

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Lea Barbarić

Poslijediplomski studij kemije, grana: biokemija

**Intrinzično neuređeni proteini u staničnoj signalizaciji i regulaciji**

**Kemijski seminar I**

Napisano prema P. E. Wright, H. J. Dyson, *Nat Rev Mol Cell Biol* **16** (2015) 18-29.

Zagreb, 2022.

Sadržaj

[§ 1. UVOD 1](#_Toc102979729)

[§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME 2](#_Toc102979730)

[2.1. Karakterizacija neuređenosti proteina 3](#_Toc102979731)

[2.2. Motivi interakcija 4](#_Toc102979732)

[2.3. IDP-ovi kao čvorišta signalizacije 5](#_Toc102979733)

[2.4. Posttranslacijske modifikacije 7](#_Toc102979734)

[2.5. Signalizacijski kompleksi višeg reda 7](#_Toc102979735)

[2.6. Alternativni splicing 8](#_Toc102979736)

[§ 3. LITERATURNI IZVORI ix](#_Toc102979737)

1. UVOD

Intrinzično neuređeni proteini (engl. *intrinsically disordered proteins, IDP*) su važan dio stanične signalizacije. Iako ne mogu stvarati stabilne strukture, takvi proteini imaju sposobnost tvorenja različitih interakcija s različitim ishodima.

Nestabilnost i fleksibilnost njihove strukture određene su aminokiselinskim slijedom te su podvrgnute posttraslacijskim modifikacijama koje dodaju kompleksnost regulatornim mrežama i signalizaciji u različitim tkivima 1.

Te neuređene domene mogu prepoznati proteine, nukleinske kiseline i ostale ligande i sudjelovati u nastajanju signalnih kompleksa pa čak i nekih staničnih organela. Ubrzavaju interakcije i kemijske reakcije između vezanih liganada i pomažu u prilagođavanju posttranslacijskim modifikacijama, alternativnim spajanjima, fuzijama proteina i umetanjima ili delecijama 2.

Da bi se identificirale i karakterizirale neuređene regije proteina koriste se razne kombinacije bioinformatičkih, računskih i eksperimentalnih analiza čime se doprinosi otkivanju njihovih uloga u biološkim procesima 1.

1. PRIKAZ ODABRANE TEME

Do sredine 90-ih godina, rasprostranjenost i funkcija neuređenih proteina u eukariotima bila je podcijenjena i neistražena. Tek pojavom bioinformatičkih i ekperimentalih studija sekvenci čitavog genoma, uočilo se da su takve neuređene regije veoma česte kod eukariotskih proteina i da su često uključene u staničnu regulaciju i signalizaciju 3,4.

Njihova struktura uvjetovana je aminokiselinskim slijedom koji je niske kompleksnosti te sadrži veći udio nabijenih i hidrofilnih aminokiselina 1.

Iako fukcionalni, takvi proteini ne mogu se pravilno smotati u stabilnu, uređenu, trodimenzijsku globularnu strukturu, već su dinamički neuređeni te fluktuiraju između različitih konformacija5.

Neki od njih su u potpunosti neuređeni, a neki imaju samo dio strukture neuređen dok je ostatak stabilan i pravilno smotan u globularnu strukturu. Većina proteina eukariotskog proteosoma se zapravo i sastoji od takvih proteina, koji sadrže i neuređene i uređene regije 6.

Interakcijom s malim molekulama, makromolekulskim kompleksima ili uslijed posttranslacijskih modifikacija, može doći do neuređenosti pravilno smotanih domena ili induciranja uređenosti u neuređenim domenama 7.

IDP-ovi često tvore interakcije i služe kao čvorišta u mrežama proteinskih interakcija. Imaju važnu ulogu u regulaciji signalnih puteva i staničnih procesa poput transkripcije, translacije i staničnog ciklusa 3. Njihova prisutnost u stanici je strogo regulirana da bi se signalizacija odvijala u odgovarajućim odjeljcima i vremenu te su zato mutacije i promijene u njihovoj količini često povezane s bolestima 8.

Uz to, imaju ulogu i u sastavljanju makromolekulskih struktura poput ribosoma, sastavljanju i rastavljanju mikrofilamenata i mikrotubula, organizaciji kromatina, transportu preko jezgrinih pora, vezanju i transportu malih molekula, te mogu služiti za razdvajanje funkcionalnih domena proteina kao fleksibilna poveznica (engl. *linker*) 9,10.

Kontrola stanične signalizacije odvija se zbog poželjnih fizikalnih karakteristika IDP-ova poput fleksibilnih elemenata za prepoznavanje koji se smataju prilikom vezanja liganda i sposobnost vezanja liganada s visokom specifičnosću ali malim afinitetom, što omogućava interakciju s različitim metama u različitim okolnostima te brzu disocijaciju i terminaciju signala 3,5. Također, takvi proteini asociraju sa svojim ligandima velikim brzinama pa se signali mogu brzo propagirati u trenutku kada je to potrebno.

IDP-ovi se vežu privremeno i dinamično, izmjenjuju partnere te se natječu za vezna mjesta na proteinima čvorišta koji se nalaze u ograničenim količinama. Interakcije su kontrolirane posttranslacijskim modifikacijama koje im omogućavaju da funkcioniraju kao prekidači 5.

* 1. Karakterizacija neuređenosti proteina

Da bi se mogla predvidjeti neuređenost proteina na temelju njihove primarne strukture, razvijeni su razni web serveri koji su povezani s bazama podataka koje sadrže informacije o konsezus neuređenim regijama svih proteina koje kodira ljudski genom 11. Programi poput DisProt Predictor of Protein Disorder (DisProt) 12 ili Prediction of Intrinsically Unstructured Proteins (IUPred) 13 mogu analizirati kompoziciju sekvence s relativno višim udjelima malih hidrofilnih aminokiselina što bi značilo da sekvenca ima veću predodređenost za neuređenost.

Pomoću eksperimentalnih i računalnih alata može se također analizirati neuređenost i kreirati ansambli14 struktura neuređenih proteina koristeći metode poput nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i difrakcije rentgenskih zraka pod malim kutem (engl. *small-angle X-ray scattering, SAXS)* 15. Takvi ansambli se mogu pohraniti u bazu podataka za konformacijske ansamble Protein Ensemble Database (pE-DB).

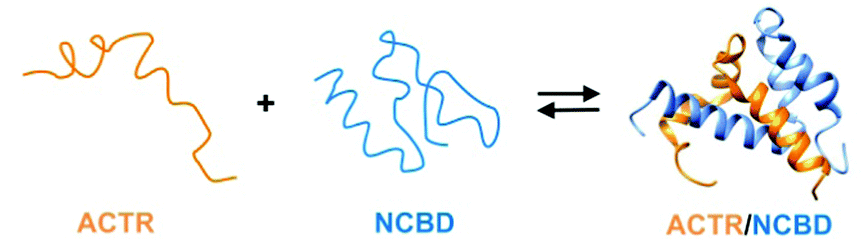
Struktura neuređenih regija u njihovoj veznoj konformaciji može se dobiti rentgentskom kristalografijom ili NMR-om kojima također možemo dobiti uvid u dinamičku interakciju proteina i njihovih liganada.

* 1. Motivi interakcija

Dinamička mreža interagirajućih proteina omogućava uspješnu međustaničnu komunikaciju a intrinzička neuređenost ima važnu ulogu u posredovanju tih interakcija 1.

Neuređene regije signalizacijskih i regulacijskih proteina često sadrže konzervirane sekvence koje mogu tvoriti interakcije s nukleinskim kiselinama i drugim proteinima5 te one mogu biti lako identificirane bioinformatičkom analizom 16. Nedavnim analizama pokazano je da ljudski proteom sadrži više od 100 tisuća kratkih linearnih vezujućih motiva unutar intrinzično neuređenih regija 17. Takvi elementi pokazuju svojstva polimorfizma, mogu tvoriti različite strukture s različitim partnerima. Dobar primjer takve domene je nuklearna ko-aktivator-vezujuća domena (engl. *nuclear co-activator-binding domain, NCBD*) CREB-vezujućeg proteina (CBP). Prilikom interakcije s dva različita liganda, koaktivatorom jezgrinog receptora p160 (ACTR) i regulatornim faktorom interferona 3 (IFR3), tvori dvije potpuno različite strukture 18,19.

„Coupled folding and binding“ je mehanizam pri kojem neuređeni motivi koji interagiraju međusobno se smataju u pravilne strukture (slika 1). Prisutnost prethodno formiranih sekundarnih strukturnih elemenata u konfomacijskim ansamblima IDP-ova, predviđa favoriziranje procesa vezanja, ali eksperimentalni podaci nisu uniformni.



Slika 1. Prikaz interakcije dvaju intrinzično neuređenih proteina, koaktivatora jezgrinog receptora p160 (ACTR) i nuklearne ko-aktivator-vezujuće domene (NCBD) mehanizmom „coupled folding and binding“. Neuređene regije prilikom interakcije smataju se u pravilne strukture. Preuzeto prema ref. 20.

U nekim eksperimentalnim istraživanjima uočeno je da smatanje proteina inducirano vezanjem i da prisustvo prethodno formiranih sekundarnih strukture nema nikakav utjecaj na brzinu smatanja 21,22. Za razliku od tih rezultata, povećana prisutnost zavojnica u proteinu ACTR povećava brzinu asocijacije s proteinom NCBD 23. Taj efekt stabilizacije analiziran je tako da su aminokiselinskom supstitucijom umetnute aminokiseline koje favoriziraju strukturu zavojnice, ali rezultati su ipak pokazali da je taj efekt toliko mali da je zanemariv 24,25.

U drugim istraživanjima, pokazano je da udio sekundarnih elemenata u nevezanom stanju, može imati utjecaja na biološke funkcije IDP-ova koje su važne za signalizaciju 26.

Ipak, kod nekih neuređenih proteina ne dolazi do smatanja prilikom vršenja njihovih bioloških funkcija nego se ponašaju kao poveznice između globularnih ili neuređenih interakcijskih domena 5. Također, neki čak ostaju nesmotani i prilikom vezanja na njihove ligande i tvore dinamičke ili tzv. „*fuzzy*“ komplekse 27.

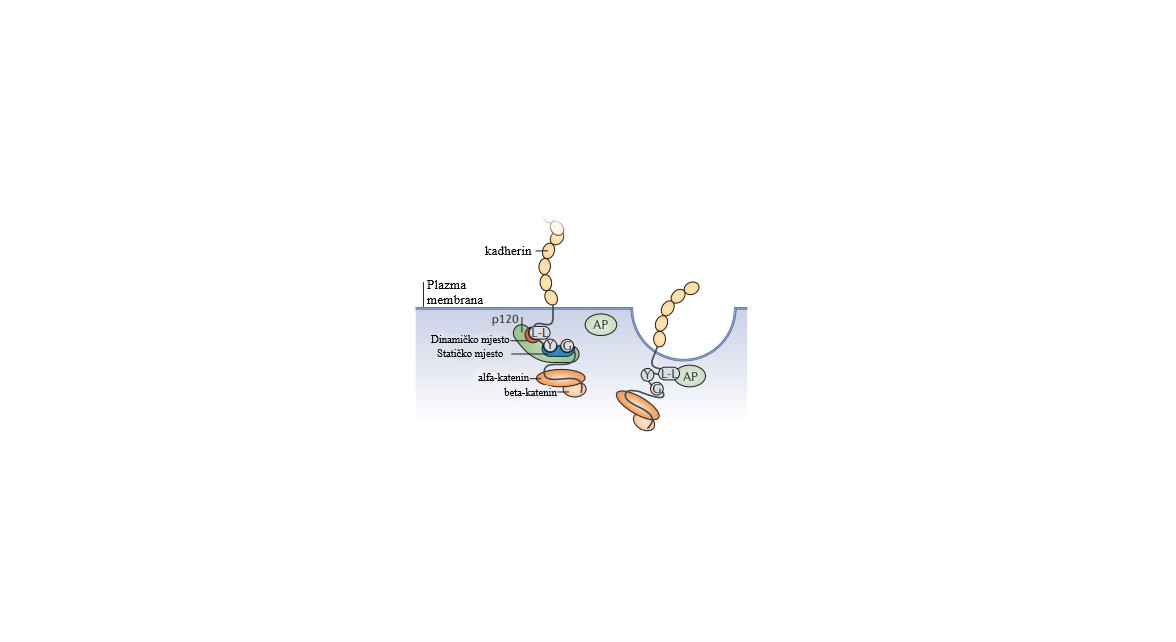
* 1. IDP-ovi kao čvorišta signalizacije

S obzirom da neuređeni proteini i regije često sadrže višestruke interakcijske motive koji posreduju vezanja na različite mete, često služe kao čvorišta signalizacijskih mreža 7. Njihova sposobnost vezanja liganada kroz različita mjesta olakšavaju dinamičko nastajanje tercijarnih i višestrukih komplekasa i integraciju u različite signalne puteve. Postojanje višestrukih veznih mjesta također dozvoljava alosteričke odgovore u signalizaciji.

Slobodna energija vezanja nije homogeno raspoređena preko svih veznih mjesta, već vezanje dominira na žarišnim mjestima koje najviše doprinose energiji vezanja, dok ostale regije doprinose veznom afinitetu u manjem opsegu.

Iako slab, taj doprinos je i dalje značajan u signalizacijskim mrežama pogotovo što se tiče posttranslacijskih modifikacija. Zbog njihovog prisustva dolazi do konformacijskih fluktuacija koje izlažu dinamički interakcijski motiv i tako olakšavaju posttranslacijske modifikacije i/ili interakcije s drugim proteinima 1.

Na primjer, katenin p120 regulira stabilnost adhezije stanica-stanica vežući intrinzično neuređeni citoplazmatski rep kadherina kroz statička i dinamička sučelja (slika 2). Središnja regija repa čvrsto se veže na p120 kroz dobro strukturiranu statičku interakciju, dok N-terminalna regija se slabo veže na p120 i fluktuira između slobodnog i veznog stanja. Ta dinamička interakcija malo doprinosi afinitetu vezanja ali ima važnu funkciju u određivanju sudbine kadherina jer dolazi do ometanja ulaska u stanicu klatrin-posredovanom endocitozom.



Slika 2. Prikaz interakcije citoplazmatskog repa kadherin s kateninom p120 kroz konzervirani fosforilirani motiv Tyr-Gly (Y-G) pri čemu dolazi do visoko afinitetnog, statičnog vezanja, i motiv Leu-Leu (L-L) pri čemu dolazi do dinamičkog vezanja. Adapterski protein (AP) prepoznaje eksponirani L-L motiv pri čemu dolazi do endocitoze. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 1.

Uz navedeno, neuređene regije mogu čvrsto vezati svoje ligande sinergističkim djelovanjem višestrukih slabih veznih mjesta bez prisutnosti lokalizirane interakcije visokog afiniteta.

Također, alosterija ima važnu ulogu u regulaciji signalizacijskih mreža. S obzirom da neuređeni proteini i regije imaju sposobnost vezanja višestrukih liganada s visokom specifičnošću i niskim afinitetom te mogućnost posttranslacijskih modifikacija, imaju i kompleksnu alosteričku organizaciju koja pomaže pri dodatnoj regulaciji interakcija 28. U teoriji, alosteričko vezanje je optimalno kada su jedan ili oba vezna mjesta intrinzično neuređena 29.

Alosterija u neuređenim proteinima prvi put je uočena u operonu toksin-antitoksin *phd-doc* u bakteriofagu P1 30. Vezanje između neuređene domena i nestabilne smotane domene Phd, inhibira ili de-inhibira transkripciju u odgovoru na relativne koncentracije proteina Phd i Doc.

* 1. Posttranslacijske modifikacije

Povećana fleksibilnost i konfomacijska fluidnost IDP-ova čini ih dostupnim za posttranslacijske modifikacije što često rezultira u gustim klasterima modifikacija.

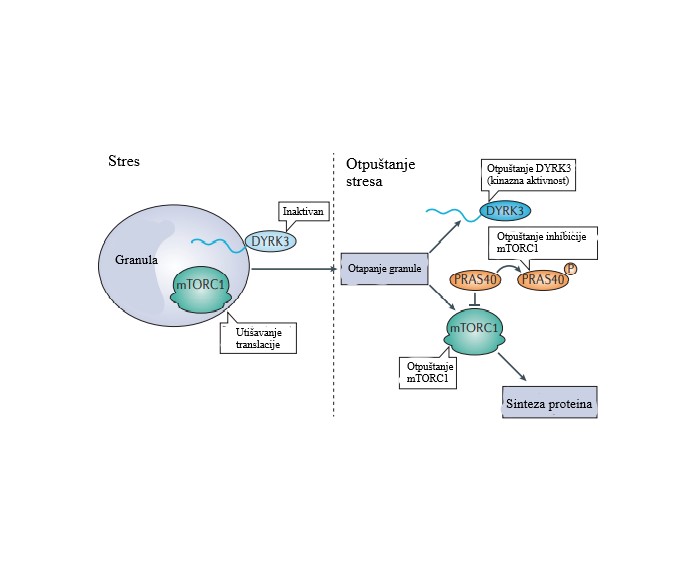
Ako se uzmu u obzir i posttranslacijske modifikacije, u ljudskom proteomu moglo bi biti i do milijun interakcijskih motiva unutar neuređenih regija 17.

Modifikacija IDP-a različitim kinazama, acetilazama, metilazama i drugim enzimima može rezultirati različitim signalizacijskim ishodima što doprinosi raznolikosti signalizacijskih puteva.

Mjesta fosforilacije uglavnom se nalaze unutar samih neuređenih regija te ona ima važnu ulogu u modulaciji konformacijski ansambla i samim interakcijama IDP-ova. Signalizacija se regulira dodavanje ili skidanjem čak i samo jedne fosforilne skupine ali takvi proteini često sadrže višestruka fosforilacijska mjesta koja mogu biti modificirana u raznim kombinacijama te se tako generiraju različiti signali.

* 1. Signalizacijski kompleksi višeg reda

Nedavna istraživanja pokazala su da regulatorni proteini često tvore komplekse višeg reda zvane signalosomi. Signalosomi amplificiraju signal, smanjuju buku i doprinose prostornoj i vremenskoj kontroli signalizacije 31. Neuređene regije imaju bitnu ulogu u nastajanju signalizacijskih komplekasa kroz reverzibilne protein-protein interakcije. Također, pokazano je da mogu tvoriti citoplazmatske i jezgrene granule bez membrana pomoću nisko afinitetnih protein-protein interakcija koje su posredovane nisko kompleksnim, *prion-like* neuređenim regijama 32. Te granule ponašaju se kao dinamičke tekuće kapljice koje brzo izmjenjuju proteinske i RNA komponente s citoplazmom ili nukleoplazmom. Na primjer, u odgovoru na stres, kinaza mTORC1 koja regulira stanični rast i metabolizam, zarobljena je u neaktivnom stanju unutar granule. Njena reaktivacija zahtjeva otapanje granule a taj proces je posredovan kinazom DYRK3. Neuređena N-terminalna regija neaktivnog DYRK3 cilja ga u granulu i prevenira njeno otapanje. Kada je DYRK3 aktiviran, promovira otapanje granule te se fosforilacijom inhibitora mTORC1 oslobađa i reaktivira za daljnju signalizaciju (Slika 3).



Slika 3. Prikaz regulacije signalnog puta mTORC1 u odgovoru na stres. Granula se kondenzira i zarobljuje mTORC1 i DYRK3, stanične faktore koji aktiviraju translaciju. Kada dolazi do relaksacije stresa, oba proteina su otpuštena. Aktivni DYRK3 forsforilira PRAS40 te dolazi do de-inhibicije mTORC1 te se sinteza proteina nastavlja. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 1.

* 1. Alternativni splicing

Više od 90% ljudskih gena izloženo je alternativnom splicingu, što dovodi do ekspresije različitih proteinskih izoformi u različitim vrstama stanica i tkiva.

Tkivo-specifični splicing bitan je za razvoj i staničnu diferencijaciju jer rezultira u nastanku različitih izoformi proteina koji vrše različite funkcije u različitim tkivima 33. Segmenti proteina koji su kodirani tkivo-specifičnim eksonima često su bogati neuređenim regijama, dok konstitutivni eksoni rezultiraju pravilno smotanim proteinima. To je zato jer tkivo-specifični splicing modulira vezne karakteristike regulatornih proteina i tako regulira signalizacijske mreže ovisno o vrsti stanice i tkiva.

Također, IDP-ovi imaju ulogu u pre-mRNA splicingu kao i u alternativnom splicingu koji su katalizirani spliceosomom. Spliceosom sam po sebi sadrži mnoštvo neuređenih regija kao i njegovi proteinski supstrati. Proteini koji sudjeluju u nastajanju spliceosoma i prepoznavanju mRNA sadrže visoke udjele neuređenosti dok proteini koji čine njegovu katalitičku jezgru teže visokoj uređenosti.

Nastanak spliceosoma i njegova konformacijska prestrojavanja regulirana su reverzibilnim posttranslacijskim modifikacijama u neuređenim dijelovima kao također i splicing pre-mRNA.

1. LITERATURNI IZVORI
2. P. E. Wright, H. J. Dyson, *Nat Rev Mol Cell Biol* **16** (2015) 18-29.
3. C. J. Oldfield, A. K. Dunker, *Annu. Rev. Biochem.* **83** (2014) 553–584.
4. P. E. Wright, H. J. Dyson*, J. Mol. Biol.* **293** (1999) 321–331.
5. A. K. Dunker, C. J. Brown, J. D. Lawson, L. M. Iakoucheva, Z. Obradovic, *Biochemistry* **41** (2002) 6573–6582.
6. H. J. Dyson, P. E. Wright, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **6** (2005) 197–208.
7. R. van der Lee, et al. *Chem. Rev.* **114** (2014) 6589–6631.
8. D. Reichmann, U. Jakob, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23** (2013) 436–442.
9. M. M. Babu, R. van der Lee, N. S. de Groot, J. Gsponer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21** (2011) 432–440.
10. P. Tompa, *FEBS Lett.* **579** (2005) 3346–3354.
11. P. Tompa, *Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins*, Chapman & Hall/CRC, 2009.
12. M. E. Oates, et al., *Nucleic Acids Res.* **41**(2013) D508–D516.
13. K. Peng, et al., *J. Bioinform. Comput. Biol.* **3** (2005) 35–60.
14. Z. Dosztányi, V. Csizmok, P. Tompa, I. Simon, *Bioinformatics* **21** (2005) 3433–3434.
15. J. A. Marsh, J. D. Forman-Kay, *Proteins* **80** (2012) 556–572.
16. N. Sibille, P. Bernadó, *Biochem. Soc. Trans.* **40** (2012) 955–962.
17. A. Mohan, et al. *J. Mol. Biol.* **362** (2006) 1043–1059.
18. P. Tompa, N. E. Davey, T. J. Gibson, M. M. Babu, *Mol. Cell* **55** (2014) 161–169.
19. S. J. Demarest, et al. *Nature* **415** (2002) 549–553.
20. B. Y. Qin, et al. *Structure* **13** (2005) 1269–1277.
21. B. Schmidtgall, et al. *Chem. comm.* **53**(2017), 7369-7372.
22. K. Sugase, H. J. Dyson, P. E. Wright, *Nature* **447** (2007) 1021–1025.
23. J. M. Rogers, C. T. Wong, J. Clarke *J. Am. Chem. Soc.* **136** (2014), 5197–5200.
24. V. Iešmantavicˇius, J. Dogan, P. Jemth, K. Teilum, M. Kjaergaard *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**(6) (2014) 1548-51.
25. C. E. Schafmeister, J. Po, G. L. Verdine *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 5891–5892.
26. E. A. Bienkiewicz, J. N. Adkins, K. J. Lumb *Biochemistry* **41** (2002) 752–759.
27. W. Borcherds, et al*. Nature Chem. Biol.* **10** (2014) 1000–1002.
28. P. Tompa, M. Fuxreiter *Trends Biochem. Sci.* **33** (2008) 2–8.
29. H. N. Motlagh, J. O. Wrabl, J. Li, V. J. Hilser, *Nature* **508** (2014) 331–339.
30. V. J. Hilser, E. B. Thompson *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104** (2007) 8311–8315.
31. A. Garcia‐Pino et al. *Cell* **142** (2010) 101–111.
32. H. Wu *Cell* **153** (2013) 287–292.
33. M Kato, et al. *Cell* **149** (2012) 753–767.
34. M. Buljan, et al. *Mol. Cell* **46** (2012) 871–883.