ClpP-a razlikuje se od strukture ClpX-a upravo zbog toga što ClpP posjeduje proteolitičku aktivnost. ClpP se sastoji od dva heptamerna prstena koja grade šupljinu u kojoj se nalazi hidrolitičko aktivno mjesto. ClpX prsten veže se na ClpP, formirajući pritom kompleks u kojem je ClpP vezan na kanal kroz koji se protein translocira (slika 16.).



Slika 16. Shematski prikaz prepoznavanja, vezanja i degradacije supstrata. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (14))

Mehanizam samog djelovanja ClpXP proteaze sličan je mehanizmu djelovanja ostalih proteaza kod bakterija. ClpX "prepoznaje" oštećene proteine koji na sebi nose specifičnu oznaku. Specifičnost te oznake može ovisiti o sekvencama na proteinu ili o ubikvitiranju, no naravno sama specifičnost regulirana je posttranslacijskim modifikacijama, smatanjem i/ili odmatanjem proteina itd. Kada ClpX prepozna i veže protein na sebe dolazi do određenih konformacijskih promjena koje uzrokuju translokaciju željenog proteina do domene zadužene za proteolizu. Do translokacije dolazi zahvaljujući kružnom procesu vezanja ATP-a i njegove hidrolize. Naime, zbog mogućnosti različitih orijentacija malih i velikih AAA+ domena dolazi do generiranja podjedinica s L konformacijama. Takva konformacija posjeduje vezni džep za nukleotid. Druga konformacija do koje dolazi zbog orijentacije malih i velikih AAA+

domena jest U konformacija koja ne posjeduje vezno mjesto za nukleotid. Tako generirane podjedinice organiziraju se u pseudosimetrijskom slijedu LLULL (slika 17.). Dinamički prijelaz između L i U konformacije dozvoljava hidrolizu ATP-a i kontrolira istu kada dođe do neispravnog otpuštanja ADP-a. Vezanje ATP-a izaziva konformacijske promjene koje dovode do hidrolize ATP-a i otpuštanja ADP-a i fosfata te na taj način generiraju promjene u konformacijama sljedećih podjedinica u prstenu, koje potiču translokaciju proteina u proteolitičku domenu. ClpP peptidaza razgrađuje proteine cijepajući peptidne veze na peptide dužine 5-15 aminokiselina. Stanica se na ovaj način "bori" s oštećenim i/ili nepotrebnim proteinima.



Slika 17. Struktura ClpX prstena, (a) prikaz AAA+ prstena gdje je sivom bojom naznačena velika AAA+ domena, a plavom mala AAA+ domena, (b) prikaz L i U konformacija te mjesta vezanja ATP-a između dvaju domena, (c) shematski prikaz šestoročanog prstena različitih konformacija. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (14))

2.2. Stanični mehanizmi očuvanja homeostaze proteina

2.2.1. Stanični odgovor na agregaciju

Agregacija proteina nerijetko može dovesti do smrti stanice uslijed gubitka funkcije brojnih esencijalnih proteina. Upravo iz tog razloga agregacija proteina stanici predstavlja veliki izazov. U slučajevima kada stanica i uspije odstraniti toksične agregate, može doći do gubitka određenih funkcija što može dovesti do trajnog oštećenja stanica. Bakterije su evolucijom razvile različite strategije kako bi izbjegle štetan utjecaj akumuliranja proteinskih agregata. Volumen citosola *Escherichie coli* iznosi $0,67 \mu\text{m}^3$, taj volumen je deset puta veći od volumena periplazmatskog prostora.⁹ U citosolu se nalazi visoka koncentracija makromolekula zbog čega može doći do spontane agregacije proteina koji su manje zastupljeni u stanici. Iz tog razloga u citosolu se nalazi velik broj proteina koji kontroliraju procese smatanja i pomažu u uklanjanju pogrešno smotanih proteina. Ti pomoćni proteini ranije su opisani kao šaperoni. Određivanjem sustava koji kontrolira kvalitetu smatanja proteina i održava stanicu na životu definirana je homeostaza proteina, odnosno proteostaza. Homeostaza proteina opisana je kao stanje stanice u kojem je proteom (skup svih proteina i koje organizam proizvodi tijekom života) stabilan i funkcionalan. Važno je napomenuti da tijekom homeostaze proteina postoji ravnoteža između sinteze, smatanja, transportiranja, agregacije i degradacije (razgradnje) proteina. Molekule šaperona i proteaza zajedno tvore sofisticirani sustav za kontrolu kvalitete proteina u stanici.¹⁵ To je iznimno kompleksan sustav povezan s mnogim drugim biološki važnim putevima poput sinteze i razgradnje proteina. Nedavna istraživanja pokazala su da na genetskoj razini postoji povezanost između koncentracije proteina u stanici i njegove topljivosti. Točnije, proteini koji posjeduju nižu tendenciju za stvaranje agregata, imaju visoku razinu ekspresije gena. S druge strane dokazano je da geni koji kodiraju proteine sklonije agregaciji, podliježu strožoj regulaciji tijekom transkripcije i translacije nego geni koji kodiraju proteine smanjene tendencije stvaranja agregata. Također je ustanovljeno da stanica posjeduje tzv. "vratare" koji smanjuju mogućnost izlaganja **APRs**-a kod krivo smotanih proteina, tj. proteina kod kojih su hidrofilne aminokiseline izložene na površini umjesto u unutrašnjosti proteina. Ti "vratari" zapravo sadrže nabijene aminokiselinske ostatke poput arginina, lizina, aspartata, glutamata i prolina.

Prethodno navedene metode u normalnim uvjetima u bakterijskoj stanici smanjuju mogućnost stvaranja agregata. No, usprkos tim metodama bakterija je svakodnevno izložena

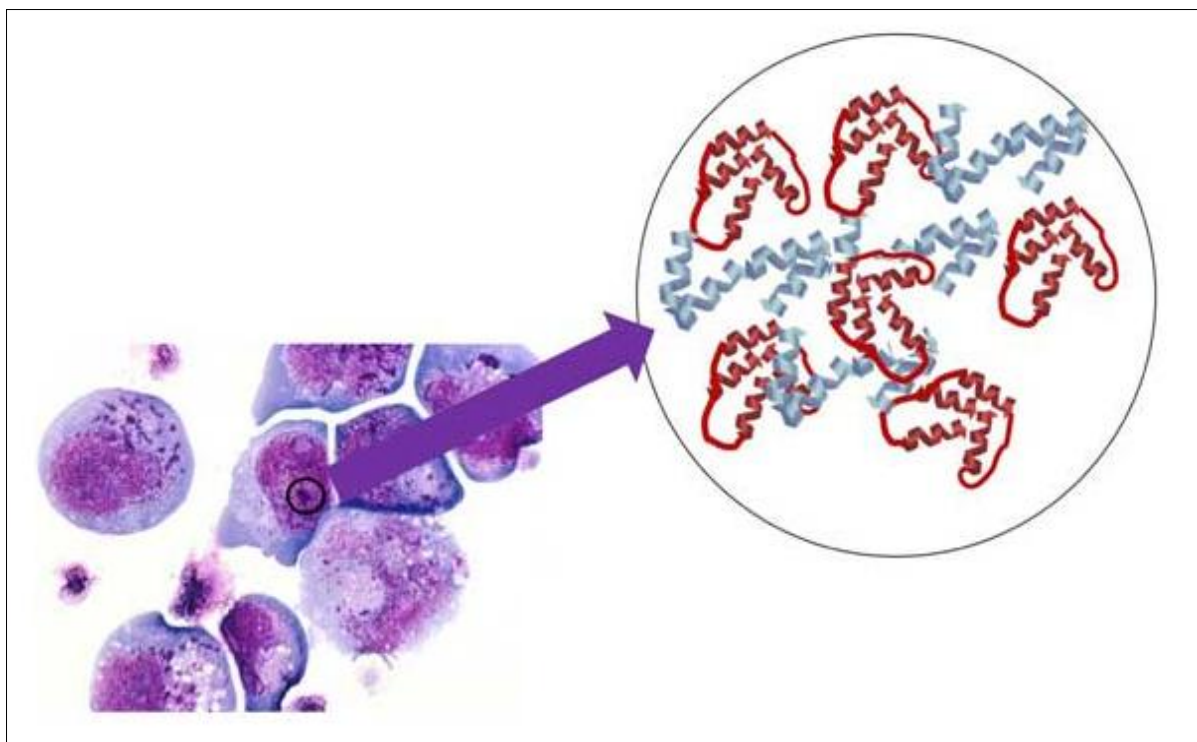
vanjskim utjecajima koji mogu dovesti do nakupljanja krivo smotanih ili krivo translahiranih proteina te posljedično do agregacije. U takvim slučajevima stanica se pokušava adaptirati. Adaptacija znači prilagodba sustava za kontrolu kvalitete na ozbiljnost štete izazvane u proteinu. U takvim slučajevima postoje tri načina rješavanja problema:

- 1.) ponovno smatanje krivo smotanih proteina sklonih agregaciji
- 2.) degradacija (razgradnja) inaktivnih proteina i agregata
- 3.) transport proteina u određeni odjeljak.

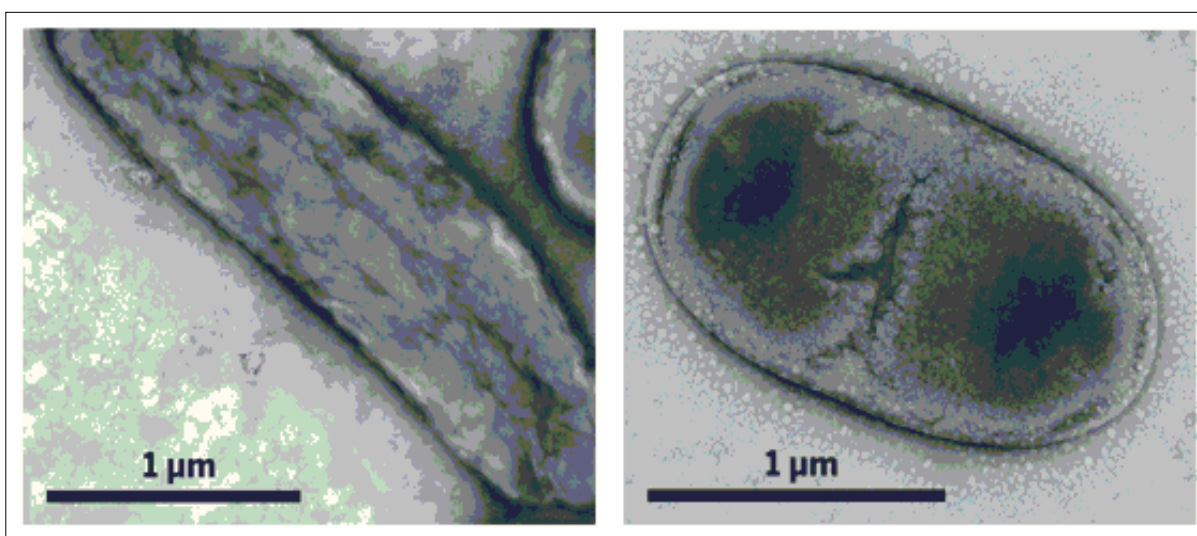
U nekim slučajevima dolazi do inkluzije krivo smotanih proteina, što stanici omogućava da izađe na kraj s preopterećenošću oštećenih ili krivo smotanih proteina. U bakterijskim stanicama je otkriveno da se agregati i krivo smotani proteini pomiču na krajeve stanica stvarajući tako velike netopljive agregate, zvane IBs agregati, što potječe od engleskog *inclusion bodies*.⁹

Inkluzijska tijela (IBs) predstavlja inkluziju velikog broja manjih agregata. Gotovo svi IBs-i posjeduju sličnu strukturu. Vrlo su kondenzirani, netopljivi te se zbog toga mogu nalaziti u citoplazmi, ali i u periplazmatskom prostoru bakterije. Detaljna istraživanja pokazala su da su bakterijski IBs sastavljeni od uređenih struktura poput amiloidnih agregata. Predložena struktura kaže da su IBs formirani od β -ploča međusobno povezanih vodikovim vezama. Na slici 18. shematski je prikazana stanica u kojoj se nalaze inkluzijski agregati. Generalno se smatra da postoje tri uvjeta koja moraju biti zadovoljena kako bi određena struktura agregata mogla bit proglašena amiloidnim agregatom. IB zadovoljava dva od tri uvjeta. Dakle, IB posjeduje mogućnost vezanja tioflavin-T i Kongo crvenu boju pri čemu nastaje obojan agregat što sugerira da se sastoji od β -ploča. Uspoređivanjem amiloidnog agregata i IB-a ustanovljeno je slično ponašanje prilikom formiranja struktura. Najprije se formiraju oligomeri bogati β -pločama, koji služe kao jezgre nukleacije za daljnji rast agregata.

IBs u bakterijskoj stanici nastaju kao posljedica nagomilavanja velikog broja manjih agregata i krivo smotanih proteina (slika 19.). Formiranje IBs-a, koji posjeduju mogućnost asimetrične diobe, iznimno je zanimljivo zbog toga što predstavlja potencijalni mehanizam u borbi protiv agregacije. Sekvenciranjem je otkriveno da se agregacija može prenositi na potomstvo tijekom diobe stanica, zbog toga što dolazi do asimetrične diobe stanica. Agregati se akumuliraju kod starog pola pa ih nasljeđuje samo stanica majke dok je stanica kćeri oslobođena od agregata. IBs uzrokuju starenje i propadanje stanice te zbog toga novonastala stanica uklanja svaku opasnost.



Slika 18. Shematski prikaz netopljivog inkluzijskog agregata (IBs). (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (16))

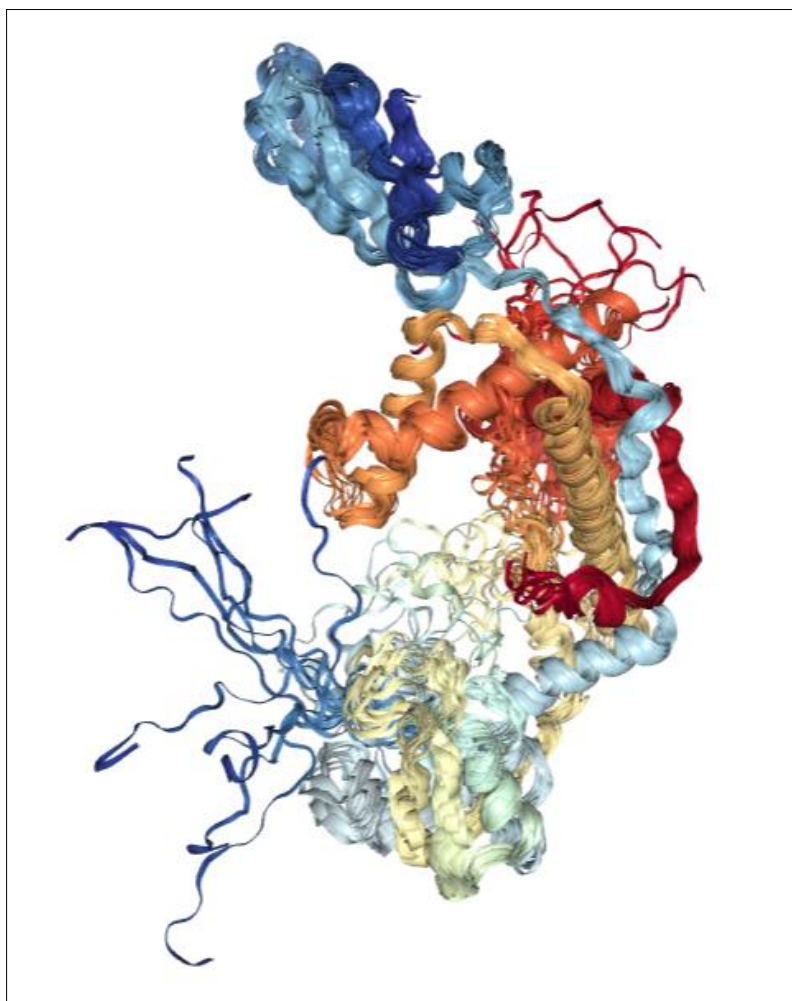


Slika 19. Elektromikroskopski prikaz stanice *E. coli*, na lijevoj strani prikazana je normalna stanica, dok je na desnoj strani prikazana stanica u kojoj se nalaze inkluzijski agregati (tamne crne točke). (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (17))

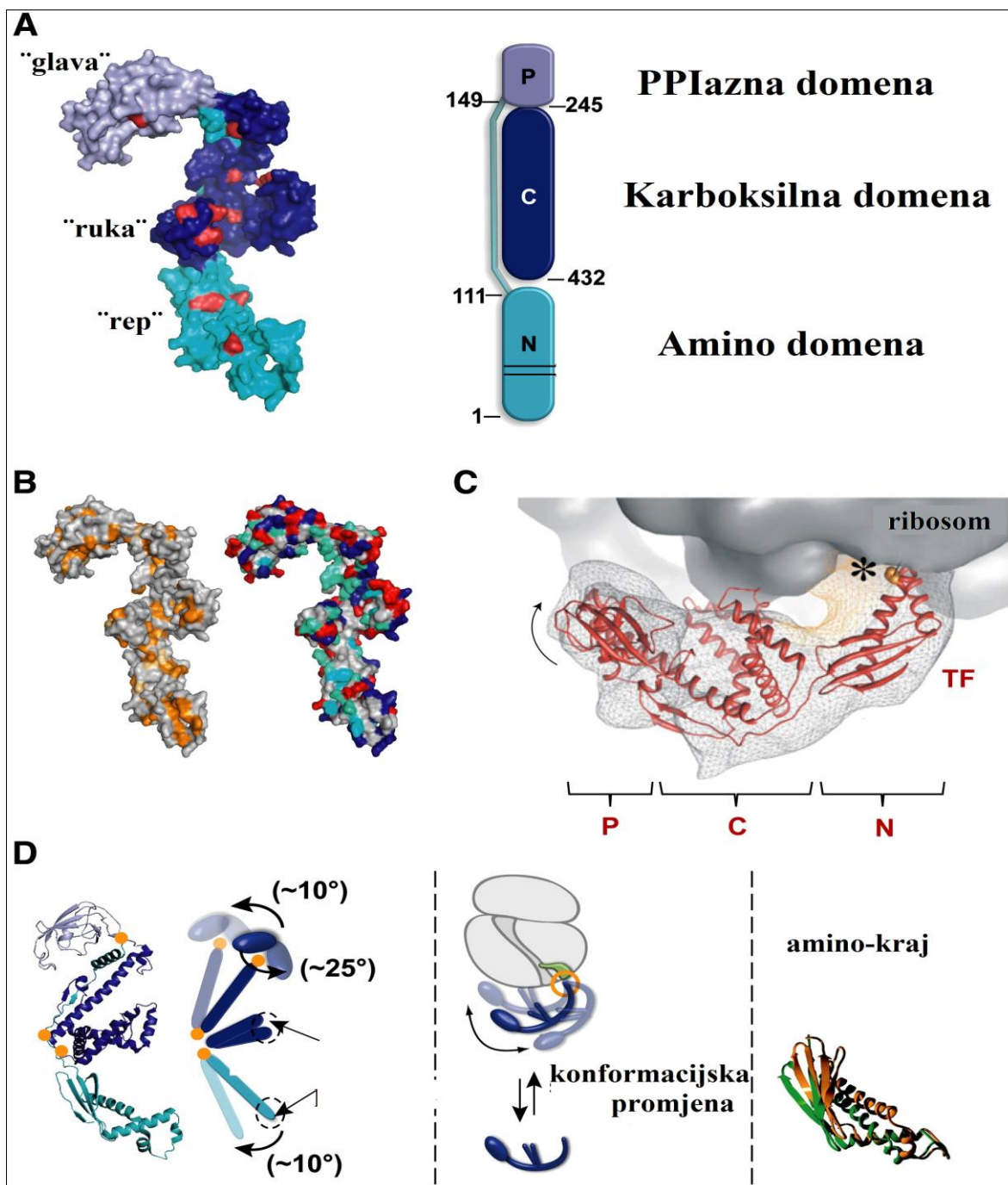
2.2.2. Smatanje novosintetiziranog proteina (smatanje *de novo*)

Novosintetizirani polipeptidni lanac, kao što je ranije bilo opisano, napušta ribosom kroz tunel formiran na 50S podjedinici ribosoma. Takav se polipeptid treba smotati u nativnu konformaciju kako bi postao funkcionalan. Kako se protein uspješno smata do nativne strukture i tko mu to omogućava bilo je glavno pitanje na koje je odgovor dobiven proučavajući bakterijske stanice *E. coli*. Naime, kako ne bi došlo do pogreške, razvijen je sustav koji se sastoji od šaperona, koji reguliraju i omogućavaju pravilno smatanje proteina. Šaperon koji prvi sudjeluje u smatanju proteina naziva se TF šaperon, od engleskog *trigger factor*. To je ribosomski-vezan šaperon koji direktno reagira s novosintetiziranim polipeptidom potičući tako pravilno smatanje *de novo*.

TF se sastoji od tri domene koje su udružene tako da čine izduženu strukturu (slika 20.). Domena u kojoj se nalazi amino-kraj povezana je s ribosomom pomoću ribosomskog proteina L23, koji se nalazi u blizini izlaznog tunela za polipeptid. Na taj način omogućena je direktna interakcija TF-a s polipeptidom. Iako je amino-kraj daleko od karboksilnog-kraja u primarnoj strukturi polipeptidnog lanca, u ovom je slučaju tko pozicioniran tako da bude blizu karboksilnom-kraju.¹⁵ Razlog je taj što domena koja sadrži karboksilni-kraj zajedno s domenom na amino kraju čini šupljinu koja na površini posjeduje hidrofobne, ali i hidrofilne aminokiselinske ostatke te na taj način omogućuje TF-u da reagira sa supstratom. Središnja domena pozicionirana je distalno od amino-kraja i posjeduje peptidil-prolil cis/trans izomeraznu aktivnost (PPIase).¹⁵ Na slici 21. shematski je prikazana struktura TF-a te promjena njegove konformacije.



Slika 20. Tercijarna struktura šaperona TF iz E. coli PDB: 2MLX (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (18))

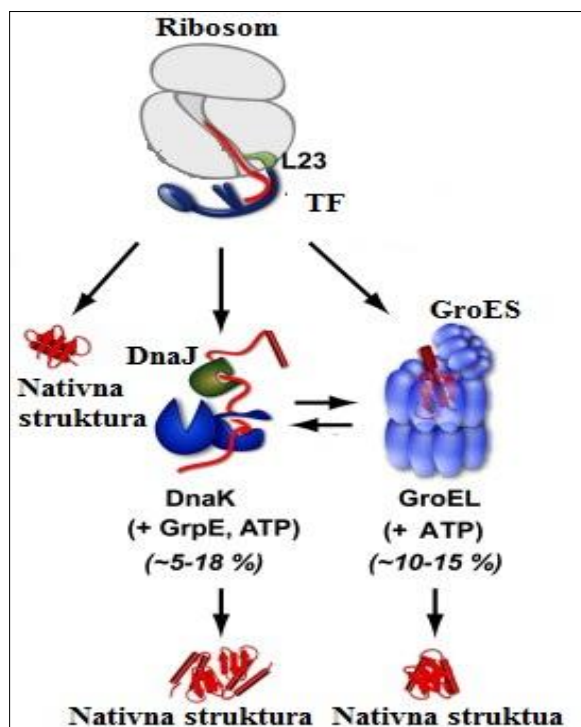


Slika 21. Struktura TF šaperona, (A) struktura i organizacija TF šaperona, na slici su naznačene tri domene u različitim bojama, pri čemu N-domena (svijetlo plavo) čini tzv. rep pomoću kojeg je TF vezan za ribosom, K-domena (tamno plavo) sačinjena od ruke koja prima polipeptidni lanac te PPI-azna domena (sivo), (B) prikaz površinske karakteristike TF-a, crvenom bojom naznačeni su polarni bočni ogranci, a narančastom nepolarni, (C) vezanje polipeptidnog lanca u TF šupljinu, zvijezdica označava mjesto na kojem polipeptid napušta ribosom, (D) prikaz konformacijske promjene prilikom vezanja supstrata, lijevo je prikazana struktura šaperona bez vezanog supstrata, a desno vezana. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (19))

Mutacije koje uzrokuju inaktivaciju gena koji kodira TF neće nužno uzrokovati promjene, ali su takve mutacije kritične ukoliko su kombinirane s mutacijama koje inaktiviraju šaperon Hsp70.¹⁵

Predložena su dva moguća mehanizma kojima TF potiče smatanje proteina *de novo*. Jedan od njih temelji se na formiranju šupljine između amino-kraja i karboksilnog-kraja. Takva šupljina dovoljno je velika da u nju stanu dijelovi polipeptidnog lanca koji se mogu smotati u manje domene. Iz tog razloga kaže se da zapravo formirana šupljina potiče kotranslacijsko smatanje proteina pružajući istom zaštitu od vanjskog utjecaja. Drugi pak mehanizam kaže da se TF veže na novosintetizirani protein čime onemogućava smatanje proteina sve dok nije prikupljeno dovoljno informacija za pravilno smatanje. Tek kada se prikupe potrebne informacije koje se nalaze na C-kraju polipeptida započinje smatanje istog. Danas se u obzir uzima ideja da se ta dva mehanizma ne isključuju tj. da mogu djelovati simultano zbog toga što kada bi se prihvatio samo jedan od njih, vjeruje se, da smatanje ne bi bilo potpuno, te bi došlo do pogreške. Npr. ukoliko se novosintetizirani i djelomično smotan protein veže u šupljinu u njoj biva dok ne naraste. Vezanjem tako dio proteina u šupljinu šaperona dolazi do smanjenja konformacijske slobode i time usporenog smatanja čime se omogućava "čekanje" C-kraja koji nosi dodatnu informaciju vezanu za cjelokupno smatanje.

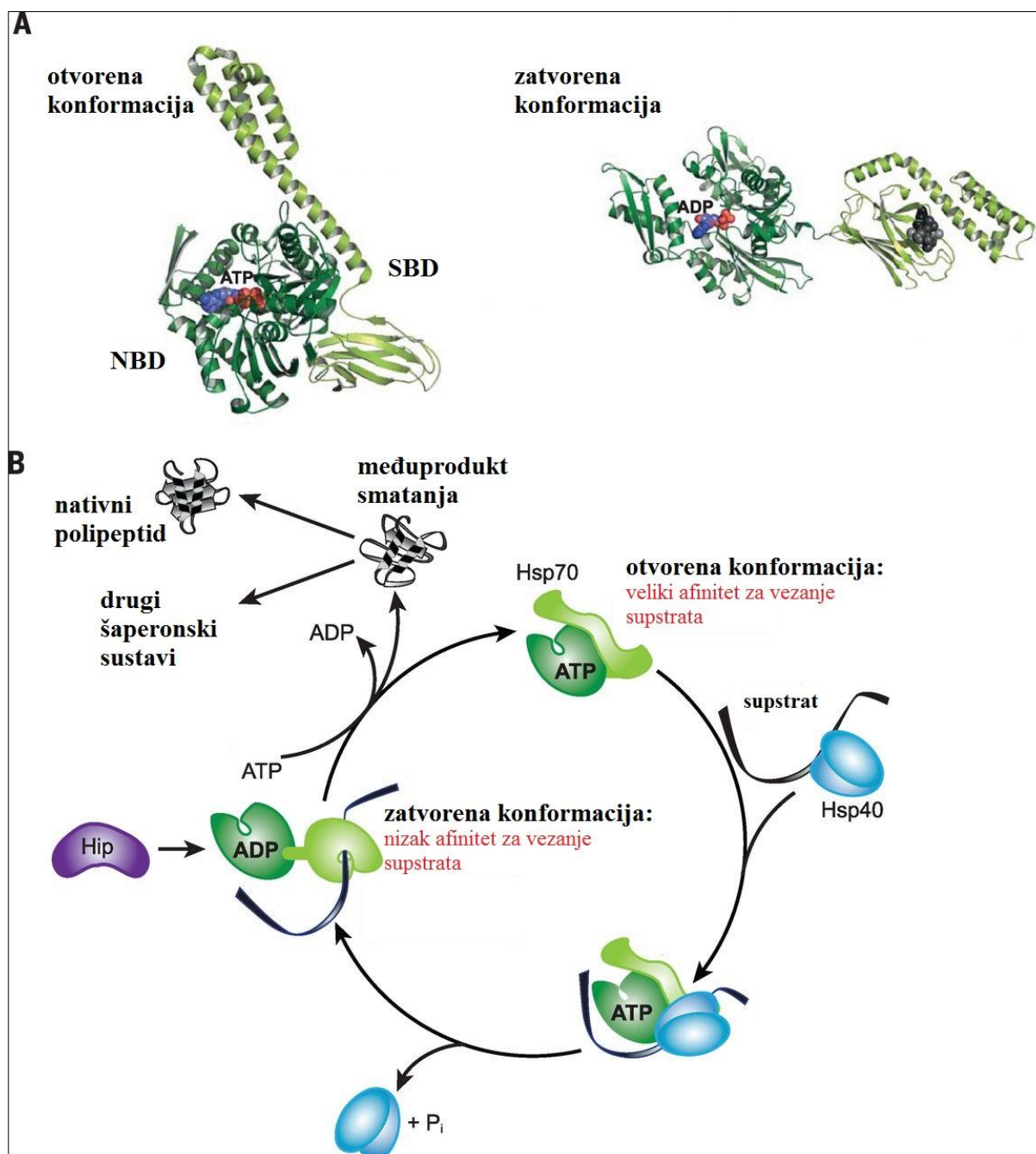
Uz šaperon TF postoje još dva šaperonska sustava koja omogućavaju smatanje novosintetiziranog proteina, a to su DnaK i GroE (slika 22.).



Slika 22. Shematski prikaz šaperonskih sustava koji sudjeluju u smatanju proteina *de novo*. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (15)).

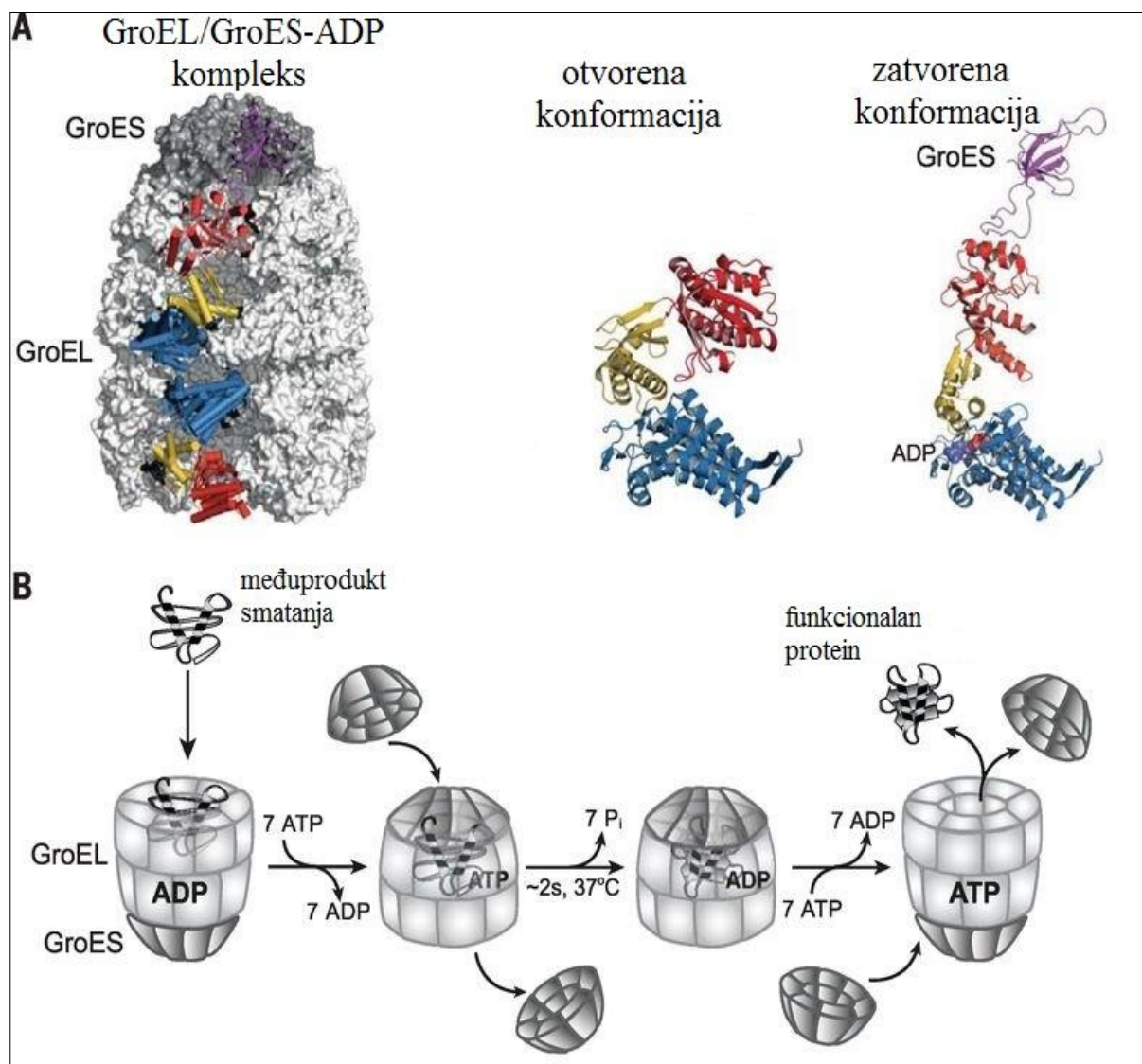
DnaK je vrlo važan šaperonski sustav zbog toga što je otkriveno da čak 5%-18% novosintetiziranih proteina biva smotano upravo uz pomoć DnaK.¹⁵ DnaK posjeduje dvije funkcionalne domene, amino-kraj, gdje se veže nukleotid (NBD) te karboksilni-kraj gdje se veže supstrat (SBD), (slika 23.). Domena koja se nalazi na amino-kraju, NBD, regulira konformacijske promjene SBD-a. Naime SBD se može nalaziti u dvije različite konformacije jer NBD posjeduje ATP-aznu aktivnost. U jednoj od konformacija može vezati supstrat, te se zato ta konformacija naziva otvorena, odnosno ATP konformacija. U drugoj konformaciji SBD gubi mogućnost vezanja supstrata zbog toga što je prisutan ADP dobiven hidrolizom ATP-a. Takva konformacija naziva se zatvorena ili ADP konformacija. ATP-azna aktivnost regulirana je dodatnim šaperonom, zvanim DnaJ. DnaJ je šaperon iz porodice Hsp40 te je iznimno važan zbog regulacije DnaK. Njegova uloga je pokretanje hidrolize ATP-a kada dođe do pojave krivo smotanog proteina. Na taj način DnaK "osjeća" krivo smotane proteina te istodobno dolazi do aktivacije GrpE, koji potiče disocijaciju ADP-a s domene zadužene za vezanje nukleotida na DnaK i na taj način dolazi do otpuštanja supstrata s DnaK. DnaJ posjeduje specifičnu domenu za vezanje polipeptida te mu to omogućava vezanje

polipeptidnog lanca i usmjeravanje istog u aktivno mjesto DnaK (SBD). To je zapravo mehanizam bez kojeg DnaK ne bi mogao funkcionirati jer ne bi postojala mogućnost vezanja polipeptida direktno na SBD. Druga ključna domena na DnaJ bez koje također ne bi bila moguća funkcija DnaK, naziva se J domena. To je domena koja regulira ATP-aznu aktivnost. Sastoji se od četiri α -zavojnice, među kojima je α -zavojnica II najvažnija u regulaciji aktivnosti DnaK. Naime, istraživanja su pokazala da je upravo ta zavojnica ključna u povezivanju DnaK i DnaJ što omogućava regulaciju ATP-azne aktivnosti na DnaK.



Slika 23. Shematski prikaz strukture i konformacijskih promjena bakterijskog šaperona DnaK, (a) struktura DnaK, s lijeve strane prikazana je otvorena konformacija u kojoj vezanjem ATP-a i njegovom hidrolizom dolazi do konformacijske promjene što je uočljivo na prikazu s desne strane, (b) ciklus vezanja i otpuštanja supstrata, neaktivni polipeptidni lanac najprije se veže na Hsp40 (kofaktor DnaJ), koji ga usmjerava u aktivno mjesto na DnaK što potiče hidrolizu ATP-a i dovodi do konformacijske promjene. Otpuštanjem ADP-a te vezanjem novog ATP-a dolazi do otpuštanja supstrata te je tada sve spremno za novi ciklus. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (21)).

Drugi spomenuti sustav koji se sastoji od šaperonina GroEL (Hsp60) i GroES (Hsp10) je jedan od najvažniji šaperonskih sustava u životu stanice *Escherichia coli*. GroEL sustav sudjeluje u smatanju čak 10%-15% novosintetiziranih proteina koji zapravo ne mogu biti smotani pod utjecajem TF ili DnaK sustava (slika 22.). Izostanak GroEL-a rezultira agregacijom velikog boja proteina te se stoga ovaj sustav smatra esencijalnim. Mehanizam kojim GroEL potiče smatanja potpuno je različit od prethodno objašnjenih mehanizama TF-a i DnaK sustava. Protein GroEL stvara strukturu koja se sastoji od dvije međusobno povezane oligomerne podjedinice koje izgledaju poput bačve (slika 15.). Svaka podjedinica sastoji se od heptamerskog prstena molekule mase 57 kDa. Na njih je vezan oligomerni prsten koji se sastoji od kofaktora GroES-a. Vezanje ATP-a inducira konformacijsku promjenu koja omogućava vezanje GroES-a kao poklopca, čime nastaje zatvorena šupljina. Promjena konformacije koja dovodi do vezanja supstrata uzrokuje zamjenu hidrofobnih aminokiselinskih ostataka s hidrofilnim u aktivnom mjestu, uzrokujući tako stvaranje hidrofilne šupljine u koju se nesmotani protein sada može smjestiti. Nakon određenog vremena vezani ATP se hidrolizira što uzrokuje konformacijske promjene. Dolazi do otpuštanja GroES-a s GroEL-a što uzrokuje otpuštanje supstrata iz aktivnog mjesta. Slika 24. shematski prikazuje strukturu i mehanizam djelovanja GroEL-a. Detalji mehanizma još nisu u potpunosti poznati te ovo predstavlja jedan od predloženih modela.

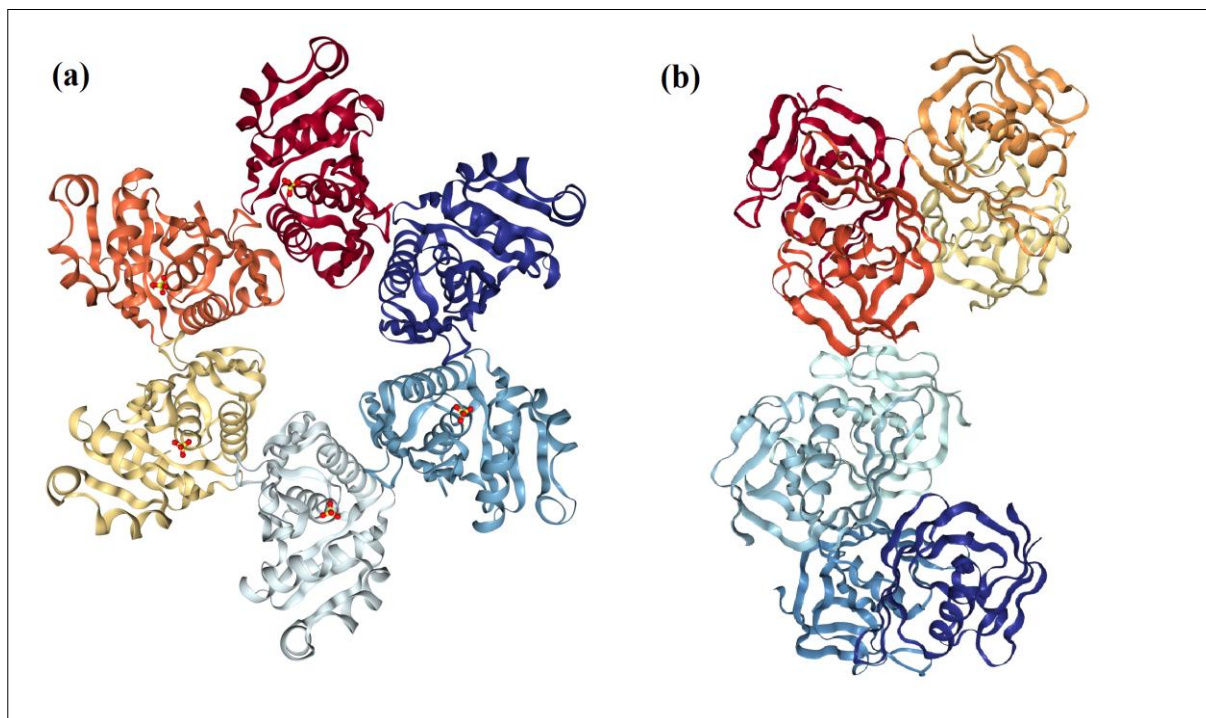


Slika 24. Struktura i mehanizam djelovanja bakterijskog šaperonina GroEL, (a) struktura šaperoninskog kompleksa GroEL/GroES, s desne strane prikazana je jedna podjedinica iz oba prstena u otvorenoj konformaciji, odnosno u zatvorenoj kada je na GroEL vezan GroES, (b) reakcijski mehanizam smatanja proteina, proteinski supstrat se smješta u formiranu šupljinu te nakon hidrolize ATP-a dolazi do otpuštanja supstrata i disocijacije GroES-a s kompleksa GroEL/GroES. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (21)).

Opisani sustavi pojedinačno su vrlo važni u održavanju homeostaze proteina kod bakterija. Svaki od njih sprječava nastanak agregata i time zajedno omogućavaju stanici normalno funkcioniranje, rast i razvoj u normalnim, ali i stresnim uvjetima.

2.2.3. *Uklanjanje pogrešno smotanog proteina*

Ponekad stanica ne može riješiti problem krivo smotanog proteina ponovnim smatanjem te je tada potrebno ukloniti taj protein. Na taj način stanica se štiti od potencijalnog toksičnog djelovanja krivo smotanog proteina. Način na koji stanica uklanja proteine jest razgradnja pomoću proteaza, nazvanih AAA+ proteaze. Te se proteaze sastoje od dvije domene koje obavljaju različite funkcije. Jedna od njih posjeduje proteolitičku aktivnost te je strukture poput bačve, dok druga domena posjeduje ATP-aznu aktivnost, a građena je od heksamernih strukturnih jedinica (slika 25.). ATP-azna aktivnost se zapravo ponaša poput šaperona. Ona odmotava prethodno smotani proteinski supstrat i takvog ga predaje u proteolitičku domenu kako je ranije bilo opisano. AAA+ proteaza važna je i zbog regulacije proteolize sudjelujući u mnogim signalnim putevima razgradnje raznih proteina. Mehanizam djelovanja AAA+ proteaza najbolje je istražen na proteazi nazvanoj Lon koja zapravo uklanja proteine koji su prerano terminirani tijekom translacije. Prepoznavanje takvih proteina događa se uz pomoć domene na amino kraju. Lon prepoznaje hidrofobne dijelove peptidnog lanca koji su inače u unutrašnjosti globularnog proteina. Slično takvo ponašanje posjeduje i DnaK. No, razlika je u tome što Lon "osjeća" hidrofobne regije bogate aminokiselinama s aromatskim bočnim ograncima, dok djelovanje DnaK ne ovisi o prisutnosti istih. Iz tog razloga ponekad je potrebna potpuna suradnja proteaza i šaperona. U slučajevima kada je stanica izložena negativnom vanjskom utjecaju dolazi do nakupljanja velikog broja agregata koji ne mogu biti jednostavno razgrađeni, već moraju biti podvrgnuti denaturaciji postignutoj otapanjem proteina i ponovnom smatanju. Mehanizam takvog djelovanja zahtjeva prisutnost DnaK sustava i ClpB. Vezanje DnaK na takav proteinski agregat onemogućava pristup drugih šaperona i proteaza. Na taj način DnaK prenosi proteinski agregat do ClpB. Taj prijenos uključuje M-domena ClpB-a koja nije pristupa kod ostalih proteaza iz AAA+ obitelji. Taj mehanizam prijenosa još uvijek je nepoznat, ali pretpostavlja se da DnaK i ClpB direktno reagiraju. Nakon što je supstrat prenesen, ClpB djeluje tako da uvlači polipeptid jedan po jedan kroz poru na površini, odvajajući tako krivo smotane proteine iz proteinskog agregata. Energija dobivena hidrolizom ATP-a na ClpB-u, omogućava takvo "izvlačenje" polipeptida. Procesivnost ClpB-a prekida se kada dođe do interakcije sa smotanom domenom. To ukazuje da ClpB djeluje tako da spriječava ometanje ponovnog smatanja prethodno odmotanog proteina.



Slika 25. Tercijarna struktura Lon proteaze iz bakterije *Escherichia coli*, (a) kristalna struktura proteolitičke domene, (b) kristalna struktura ATP-azne domene, odnosno N-kraja, PDB:3WU3 (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (22)).

2.3. Utjecaj okoline na stanicu

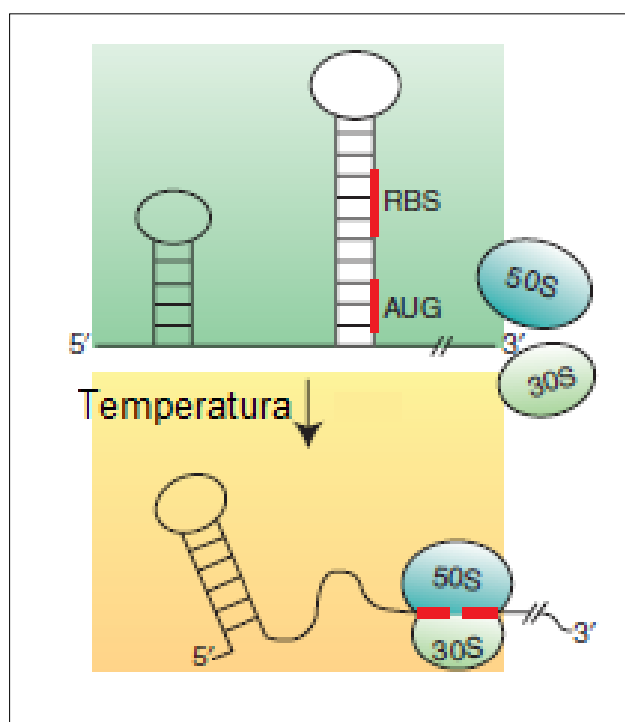
Bakterijske stanice su često zbog načina života izložene ekstremnim uvjetima te su na temelju toga morale razviti stanične sustave kako bi preživjele u takvim uvjetima. Vanjski čimbenici često dovode do narušavanja homeostaze proteina u bakterijama. Osvrnimo se na život bakterije *Escherichia coli*. Ta bakterija je svakodnevno izložena rasponu temperature od 36° do 40° te razlici u kiselosti na gotovo kompletnoj pH skali ukoliko nastanjuje čovjeka. Takve razlike ne samo da narušavaju smatanje proteina već utječu i na postojeće i funkcionalne proteine, uzrokujući stvaranje agregata. Bakterije su iz tog razloga razvile sofisticirane sustave odgovorne za regulaciju homeostaze proteina prilikom promjena uvjeta života.⁷

2.3.1. Stanični odgovor na temperaturni stres

Povišenje temperature u stanici potiče ekspresiju gena zaduženih za sintezu šaperona i proteaza. Ta se ekspresija nalazi pod strogom kontrolom različitih regulacijskih sustava. Ti sustavi mogu biti grupirani u dvije generalne klase:

- 1.) temperaturno ovisna mRNA koja sadrži temperaturne regulatore i
- 2.) regulatori transkripcije pod utjecajem šaperona i proteaza.

Temperaturno ovisna RNA, zvana još i „RNA termometar“ kontrolira ekspresiju specifičnih gena koji onemogućuju inicijaciju translacije tako što stvara strukturu ukosnice (slika 26.) u kojoj je skriven startni kodon. Povišenje temperature uzrokuje narušavanje/razmatanje ukosnice, što omogućava inicijaciju translacije potrebnih proteina. Prva takva temperaturno ovisna RNA uočena u *E. coli* je ona koja kodira temperaturno ovisan transkripcijski faktor σ^{32} .



Slika 26. Shematski prikaz RNA Termometra (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (15))

Druga klasa u kojoj šaperoni i proteaze inaktiviraju regulatore transkripcije funkcionira na sljedeći način. Krivo smotani proteini se tijekom procesa ponovnog smatanja natječu za vezanje na iste šaperone ili proteaze, koji na taj način oslobađaju i stabiliziraju

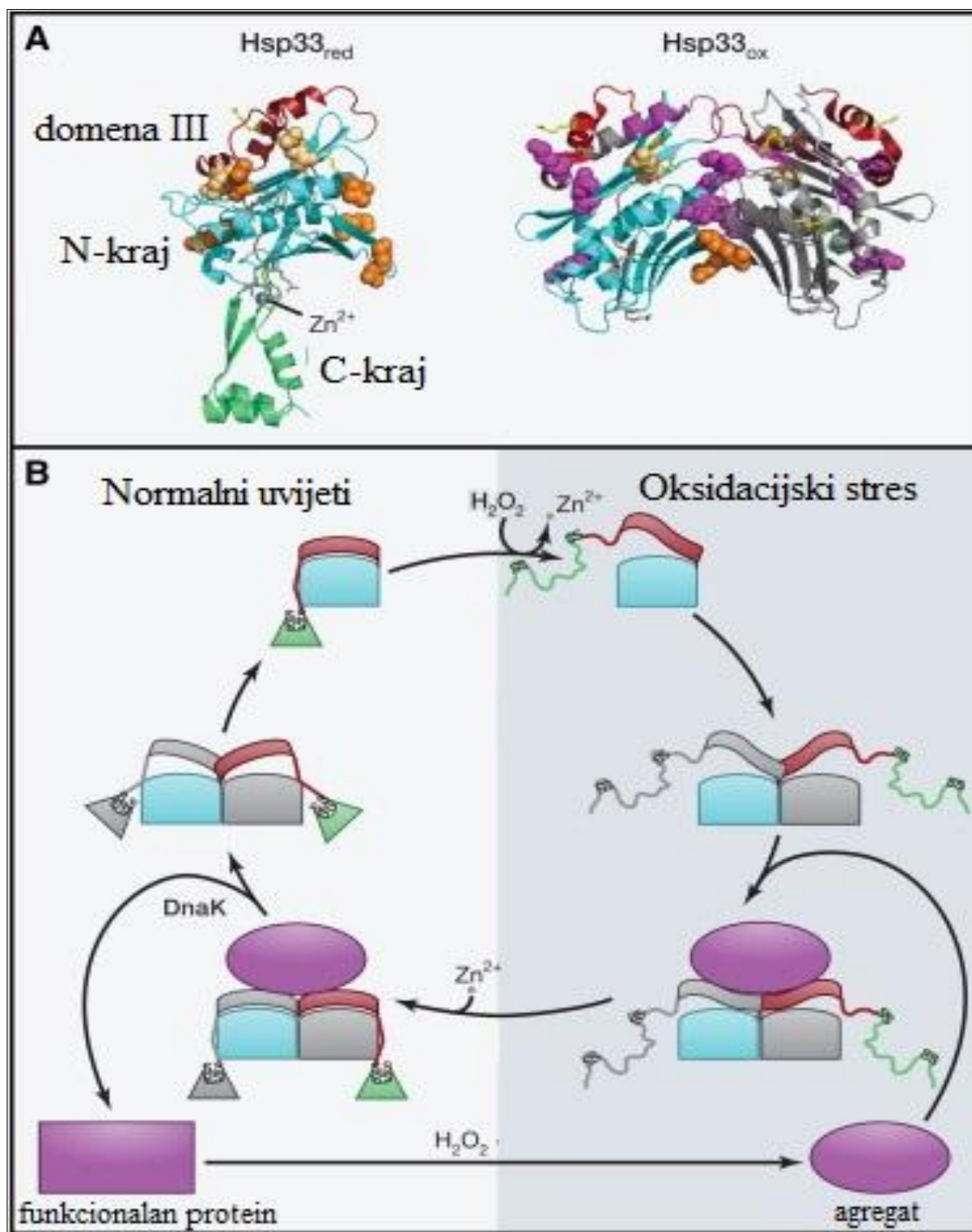
regulatore transkripcije. Na ovaj način stanica može odgovoriti na bilo koju fizikalnu promjenu koja utječe na homeostazu proteina. Dobro istražen primjer takvog mehanizma jest inaktivacija σ^{32} podjedinice, gdje dolazi do sprječavanja povezivanja iste s RNA-polimerazom. Time se inaktivirana i sama transkripcija.

Iako mnoge skupine šaperona u uvjetima *in vitro* djeluju preventivno, sprječavajući nastanak agregata, otkiveno je da u uvjetima *in vivo* djeluju potpuno drugačijim mehanizmima tijekom toplinskog šoka. Naime, u *E. coli*, jedan od najvažnijih sustava u prevenciji nastanka agregata jest sustav DnaK. Aktivnost sustava DnaK regulirana je njegovom promiskuitetnošću, sposobnošću mnogih supstrata da se veže na DnaK te njegovom koncentracijom u stanici. Toplinski šok direktno modelira aktivnost DnaK uzrokujući reverzibilnu inaktivaciju faktora GrpE. Inaktivacija GrpE usporava oslobađanje supstrata, što je zapravo posljedica spore zamjene ATP-a i ADP-a. Takva usporena izmjena ATP-a i ADP-a povećava afinitet DnaK za vezanje supstrata. GrpE djeluje poput senzora topline i njegova aktivnost osigurava da supstrat ostane vezan za DnaK.¹⁵

2.3.2. Stanični odgovor na oksidacijski stres

Toplinski stres često je popraćen porastom koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta u stanici. Takvo stanje u stanici uzorukuje velike promjene u kontroli kvalitete proteostaze. Do promjena dolazi zbog toga što je stanica u tim uvjetima životno ugrožena zbog inaktivacije DnaK sustava. Nagla promjena u koncentraciji ATP-a u stanici dovodi do inaktivacije DnaK.¹⁵ Razina ATP-a u stanici sada je manja nego što je potrebno za normalno funkcioniranje DnaK sustava. Izostankom ATP-a domena na N-kraju, u DnaK, se destabilizira. U takvim slučajevima proteinski šaperon, nazvan Hsp33 preuzima funkciju DnaK. On baš poput DnaK sprječava nastanak agregata iz pogrešno smotanih proteina. Aktivnost ovog šaperona kontrolirana je direktno utjecajem iz okoliša. Drugim riječima za aktivnost Hsp33 potrebna je povišena temperatura (>40°) i povećana koncentracija reaktivnih kisikovih vrsta. S prisutnošću oba stresa dolazi do aktivacije dimernog proteina Hsp33 koji sprječava agregaciju neovisno o prisutnosti i koncentraciji ATP-a, stvarajući stabilan kompleks sa supstratom. Hsp33 otpušta supstrat tek kada je siguran da više ne postoji opasnost, odnosno kada stanica poprimi normalne uvjete rasta. Uzevši u obzir da je inaktivacija DnaK reverzibilan proces te da stanica poprima normalnu razinu koncentracije ATP-a uklanjanjem

vanjskog negativnog utjecaja, Hsp33 oslobađanjem supstrata omogućava preuzimanje istog na DnaK. Hsp33 iznimno je zanimljiv zbog načina na koji je reguliran. Naime, kao što je već naglašeno Hsp33 reguliran je direktno utjecajem okoliša na transkripcijskoj i translacijskoj razini. Transkripcijska regulacija jednaka je kao i kod ostalih proteina toplinskog stresa, odnosno razina ekspresije gena zaduženog za sintezu šaperona Hsp33 dramatično se povećava nakon što se stanica izloži visokim temperaturama ili oksidacijskom stresu. Na posttranslacijskoj razini, funkcija Hsp33 regulirana je reaktivnim kisikovim vrstama kao što je vodikov peroksid. Ovakva dvostruka regulacija ne dozvoljava funkcioniranje ovog šaperona u normalnim uvjetima, već samo prilikom promjene normalnih uvjeta u stanici, bilo u uvjetima *in vivo* ili *in vitro*. Hsp 33 sastoji se od tri domene, domene na N-kraju, domene na C-kraju i domene koja spaja N-kraj i C-kraj (slika 27. a).²³ U domeni na C-kraju nalazi se cink koordiniran s četiri cisteinska ostatka. Tijekom porasta razine koncentracije vodikovog peroksida u stanici, dva cisteinska ostatka grade disulfidnu vezu čime slabi koordinacija Zn^{2+} te dolazi do njegove disocijacije što uzrokuje konformacijske promjene. Oksidirani Hsp33 sada može vezati supstrat (denaturirani protein). Nakon nekog vremena kada stanica poprimi normalne uvjete života dolazi do redukcije disulfidnog mosta što omogućava ponovno vezanje iona cinka za cisteinske ostatke te dolazi do otpuštanja supstrata.²³ Otpuštanje supstrata nije spontano već do njega dolazi samo kada stanica poprimi normalne uvjete života kako je ranije bilo opisano. Na slici 27. (b) shematski je prikazan ciklus vezanja i otpuštanja supstrata.



Slika 27. Struktura i mehanizam šaperona Hsp33, (a) tercijska struktura Hsp33 iz *Bacillus subtilis*, šaperon s lijeve strane nalazi se u reduiranom obliku pri čemu je ion cinka koordiniran s četiri cisteinska ostatka, dok je na desnoj strani prikazan u oksidiranom obliku, (b) reakcijski ciklus Hsp33 šaperona, pod utjecajem oksidacijskog stresa dolazi do disocijacije iona cinka te do dimerizacije samog šaperona, koji na sebe veže krivo smotani protein. U normalnim uvjetima dolazi do otpuštanja supstrata i ponovnog oksidiranja te koordinativnog povezivanja iona cinka. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (23)).

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, 6. izdanje (englesko), 1. izdanje (hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb, 2013, 25-61, 783-878.
2. C. W. Pratt, K. Cornely, *Essential Biochemistry*, 3. izdanje, Wiley & Sons Inc., 2014, 52-149.
3. RCSB Protein Data Bank (Datum pristupa: 20. 6. 2018)
<http://www.rcsb.org/structure/4Q7J>
4. <https://infograph.venngage.com/p/223385/dna-transcription>
(Datum pristupa: 20.6.2018.)
5. RCSB Protein Data Bank (Datum pristupa: 20. 6. 2018)
<https://www.rcsb.org/structure/4v5d>
6. <http://botanystudies.com/ribosomes/>
(Datum pristupa: 20. 6. 2018.)
7. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6. Izdanje, W. H. Freeman and Company, 2013, 115-183.
8. S.Q. Liu, X. L. Ji1, Y. Tao, D. T. Tan, K.Q. Zhang1, Y.X. Fu, *Protein Eng.* **10** (2012.) 207-252.
9. N. G. Bednarska, J. Schymkowitz, F. Rousseau, J. Van Elder, *Microbiology* **159** (2013) 1795-1806.
10. M. Blamowska, *Role of the Hep1 chaperone in the de novo folding and the prevention of aggregation of the mitochondrial Hsp70 chaperone Ssc1*, Doktorski rad, Fakultet kemije i farmacije, Sveučilište u Münchenu, 2012, str. 3.
11. W. Voos, *Biochim Biophys Acta* **1833** (2013) 388-399.
12. T. Lopez, K. Daalton, J. Frydman, *J. Mol. Biol.* **427** (2015) 2919-2930.
13. RCSB Protein Data Bank (Datum pristupa: 20. 6. 2018)
<http://www.rcsb.org/structure/1XCK>
14. A. O. Olivares, T. A. Baker, R. T. Sauer, *Nat. Rev. Microbiol.* **14** (2015) 33-44.
15. A. Mogk, D. Huber, B. Bukau, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** (2011) 1-19.
16. <http://www.eurekaselect.com/128991>
(Datum pristupa: 21. 6. 2018.)

17. *Protein Aggregates Probed*, 13. listopada 2008., *Chemical & engineering news*
<https://pubs.acs.org/cen/science/86/8641sci1.html>
(Datum pristupa: 22. 6. 2018.)
18. RCSB Protein Data Bank (Datum pristupa: 20. 6. 2018)
<http://www.rcsb.org/structure/2MLX>
19. A. Hoffmann, B. Bukau, G. Kramer, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **1803** (2010) 650-661.
20. C. Y. Fan, S. Lee, D. M. Cyr, *Cell Stress Chaperones* **8** (2013.) 309-316.
21. *In vivo aspects of protein folding and quality control*, 1. lipnja, 2016., *Science*
<http://science.sciencemag.org/content/353/6294/aac4354.figures-only>
(Datum pristupa: 22. 6. 2018.)
22. RCSB Protein Data Bank (Datum pristupa: 20. 6. 2018)
<http://www.rcsb.org/structure/3WU3>
23. *The Unfolding Story of s Redox Chaperone*, 29. veljače, 2012., *Cell*
[https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(12\)00229-2](https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(12)00229-2)
(Datum pristupa: 28. 6. 2018.)