

ENZIMOLOGIJA.

BALTYMŲ IR FERMENTŲ POSTTRANSLIACINĖS MODIFIKACIJOS

Pogenominės eros atradimai sugriovė galiojusias dogmas ir iš esmės pakeitė supratimą apie gyvybės sudėtingumą. Viena iš paplitusių vadovėlinių tiesų buvo aiškinimas, kad juo sudėtingesnis organizmas, tuo daugiau genų jis turi. Nuskaičius žmogaus genomą ir palyginus jame esančių struktūrinių genų skaičių su kitų organizmų rūšių genų skaičiumi, nustatyti faktai leidžia teigti, kad tokia dogma galioja tik lyginant labai tolimų evoliucijos pakopų organizmus – pavyzdžiui, virusus ar bakterijas su eukariotais. Aukštesniųjų eukariotų baltymus koduojančių genų skaičius (20 -30 tūkst.) panašus į kirmėlių ar vaisinių muselių (apie 20 tūkst.), o tam tikrų augalų ir tam tikrų vienaląsčių protistų genomas yra didesnis už žmogaus.

Panašūs faktai kelia klausimą, kas lemia aukštesniųjų organizmų sudėtingumą? Visuminės baltymų analizės arba proteomikos tyrimų technologijos padėjo atskleisti, kad tai – ne genų skaičius, o nepaprastai didelė baltymų struktūrų ir funkcijų įvairovė. Baltymo veikla gali priklausyti ne tik nuo to, koks genas jį koduoja, kokia jo aminorūgščių seka ir tretinė struktūra. Žinių apie tam tikro baltymo geną nekanka suprasti, kas lemia baltymo antrinių izoformų susidarymą, vietą ląstelėje arba aktyvumą. Ląstelei tam tikrais atvejais gali būti lemtingi labai nedidelės baltymo molekulių dalies (1 proc.) modifikacijos, dėl kurių atsiranda nedaug, bet savitų savybių ir aktyvumų turinčių molekulių.

Dar mokykloje išmokstama, kad baltymus sudaro apie 20 svarbiausių aminorūgščių, kurios turi baigtinį skaičių funkcinių grupių (karboksi-, amino-, hidroksi-, merkapto-, guanidin-, alkil-, fenil- ir kelios kitos grupės). Baltymo amino rūgščių seką lemia atitinkamos baltymo geno nukleotidų sekos. Tačiau ląstelėje beveik visi baltymai po sintezės arba net jos metu yra modifikuojami. Todėl jų struktūroje atsiranda įvairūs DNR nekoduojami pokyčiai. **Posttransliacine baltymų modifikacija (PTM) vadinamas struktūrinio baltymo geno nekoduojamas cheminės baltymo struktūros pokytis.** Tai gali būti savita dalinė baltymo proteolizė, tam tikrų funkcinių grupių šalinimas arba papildomų funkcinių grupių prijungimas kovalentiniu ryšiu prie baltymo aminorūgščių funkcinių grupių. Tai didina to paties geno koduojamų galimų molekulių struktūrų skaičių. Dažnai PTM įvyksta po to, kai susintetinama visa baltymo molekulė. Tada pavadinimas PTM atitinka reiškinių prasmę. Prie tokių modifikacijų galima priskirti baltymų fosforilinimą arba dalinę baltymo pirmtako (pvz., zimogenų) proteolizę, kurios metu baltymas įgauna biologinį aktyvumą. Kitos modifikacijos vadinamos **kotransliacinėmis**, nes gali vykti dar baltymo sintezės metu – pavyzdžiui, endoplazminio tinklo baltymų glikozilinimas. Tačiau tarp mokslininkų įprasta PTM terminu apibūdinti visas baltymų modifikacijos, kurios nėra koduojamos genų.

PTM negalima numatyti, nuskaicius geno nukleotidų seką, ir ši savybė yra bendra tiek post-transliacinėms, tiek kotransliacinėms modifikacijoms. Svarbu tai, kad PTM lemia baltymo fizikinių savybių pokyčius – keičia baltymo molekulinę masę, gali keisti krūvį, elektroforetinį judrumą, sąveikas su kitomis molekulėmis. Dažnai PTM buvimas keičia baltymo vietą ląstelėje, stabilumą ir funkcijas – biologinį aktyvumą (1 lentelė).

1 lentelė. PTM atmainos ir poveikis

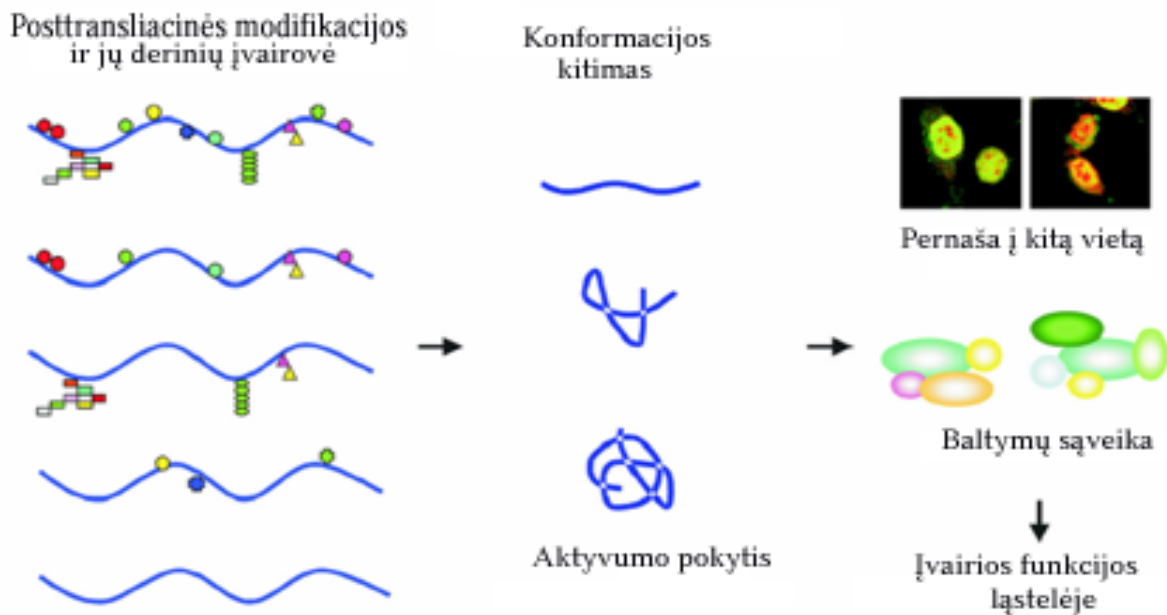
PTM atmaina	Reakcijos pobūdis	Pavyzdžiai
Dalinė proteolizė	Peptidinių ryšių hidrolizė	Ko- arba posttransliacinis iniciacijos metionino šalinimas nuo baltymo N galo;
		Endoplazminio tinklo baltymų signalo sekos pašalinimas
		Proteolizinis probaltymų brendimas: proinsulino vidinio C peptido pašalinimas; baltyminių domenų-slopiklių šalinimas; polibaltymų hidrolizė į aktyvius baltymus, inteinų iškirpimas
Galinių grupių modifikacija	N galo aminorūgšties acetilinimas	Mažina baltymo apyvartą greitį: citoplazminių baltymų N galo aminorūgšties acetilinimas
	N galo aminorūgšties acilinimas	Susieja baltymą su membrana: baltymų N galo aminorūgšties acilinimas, pvz. Ras miristoilinimas
Mažų pakaitų reakcijos	Nuolatinė šoninių funkcinų grupių modifikacija	Keičia baltymų funkcijas: pvz. kolageno prolinio hidroksilinimas stabilizuoja tretinę baltymo struktūrą; hormonų tirozino sulfatacija; tiroglobulino jodinimas, protrombino glutamino γ -karboksilinimas
	Vidu- arba tarpmolekulinių disulfidiniai tilteliai	Lemia insulino, imunoglobulinų ir kitų ląstelės išorės baltymų tretinę struktūrą ir funkcijas. Tik endoplazminio tinklo baltymai turi disulfidinių tiltelių, citoplazmoje sintezuotuose baltymuose jų nėra.
	Grižtama šoninių funkcinų grupių modifikacija	Valdo fermentų aktyvumą: pvz. receptorių tirozino kinazių ir Cdk Tyr, Ser, Thre fosforilinimas; Metilinimas – daugeliu atveju funkcija nežinoma; histonų Lys acetilinimas valdo įtaką chromatinui struktūrai
Didelių pakaitų reakcijos	Didelių cheminių grupių prijungimas, veikiantis baltymo funkcijas	Būtinų fermentų aktyvumui nukleotidų prijungimas: pvz., <i>E.coli</i> glutamato sintazės adenilinimas; eukariotų citoplazmos baltymų Ser ar Thre N-acetilgliukozilinimas; hemų prijungimas prie citochromų; poliADPribozilininimas keičia sąveikas su DNR ir kitais baltymais.
	Didelių cheminių grupių prijungimas, keičiantis baltymo vietą ląstelėje	Cys acilinimas nukreipia baltymus prie membranos; GPI inkaro prijungimas sujungia baltymus su membranos paviršiumi; Endoplazminio tinklo baltymų Asp N-glikozilinimas nukreipia į sekretinį kelią; baltymų ubilkvitilinimas nukreipia suardymui 26S proteosomoje;

Geriausiai ištirta PTM yra baltymų fosforilinimas. Sunku trumpai apibūdinti, kokią sudėtingą ląstelės vidaus signalo perdavimo molekulinį mechanizmą, daugybines kaskadinių principu veikiančias baltymų kinazių ir fosfatazių sistemas tyrėjams atvėrė gilinimasis į šią temą. Ji dar nėra išsemta, tačiau

vien fosforilavimo pavyzdžiu galima iliustruoti, kiek ląstelės vyksmų vienu metu galima valdyti prijungiant prie baltymo molekulės arba pašalinant iš jos vieną gana paprastą cheminę grupę.

Pradiniu tyrimų etapu buvo išivaizduojama, kad linijinėje baltymo molekulėje gali būti viena PTM, pavyzdžiui fosforilinė, grupė. Vėliau įsitikinta, kad fosforilinės grupės gali būti prijungtos prie daugiau kaip vienos baltymo molekulės vietos, ir padariniai priklauso nuo to, kurios ir kiek iš galimų vietų yra modifikuotos. Pavyzdžiui baltymas p53 turi net 18 galimų fosforilavimo vietų.

Suvokimui apie PTM sudėtingumą plečiantis, paaiškėjo, kad vienu metu prie baltymo molekulės jungtis nevienodos cheminės grupės. Pabandykime išvardinti bent dešimt galimų modifikacijų – acetilinimas, oksidacija, glutationilimas, acilimas, ADP-ribozilimas, ubikvitilimas, O- ir N-glikozilimas, nitrozilimas, deamidimas. Galimos skirtingo ilgio polimerinės modifikacijos (ubikvitilimas, ADP-ribozilimas), kurios gali būti ir heterooligomerinės (glikozilimas). Kaip matome 1 pav., vienas baltymas gali būti modifikuotas vienu metu keliais skirtingais būdais. Tai reiškia, kad ląstelėje gali egzistuoti dauginės vieno baltymo subpopuliacijos, kurių masė ir krūvis skiriasi. Todėl skirstant dvikryptės elektroforezės būdu vieno geno produktas (baltymas) gali sudaryti daug dėmių.



1 pav. PTM įtaka baltymo subpopuliacijų susidarymui ir baltymų funkcijoms ląstelėje. Baltymo aminorūgščių grandinė pavaizduota linija, kovalentinės modifikacijos – skirtingos spalvos ar formos priedų simboliais.

Dauginių vieno baltymo subpopuliacijų buvimas ypač būdingas sudėtingesnėms eukariotų ląstelėms. Baltymo subpopuliacijos molekulių gali būti daug mažiau, lyginant su bendru baltymo kiekiu arba lyginant su nmodifikuoto baltymo kiekiu (sudaryti mažiau kaip 0,1 proc.). Tačiau jeigu tokiam baltymui būdingos reguliacinės funkcijos, kelios aktyvios jo molekulės gali turėti lemiamos įtakos ląstelės vyksmams.

O dabar „vaizdelį“ papildykime tuo, kad PTM yra nestabilios. Todėl baltymo subpopuliacijų deriniai kinta laike ir erdvėje, priklausomai nuo ląstelės gaunamų ir iš jos perduodamų signalų.

Ligų priežastis gali būti ne baltymų mutacijos, bet sudėtingų ir subtilių PTM persitvarkymų sutrikimai. Tam tikri baltymų PTM variantai gali būti ligų žymenimis arba terapinio poveikio taikiniais.

Normaliems fiziologiniams vyksmams būdingos tipinės modifikacijos, kitos iš jų susijusios su pažeidimais arba senėjimu (pavyzdžiui, oksidacinės baltymų pažaidos).

Labai nedaug žinoma savaiminių, fermentų nekalizuojamų PTM (pavyzdžiui, redukuotų funkcinių grupių oksidacija deguonies aplinkoje). Kita svarbi daugelio PTM savybė yra jų grįžtamumas. Tai reiškia, kad kartu su modifikuojančiais fermentais veikia ir fermentai, kurie šalina modifikaciją ir atkuria pradinę baltymo formą. Pavyzdžiui, baltymų kinazės veikia kartu su fosfobaltymų fosfatazėmis, baltymų acetilazės – su baltymų deacetilazėmis, ubikvitilinantys fermentai – su deubikvitilino fermentais. Tai įgalina tiksliau valdyti dinaminę pusiausvyrą tarp modifikuotų ir nmodifikuotų baltymo formų, vėl atkurti prieš signalo atsaką sukeltą buvusią ląstelės būseną, kad ji būtų pajėgi atsakyti į naują signalą.

Galime apibendrinti, kad **baltymų PTM gali būti:**

- I. Savaiminės/nesavaiminės;
- II. Nesavitos/savitos
- III. Grįžtamos/negrįžtamos
Grįžtamų PTM susidarymą/šalinimą katalizuoja fermentų šeimų “poros”, pvz.:
 - baltymų kinazės/fosfobaltymų fosfatazės,
 - baltymų acetilazės/baltymų deacetilazės,
 - ubikvitilinantys fermentai/deubikvitilino fermentai.
- IV. Daugybines “multi-” (baltymas p53 turi 18 galimų fosforilavimo vietų);
Daugybines “poli-” (vienas baltymas gali būti modifikuotas keliais skirtingais būdais);
- V. Monomerinės/polimerinės (mono ADP ribozilinimas/poliADP ribozilinimas; glikozilinimas, ubikvitilinas)
- VI. Nestabilios, dinamiškos, daugybinių PTM formų pasiskirstymas kinta laike

PTM būdingas mažas santykinis modifikuotų baltymų subpopuliacijos kiekis mažiau kaip 0,1 proc.), lyginant su nmodifikuotais

PTM reiškinys iliustruoja pogenominės eros teiginį, kad genomo nuskaitymas yra tik genomo realizavimo tyrimų pradžia. Sudėtingas genominės informacijos įgyvendinimo kelio tyrimas yra proteomikos tyrimų objektas. Viena iš proteomikos atšakų angliškai vadinama *posttranslatomics*. Nelengva rasti lietuvišką atitikmenį... Bet kuriuo atveju, jau aišku, kad siekiant suprasti, kaip PTM sukelti pokyčiai veikia baltymų funkcijas, gali tekti atlikti gerokai daugiau ir sudėtingesnių tyrimų, nei nuskaitant genomą...

PTM yra vienas iš įrankių, gamtos pritaikytų sudėtingesnių organizmų genomui taupyti. Vieno geno koduojamas baltymas, turintis tam tikrą aminorūgščių seką, priklausomai nuo PTM derinio gali atlikti daug skirtingų funkcijų, panašiai kaip teatro scenoje vienas žmogus, keisdamas makiažą, gali atlikti pačių įvairiausių personažų vaidmenis. Vienodos aminorūgščių sekos baltymo molekulių ląstelėje gali būti daug, tačiau jos gali pasidalinti į PTM subpopuliacijas, kurios tuo pačiu metu atlieka daug skirtingų funkcijų.

Naujausi literatūros šaltiniai teigia, kad metu jau yra žinoma daugiau kaip 300 PTM atmainų. Svarbiausios iš jų išvardytos 2 lentelėje.

2 lentelė. Svarbiausios baltymų posttransliacinės modifikacijos

Modifikacijos tipas	Modifikacija	Modifikuojama aminorūgštis	Jungiamos 1 masė	Savybės, poveikis
Acetilinizimas	Acetilinizimas	S (N galo), K	42,04	N-galo negrįžtama, K – grįžtama. Didina baltymų stabilumą, apsaugo jų N galą. Veikia sąveiką su DNR, kitais baltymais, keičia aktyvumą.
Acilinizimas	Farnezilinizimas	C	204,36	Grįžtama, veikia baltymų ir membranų, baltymų-baltymų sąveikas, lemia vietą ląstelėje
	Miristoilinizimas	G,K	210,36	
	Palmitoilinizimas	C (S,T,K)	238,41	
ADP-ribozilinizimas	Mono-ADP-ribozilinizimas		500	
	Poli-ADP-ribozilinizimas		10 000	
Cys oksidacija	Disulfidinio ryšiai	C	-2	Grįžtama, oksidacinis valdymas
	Glutationilinizimas	C	305,31	
	Sulfeno rūgštis	C	16	
	Sulfino rūgštis	C	32	
Deamidinizimas		N,Q	1	Valdo baltymų-ligandų ir baltymų-baltymų sąveikas
Fosforilinizimas		Y,S,T,H,D	79,98	Grįžtama, veikia baltymų aktyvumą, signalo perdavimą
Glikozilinizimas	O-glikozilinizimas	S,T	>800	Grįžtama, veikia ląstelių sąveiką, sudaro atpažinimo signalus, valdo baltymų aktyvumą, lemia sekreciją
	O-Glc-Nac		203,2	
	N-glikozilinizimas	N	>800	
Metilinizimas	monometilinizimas	K	14,03	Genų raiškos valdymas, baltymų stabilumas
	Dimetilinizimas	K	28,05	
	Trimetilinizimas	K	42,08	
Nitrinizimas		Y	45,0	Oksidacinis pažeidimas
S-Nitrozilinizimas		C	29	Oksidacinis pažeidimas uždegimų metu
Ubikvitilinizimas		K	>1000	Skaidymo signalas.
Sumoilinizimas		K		
Hidroksiprolin			+16	Didina stabilumą, keičia baltymų sąveikas
Piroglutamato rūgštis			-17	Didina stabilumą, blokuoja N galą

Trumpai apibūdinsime penkias baltymų PTM – fosforilinizimą, acetilinizimą, glikozilinizimą, ADP-ribozilinizimą ir ubikvitilinizimą.

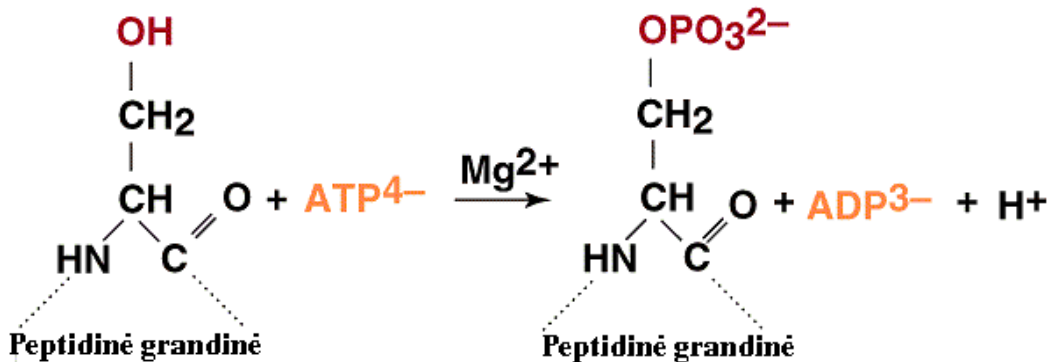
Baltymų fosforilinimas

Baltymų fosforilinimas yra vienu iš labai svarbių reguliacinių ląstelės vidaus signalo perdavimo mechanizmų. Baltymų fosforilinimas svarbus esminiams biologiniams vyksmams – genų raiškai, ląstelės ciklui valdyti. Fosforilinimo sutrikimai yra dažna vėžinių susirgimų priežastis. Daugelis hormonų ir kitų ląstelės veikiančių veiksnių sukelia savitų baltymų, fosforilinančių daugelį kitų baltymų, aktyvumo pokyčius.

1906 m. P.A. Levene nustatė fosfatą baltymo vitelino (fosvitino) molekulėje, 1933 m. – fosfoseriną kazeino molekulėje (kartu su F. Lipmann). Tik po 20 metų E. P. Kennedy aprašė fermentinį baltymų fosforilinimą. 1992 metų Nobelio Medicinos Premija buvo suteikta amerikiečių biochemikams Edmondui Fisherui (Edmond Fischer) ir Edvinui Krebsui (Edwin Krebs) už grįžtamo baltymų fosforilinimo fermentų tyrimus. Fosforilinimo tyrimų intensyvumą apibūdina faktas, kad 2008 vasario mėn. [Medline](#) duomenų bazė nurodo 148 000 straipsnių šia tema.

Fermentai, fosforilinantys baltymus, vadinami baltymų kinazėmis (angl. k. – *protein kinases*). Mielių genome yra 120 baltymų kinazių ir 40 fosfobaltymų fosfatazių. Žmogaus genomą koduoja apie 500 baltymų kinazių – tai viena iš didžiausių baltymų šeimų. Jų substratai, arba fosforilinami baltymai, sudaro 1/3 visų ląstelės baltymų. Baltymų fosfatazių genų žmogaus genome yra apie 100. Fosforilinami gali būti labai įvairūs baltymai – **fermentai**, receptoriai, transkripcijos veiksniai. Apskaičiuota, kad žmogaus proteome yra daugiau kaip 100 000 potencialių fosforilinimo vietų.

Baltymų kinazės perkelia galinę ATP fosfato grupę ant Ser, Thre ar Tyr grupių baltymuose-substratuose. Prokariotams būdingesnis His, Asp, Glu fosforilinimas. Dažniausiai fosforilinamos 1-3 specifinės baltymų aminorūgščių liekanos (2 pav.).



2 pav. Baltymų fosforilinimą katalizuoja baltymų kinazės

Modifikacija sukelia baltymų konformacijos pokytį, nes padidina modifikuojamos molekulės dalies hidrofiliškumą, suteikia jai neigiamą krūvį. Dėl konformacijos pokyčio baltymai įgauna arba praranda tam tikrą aktyvumą („įjungiami“ arba „išjungiami“). Tai gali būti fermentinis aktyvumas, sąveika su kitais baltymais, DNR, ląstelės griaučiais ir pan.

Sunku būtų rasti ląstelės gyvybinių vyksmų, kuriems baltymų fosforilinimas neturėtų įtakos. Ląstelės ciklas, diferenciacija, apoptozė, medžiagų apykaitos valdymas yra vieni iš svarbiausių pavyzdžių. Baltymų fosforilinimo būdu valdomi svarbiausi medžiagų apykaitos ir signalo perdavimo keliai, energijos panaudojimo reakcijos, pvz., Na⁺/K⁺-ATPazė (osmoreguliacija), baltymų-baltymų sąveika, nes fosforilinimas keičia atpažinimo domenų konformaciją. Be to, fosforilinimas svarbus ir baltymų skaidymui – tam tikri baltymai tampa ubikvitino ligazės substratais tik fosforilintos formos).

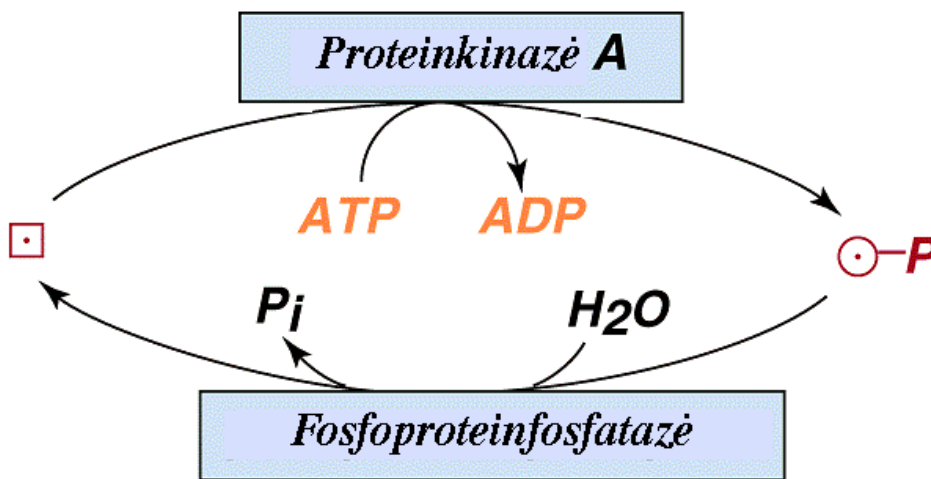
Ląstelės išorės signalus dažnai perduoda nuo cAMP priklausanti baltymų kinazė, vadinama baltymų kinaze A. Aktyvi jos forma katalizuoja nuo Mg²⁺ priklausomą baltymų sekų -Arg-Arg-X-Ser ir Lys-Arg-

X-X-Ser- fosforilinimą. Kitas baltymų kinazės aktyvina Ca^{2+} jonai (baltymų kinazė C), ciklinis GMP (baltymų kinazė G) ir kiti antriniai signalo tarpininkai.

Kita hormonų poveikį reguliuojančių fermentų klasė yra fosfobaltymų fosfatazės. Jos atlieka fosforilintų baltymų defosforilinimo reakcijas (3 pav.).

Fosfobaltymų fosfatazių aktyvumas yra valdomas posttranskripcinių modifikacijų (fosforilinimas/ defosforilinimas, metilinimas), veikiant antriniam signalo tarpininkams (Ca^{2+} /kalmodulinu, cAMP); sąveika su reguliaciniais baltymais ir baltymais-slopikliais. Žinomos dešimtys fosfobaltymų fosfatazių, savitai šalinančių fosfato grupes nuo fosforilintų baltymų. Jų kataliziniai subvienetai susiję su įvairiais reguliaciniais subvienetais, kurie gali lemti substratinį savitumą, t.y., baltymus taikinius.

Fosforilinimo būdu grįžtamai moduluojamas katalizinis svarbių medžiagų apykaitos fermentų aktyvumas. Fermentai, kurių aktyvumas keičiamas grįžtamos kovalentinės modifikacijos būdu, vadinami „interconvertable“ – konvertuojamais arba tarpusavyje kaitomais. Jiems būdingos dvi formos - mažo ir didelio aktyvumo. Modifikuojant viena forma virsta kita. Tam tikrų fermentų aktyvi forma fosforilinta, kitų - atvirkščiai.



3 pav. Baltymų kinazės ir fosfatazės katalizuoja baltymų fosforilinimo–defosforilinimo ciklus

3 lentelė. Konvertuojamų fermentų aktyvumo priklausomybė nuo fosforilinimo

Fermentai, aktyvūs Pi būsenos	Fermentai, aktyvūs dePi būsenos
Glikogenfosforilazė	Glikogeno sintetazė
Citrato liazė	acetilKoA karboksilazė
PDH-kinazės	HMG reduktazė
fosforilazės b kinazė	Piruvato dehidrogenazė
HMG-CoA reduktazė	

Konvertuojantieji fermentai – baltymų kinazės ir fosfobaltymų fosfatazės dažnai patys yra konvertuojami (ypač kinazės) ir griežtai valdomi. Baltymų fosforilinimo ir defosforilinimo nuoseklios sekos vadinamos fosforilinimo kaskadomis. Hormonai gliukagonas ir epinefrinas sukelia cAMP koncentracijos ląstelėje didėjimą ir todėl aktyvina glikogenolizę (aktyvina fosforilazės kinazę ir slopina fosfatazę). Kaskada įgalina sustiprinti mažą pradinį hormono signalą – 10^{-10} M epinefrino sukelia 50%

gliukozės koncentracijos padidėjimą kraujyje. Insulinas turi priešingą poveikį, nes veikdamas per antrinį signalo tarpininką ir kinazes jis aktyvina fosfobaltymų fosfatazes.

Šiuo metu gerai ištirtos ląstelės paviršiaus receptorinės tirozino kinazės ir jų veikimo mechanizmas. Šie receptoriai autofosforilinimo ir fosforilinimo būdu perduoda į ląstelę peptidinių augimo veiksnių, citokinų, hormonų poveikį. Žinoma net 90 žmogaus tirozino kinazių genų, kurios sudaro XVII šeimų. Mitogenų aktyvinamų baltymų kinazių (MAPK kinazių) signalo perdavimo kelias valdo genų raišką, ląstelės ciklą, diferenciaciją, apoptozę. Jų žinomos šešios šeimos. Žinomi ir kiti signalo perdavimo keliai, kurie dažnai yra susiję vieni su kitais, sąveikauja priklausomai nuo ląstelės konteksto.

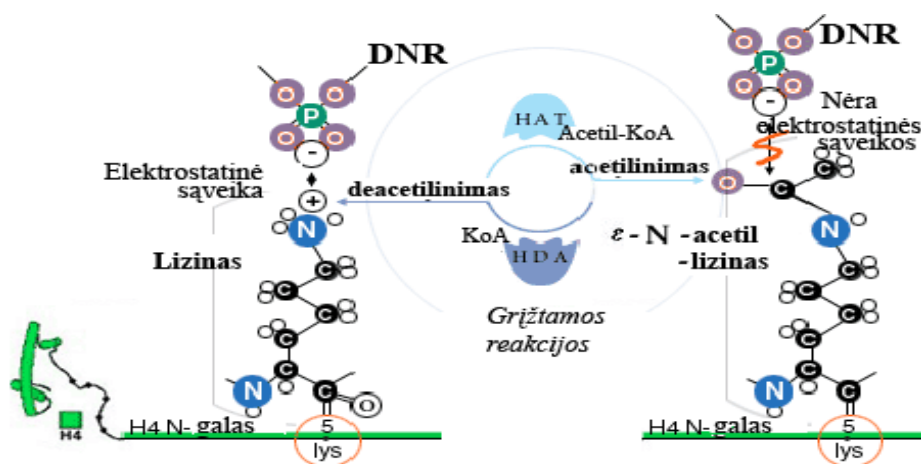
Atsižvelgiant į baltymų kinazių ir fosfatazių katalizuojamų PTM svarbą ląstelės vyksmams, vyrauja nuomonė, kad ląstelės gyvybinių procesų ir jų valdymo supratimas yra neįmanomas be fosfoproteomos tyrimų, t.y., be fosfobaltymų katalogo sudarymo. Šis katalogas reiškia, kad nustatomas visų tam tikros ląstelės galimų fosforilinimo vietų pasiskirstymas, įvertinama alternatyvių baltymų fosfoformų gausa ir jos kitimų dinamika priklausomai nuo sąlygų. Adekvatūs tyrimo metodai buvo sukurti visai neseniai, pasiūlius fosfobaltymų formų koncentravimo technologijas.

Baltymų acetilinimas

Fermentai baltymų acetilazės perkelia acetilgrupes nuo acetil-KoA molekulės baltymų substratų N galo aminogrupėms arba savitoms vidinės baltymo molekulės dalies lizino ϵ -aminogrupėms. Baltymų acetilazių substratai yra labai įvairūs baltymai. Dažnai jie skirstomi į histonus ir nehistoninius baltymus.

Baltymo N galo acetilinimas yra negrįžtamas, skirtingai nuo grįžtamo lizino ϵ -aminogrupių acetilinimo. Kotransiacinis N-galo acetilinimas būdingas net apie 85% eukariotų baltymų (ir fermentams), tačiau retas prokariotų ląstelėse. Tam tikrais atvejais N galo acetilinimas didina baltymų aktyvumą (pavyzdžiui, 50 kartų didina augimo hormoną paleidžiančio veiksnio veiksmingumą), kitais atvejais – mažina (pavyzdžiui, β -endorfino).

Posttransiacinis vidinių baltymo molekulės lizinių acetilinimas būdingas prokariotų ribosomų baltymams ir subrendusiems eukariotų reguliaciniams peptidams. Posttransiaciniu būdu acetilinamas histonų, didelio judrumo grupės baltymų, transkripcijos veiksnių, branduolio receptorių ir α -tubulino lizino ϵ -aminogrupės. Acetilintas lizinas netenka teigiamo krūvio, tai keičia baltymų fermentinį aktyvumą, stabilumą, sąveiką su DNR, kitais baltymais (4 pav.).



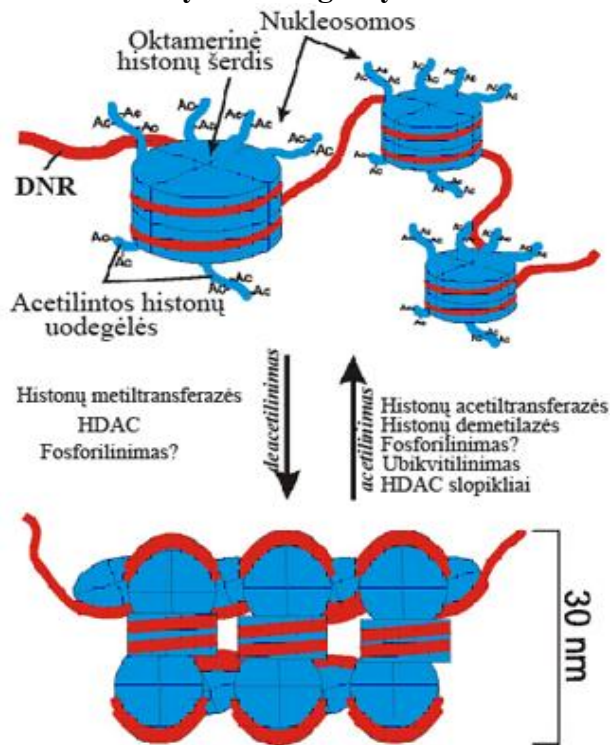
4 pav. Baltymų acetilinimas lemia baltymų elektrostatinių sąveikų pokyčius

Kotransliacinis eukariotinių ląstelių baltymų N galo acetilinimas įvyksta, pradinei 20-50 aminorūgščių ilgio ribosomos sintetinamo baltymo grandinei pasirodžius iš ribosomos plyšio. Nepavyko nustatyti tam tikros savitos acetilinimą lemiančios signalo sekos, nors dažnai acetilinamų baltymų N gale yra daug serino ir alanino. Greičiausiai tai paaiškinama didelio skaičiaus skirtingo savitumo N-acetiltransferazių buvimu. Mielinių N-acetiltransferazių mutantai yra gyvybingi, tai reiškia, kad šių fermentų aktyvumas nėra gyvybiškai svarbus.

Baltymų acetilinimas valdo chromatiną ir transkripcijos aktyvumą. Daugeliui transkripcijos koaktyviklių būdingas baltymų acetilazės aktyvumas, korepresoriams – baltymų deacetilazės aktyvumas. Histonų hiperacetilinimas (histonų acetiltransferazės, HAT) susijęs su transkripcijos aktyvinimu, histonų deacetilinimas (histonų deacetilazės, HDAC) – su transkripcijos represija. Žinoma 18 žinduolių histonų deacetilazių (HDAC). HDAC skirstomos į 3 klases:

- I klasės HDAC (1, 2, 3 ir 8);
- II klasės HDAC (4, 5, 6, 7, 9 ir 10);
- III klasės HDAC – sirtuinai.

III klasės HDAC yra NAD^+ priklausomos baltymų deacetilazės, vadinamos sirtuinais, SIR (*silent information regulator*). Šių fermentų aktyvumas nustatytas bakterijų, augalų, gyvūnų ląstelėse. Sirtuinai: 1. šalina acetilgrupes nuo histonų slopindami tam tikrų genų raišką; 2. slopina acetil-KoA sintetazę šalindami acetilgrupę iš aktyviojo centro. Taigi, baltymų acetilinimo laipsnis priklauso nuo pusiausvyros tarp baltymų acetilazių ir deacetilazių aktyvumo. Histonų acetilinimas keičia chromatiną, silpnina histonų-DNR sąveiką, didina DNR prieinamumą transkripcijos kompleksams, kurių baltymai turi su acetilgrupe susijungiančius bromodomenus. **Histonų hipoacetilinimas yra būdingas tylinčioms heterochromatino sritims** (5 pav.).



5 pav. Histonų acetilinimas turi įtakos chromatino kompaktiškumui

Savitas nehistoninių baltymų acetilinimas (pvz., p53, E2F) keičia jų aktyvumą, vietą, sąveikas, stabilumą.

Reguliacinės baltymų acetilinimo funkcijos labai plačios, šiuo būdu valdomi vyksmai:

- transkripcija,
- proliferacija,
- diferenciacija,
- apoptozė,
- imuninės sistemos aktyvumas,
- cirkadiniai ritmai,
- atmintis.

Svarbu ir tai, kad baltymų acetilinimo sistema yra potencialus vaistų taikynys tam tikrų ligų atvejais.

Baltymų glikozilinimas

Baltymų glikozilinimas susidarant glikozilintiems baltymams arba glikobaltymams, yra endoplazminio tinklo ir Goldžio komplekso baltymams būdinga PTM. Reakcijas, kurių metu prie baltymo aminorūgščių radikalų jungiamos sacharidinės molekulės (oligosacharidai arba glikanai), katalizuoja fermentai glikoziltransferazės. Net apie 50% eukariotų baltymų yra glikozilinti. Didžioji dauguma glikobaltymų yra sekretinės sistemos baltymai, kiti – endoplazminio tinklo, Goldžio komplekso, lizosomų ir plazminės membranos baltymai. Esminis glikozilintų baltymų sacharidinės dalies skirtumas nuo homomerinių atsargos ir struktūrinių polisacharidų (glikogeno, krakmolo, celiuliozės) yra tai, kad jie yra informacinės molekulės. Šie oligosacharidai sudaryti iš įvairių monomerų, kurių seka, skaičius ir grandinės šakotumo pobūdis nėra atsitiktiniai, tačiau tiksliai užprogramuoti ir prasmingi, panašiai kaip nukleotidų seka nukleorūgščių arba aminorūgščių seka baltymų molekulėse.

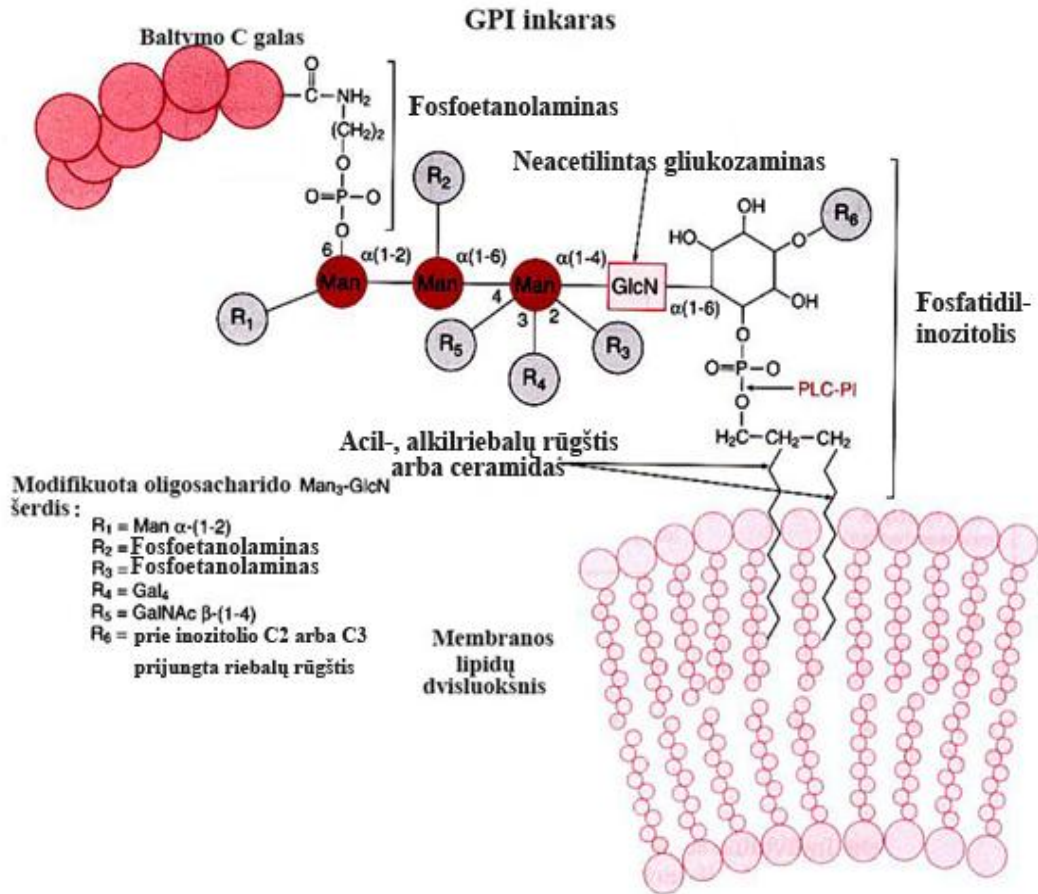
Žinomos trys svarbiausios baltymų glikozilinimo atmainos:

- N-glikozilinamas;
- O-glikozilinamas;
- Glikozilfosfatidilinozitolio (GPI) inkaro prijungimas (6 pav.).

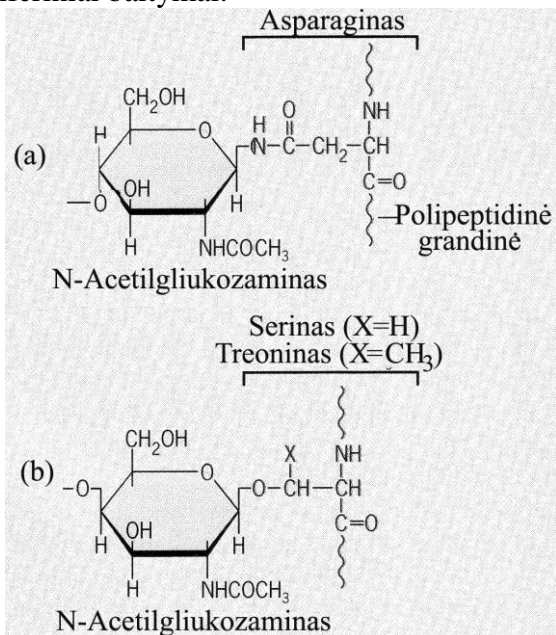
Baltymai N-glikozilinami, kai oligosacharidas jungiamas prie baltymų Asp -NH₂ grupės, arba O-glikozilinami, kai tai vyksta per Ser-OH ar Thr-OH grupes (7 pav.). Tokia modifikacija keičia baltymų tretinę struktūrą ir savybes: stabilumą, tirpumą, poliškumą, sąveiką su membranomis, fizinių dydį. Prie baltymo prisiūta oligosacharidinė dalis yra tolesnio jų atpažinimo signalas kitiems baltymams ar ląstelėms.

Žinoma apie 100 glikoziltransferazių (priklausančių 7 klasėms), pasižyminčiu trejopu specifiškumu:

- a) prijungiamam sacharidui, nes susidaręs oligosacharidas turi įvairių monomerų sudėtį (ET dažniausiai prijungiami N-acetil-gliukozaminas, manozė, gliukozė);
- b) baltymui-substratui;
- c) sudaromų ryšių konfigūracijai.

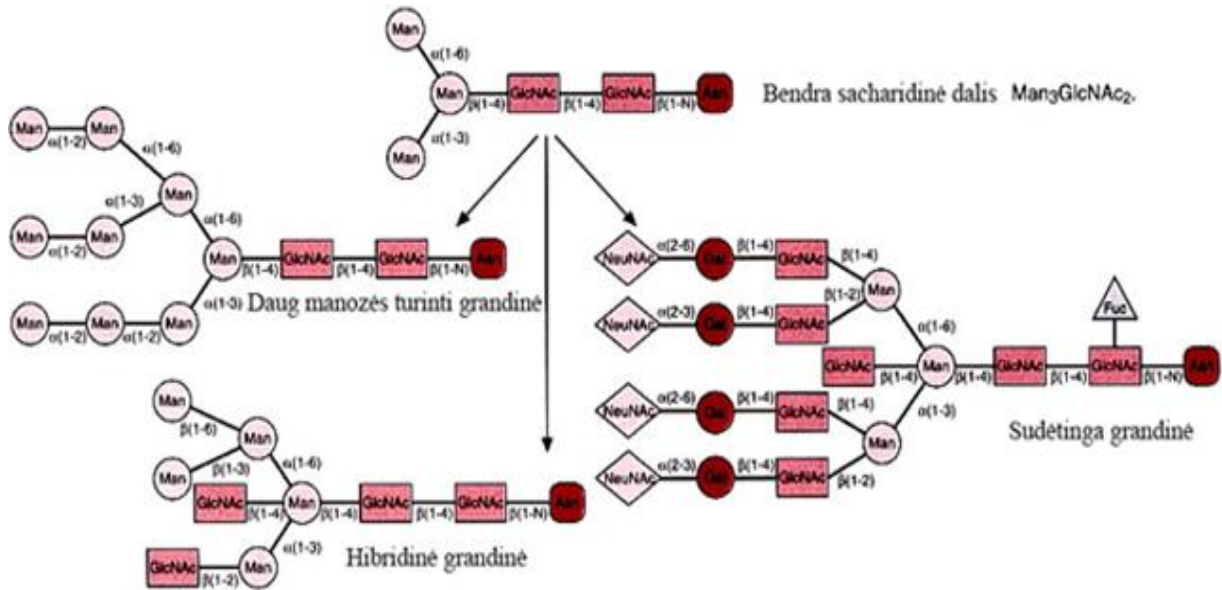


6 pav. GPI inkaru dažniausiai prie plazminės ląstelės membranos išorės kovalentiškai jungiami periferiniai baltymai.



7 pav. Baltymų N-glikozilinimo (a) ir O-glikozilinimo (b) metu susidarantys glikozidiniai ryšiai.

N-glikozilinimas būdingas tik eukariotams. Jis vyksta endoplazminiame tinkle ir yra kotransliacinis. Tai savita eukariotų kovalentinė baltymų modifikacija, būtina jų paskirstymui įvairiose organelėse. O-glikozilinimas dažniau potransliacinis ir vyksta Goldži komplekse, kur modifikuojami jau pilnai susiformavę baltymai. O- ir N-glikozilinimo metu prisiuvamų oligosacharidų sudėtis skiriasi. GPI inkaras yra prijungiamas prie baltymo C galo, pašalinus C galo signalo seką.



8 pav. N-glikozilintų baltymų oligosacharidinių grandinių tipai, susidarantys po nuoseklių baltymų modifikacijų endoplazminiame tinkle ir Goldžio komplekse. Man – manozė, Gal – galaktozė, Fuc – fukozė, GlcNac – N-acetilgliukozaminas, Asn – asparaginas.

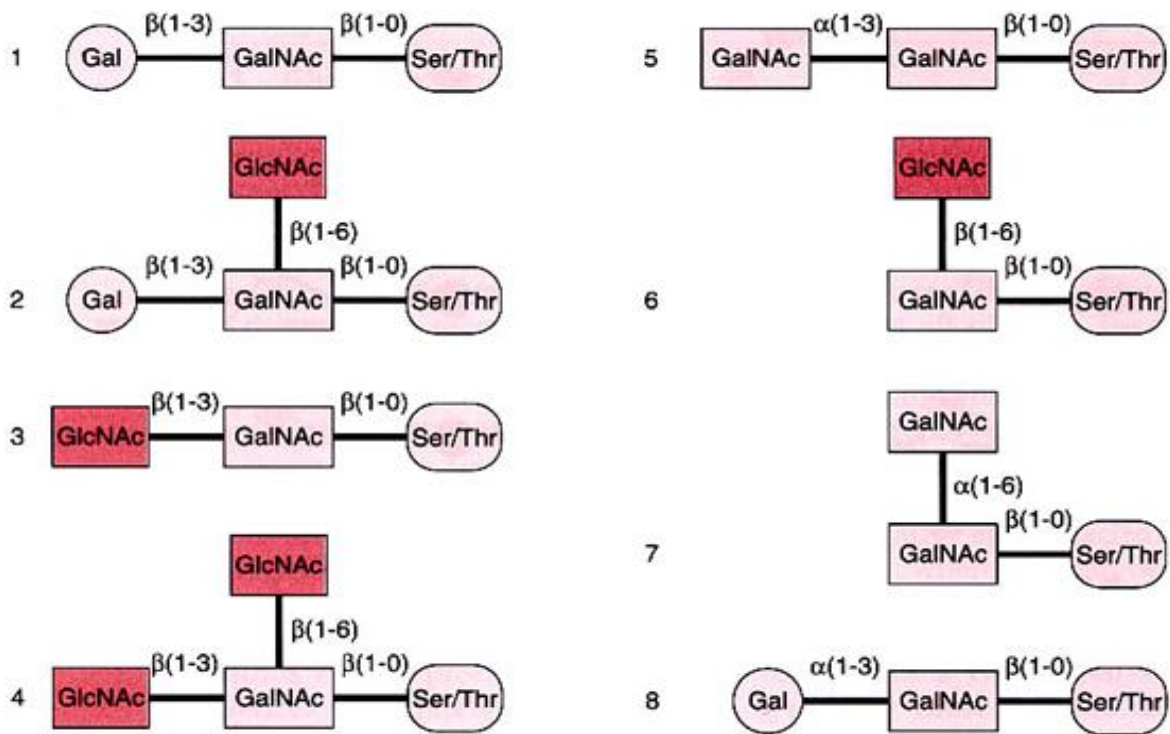
N-glikozilinimo metu prie endoplazminio tinklo baltymų specifinių sekų jungiamas iki 14 įvairių sacharidų žiedų savitas oligosacharidas, kuris prasideda N-acetilgliukozaminu (GlcNac) (8 pav.). Dažniausiai jis turi kelias šakas, į kurias įjungiamas daug manozės ir GlcNac, o šakų galuose yra neigiamai įkrautos sialo rūgšties (NANA) grupės – Glc₃Man₉(GlcNac)₂. Tokios sudėties oligosacharidas būdingas augalų, protistų ir gyvūnų endoplazminiam tinklui.

Tai įvyksta dar transliacijos metu (kotransliacinė modifikacija), katalizuojant endoplazminio tinklo membranoje esančioms. Šie fermentai specifiskai atpažįsta sekas -Asn-X-X-X-Ser- ir Asn-X-Thr. Kiekvienai ląstelei būdingas glikoziltransferazių rinkinys lemia savitą glikoproteinų oligosacharidinės dalies (turinčios informacinio polimero funkciją) sudėtį. Tam tikros grandinės labai sudėtingos. Jų augimas sustoja, kai nėra atitinkamo savitumo glikoziltransferazių. Oligosacharidinė glikoproteinų žymė toliau modifikuojama glikozidazių, kurių funkcija yra nukreipti baltymus į Goldžio kompleksą. Trijų gliukozės grandžių prisiuvimas endoplazminio tinklo oligosacharido dariniui yra žymė, leidžianti baltymui toliau keliauti į Goldžio kompleksą.

Goldžio komplekse baltymų N-oligosacharidinė grandinė keičiama O-glikozilinimo būdu, taip kad susidaro savitas kiekvienam baltymui oligosacharidų darinys, kuris tampa informacine molekule. Tokios oligosacharidų grandinės lemia plazminės membranos baltymų imunogenines savybes, kraujo grupes, svarbios ląstelių atpažinimo ir adhezijos procesams. O-glikozilinimui būdingos trumpos 1-4 sacharidų grandinės, kurios susidaro, glikoziltransferazėms jungiant po vieną monomerą. Į glikobaltymų

oligosacharidų sudėtį gali įeiti net 30 skirtingų sacharidinių monomerų. Tokiu būdu susidaro labai didelė oligosacharidinių dalių įvairovė. Atsižvelgiant į grandinių sudėtį, skiriamos tris jų atmainos: (i) daug manozės turinčios; (ii) hibridinės ir (iii) sudėtingos (8 pav.). O-glikozilintiems baltymams būdinga daug didesnė grandinių tipų įvairovė (9 pav.).

Cis-Goldžio tinkle fosforilinami lizosominių baltymų oligosacharidai. Goldžio komplekso *cis*-cisternose N-oligosacharidui $\text{Glc}_3\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$ pirmiausiai pašalinamos trys Glc grandys, po to šakos dar sutrumpinamos, hidrolizuojant 3 manozės grandis – susidaro $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$. Taip pažymėti baltymai pereina į medialinę Goldžio komplekso dalį, kurioje po 4 nuoseklių modifikacijos reakcijų oligosacharide lieka tik 3 manozės, kurių kiekviena esterifikuota GlcNAc. Atšakos pagrinde esantis GlcNAc glikozilinamas fukoze. *Trans*-cisternose prie šakų galų jungiamos galaktozės ir NANA grandys. *Trans*-Goldžio tinkle prie sacharidų ir baltymų tirozino grupių jungiamos sulfogrupės $-\text{OSO}_3\text{H}$. Neuronų adhezijos baltymui prisiuvama polisialo rūgštis. Glikoproteininiai hormonai žymimi specifinio glikozilinimo ir sulfoninimo reakcijomis ir nukreipiami į saugojimo granules, kuriose koncentruojami ir saugomi.



9 pav. O-glikozilintų baltymų oligosacharidinių grandinių tipai (pavaizduota tik struktūros šerdys). Gal – galaktozė, GlcNAc – N-acetilgliukozaminas, GalNAc – N-acetilgalaktozilaminas, Ser/Thr – serinas arba treoninas.

Goldžio komplekso baltymų modifikacijos skirtingos augalų, žinduolių, mielių ir vabzdžių ląstelėse. Bakterijoms baltymų N-glikozilinimas nebūdingas, todėl tam tikrais atvejais juose sintezuojamų rekombinacinių baltymų aktyvumas gali būti nepakankamas, jeigu jų biologiškai aktyviai konformacijai sudaryti būtinas glikozilinimas.

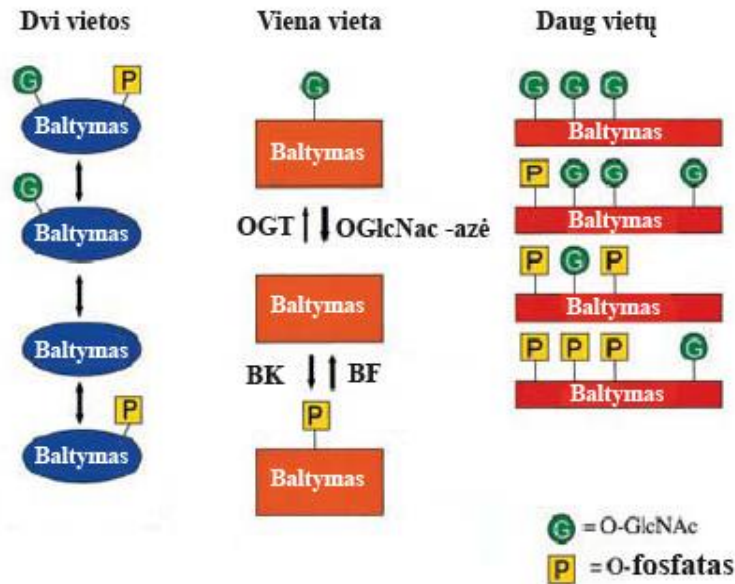
4 lentelė. Glikozilintų baltymų funkcijos

Funkcija	Glikoproteinas
Struktūrinės molekulės	Kolagenas
Lubrikantai/apsauginės molekulės	Mucinai
Pernašos baltymai	Transferinas, ceruloplazminas
Imuninės sistemos baltymai	Imunoglobina
Audinių suderinamumo baltymai	Antigenai
Hormonai	Chorioninis gonadotropinas, TSH
Fermentai	Šarminė fosfatazė
Ląstelių sukibimo/atpažinimo baltymai	Baltymai svarbūs ląstelės-ląstelės, ląstelės-ląstelės –bakterijų sąveikai
Antifrizai	Šaltavandenių žuvų baltymai
Sąveika su savitais sacharidais	Lektinai, selektinai
Receptoriai	Baltymai svarbūs receptorių ir vaistų poveik
Baltymų susilankstymas	Kalretikulinas, kalneksinas
Homeostazė ir trombozė	Kraujo kūnelių paviršiaus glikobaltymai
Vystymosi valdymas	Notch baltymai

Net to paties organizmo ląstelės baltymams būdingas tam tikras N-glikozilinimo heterogeniškumo laipsnis, tam tikras kiekybinis glikoformų pasiskirstymas tiek pagal oligosacharidinės dalies sudėtį, tiek pagal glikozilinimo vietą.

Lyginant baltymų fosforilinimą ir O-glikozilinimą, galima pastebėti, kad abiem atvejais kovalentiškai modifikuojamos baltymų serino ir treonino funkcinės grupės. Tai reiškia, kad šios dvi PTM gali konkuruoti dėl jungimo vietų baltymų molekulėse. Todėl baltymų glikozilinimo ir fosforilinimo laipsnis gali priklausyti nuo dviejų grupių modifikuojančiųjų fermentų (baltymų kinazių/baltymų fosfatazių ir baltymų O-glikoziltranserazių/glikozidazių) aktyvumą ir jų dinaminės pusiausvyros (10 pav.).

Greičiausiai, toks reciprokinis dviejų baltymų PTM valdymas suteikia papildomų reguliacinių galimybių ir priklausomybės nuo platesnio veiksnių konteksto, veikiant sudėtingiems ląstelės signalo perdavimo keliams.

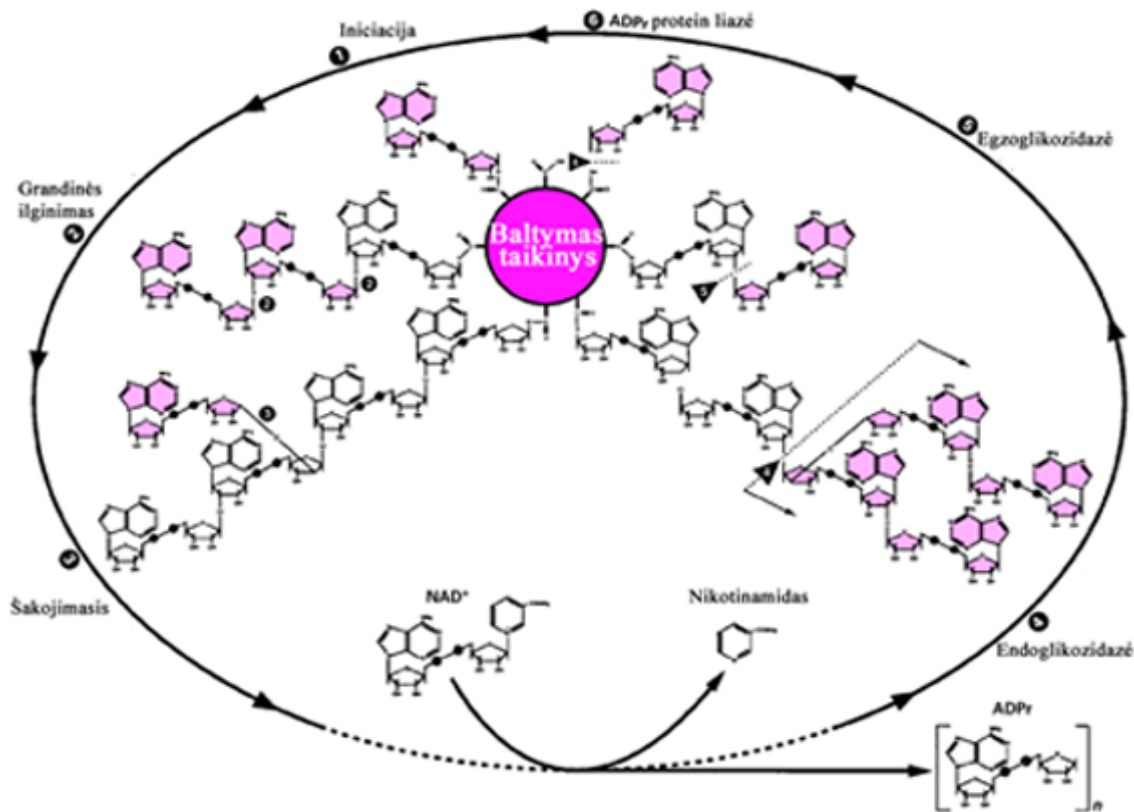


9 pav. O-glikozilintų baltymų grupių kiekis gali priklausyti nuo fosforilintų baltymų grupių kiekio ir atvirkščiai.

ADP-ribozilinimas

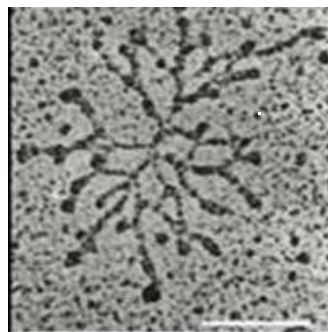
Baltymų ADP ribozilinimas yra dviejų atmainų:

- 1) mono ADP-ribozilinimas, kurio metu prie baltymų jungiama viena ADP-ribozės grupė. Reakciją katalizuoja fermentas NAD ADP-riboziltransferazė, kuris ant baltymų nuo NAD^+ molekulės perkelia ADP-ribozę. Reakcijos metu susidaro niacinamidas. Ši modifikacija labiau būdinga prokariotams. Pavyzdžiui, *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum C3*, *Bordetelia pertussis*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium* NAD ADP-riboziltransferazės katalizuoja ląstelės šeimnininko signalo perdavimo G ir Rho baltymų aminorūgščių (Arg, Asp, Cys, Ser, Thr) monoADP ribozilinimą [Ziegler M., 2000]. Eukariotų ląstelių NAD ADP-riboziltransferazės aktyvumas būdingas ląstelės išorės baltymams (sekretuojamiems arba GPI inkaro baltymams).
- 2) Baltymų poliADPribozilinimas yra „sunkiausia“ kovalentinė baltymų modifikacija, būdinga tik eukariotams (išskyrus mieles). Jam vykstant, prie baltymų jungiami linijiniai arba šakoti ADP-ribozės polimerai, į kurių sudėtį įeina iki 200 monomerų (10 pav). Reakciją katalizuoja fermentas poli(ADP-ribozės) sintetazė arba poli(ADP-ribozės) polimerazė (PARP), kuri yra gausiausias branduolio baltymas (kiekvienoje ląstelėje yra iki 1 mln. izoformos PARP1 kopijų). Šiuo metu nustatytos 8 tipų PARP izoformos, žinoma 17 šios šeimos narių.



10 pav. Baltymų poliADP-ribozilinimo iniciacijos, polimero grandinės ilginimo ir šakojimosi reakcijas kanalizuoja PARP, o polimero hidrolizę – poliADPribozės glikohidrolazė, PARG. Paskutinį monomerą nuo polimero pašalina trečias fermentas –ADPribozilbaltymų liazė.

Baltymų poli(ADP)ribozilinimo metu susidarantis poli(ADP)ribozės polimeras gali būti priskiriamas prie trečiojo nukleorūgščių tipo, nes jam būdinga spiralinė struktūra. Šis elektroniniu mikroskopu matomas polimeras vadinamas dygliakiaulės struktūra (11 pav.).



11 pav. PoliADPribozės polimero vaizdas elektroniniu mikroskopu

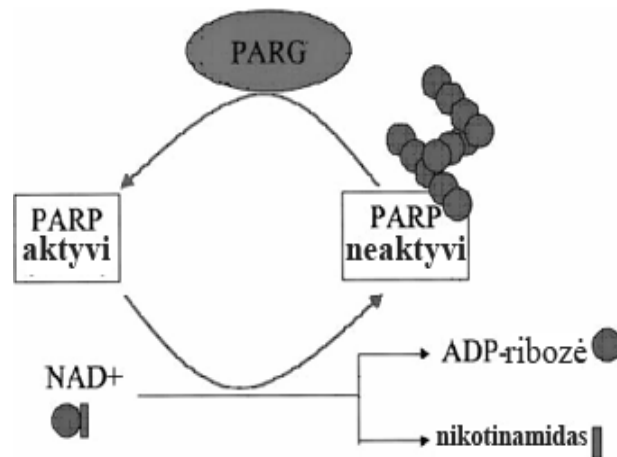
Homopolimeras ADPr: -r-P-P-r(A)-r-P-P-r-(A)-r- prie baltymų jungiamas per Glu γ -karboksigrupes. Vieno 200 monomerų ilgio „baltymo papuošalo“ molekulinė masė gali siekti 10 kDa. Tai gali lemti labai didelį baltymo masės pokytį. Be to, vienas baltymas gali turėti kelias modifikacijas

vietas. Polimeras turi daug neigiamo krūvio fosforilinių grupių, todėl stipriai keičia baltymų sąveikas su DNR, kitais baltymais ar kitomis ląstelės struktūromis.

PoliADP ribozilinimo poveikis yra baltymo taikinio aktyvumo slopinimas, o biologinė funkcija priklauso nuo taikinio. PARP taikiniai yra labai įvairūs baltymai – pats PARP autoribozilina save, transkripcijos veiksniai, DNR pažeidų taisymo fermentai, histonai, imuninės sistemos baltymai, signalo perdavimo baltymai ir kt.

PARP yra indukuojami fermentai, kurių aktyvumas yra sudėtingai valdomas: viengrandžiai DNR trūkiai aktyvina PARP apie ~500 kartų, autoribozilinimas slopina ir silpnina sąveiką su DNR, fosforilinimas (baltymų kinazė C) – slopina; fosfolipazės C - IP3 - Ca²⁺ signalo kelias aktyvina nepriklausomai nuo DNR trūkių, niacinamidas ir purinai – slopina.

Baltymų poliADP-ribozilinimo laipsnį lemia pusiausvyra tarp poliADPribozilinimo ir pADPr polimero hidrolizės. pADPr hidrolizę katalizuoja 111 kDa poli(ADP-ribozės) glikohidrolazė, PARG, kuri hidrolizuoja polimerus ir nuo autofosforilintos PARP, taip atkurdamą PARP aktyvumą (12 pav.).



12 pav. Baltymų (tarp jų ir PARP) poliADPribozilinimo laipsnis priklauso nuo pusiausvyros tarp PARP ir PARG aktyvumo.

Normaliomis sąlygomis PARG pilnai kompensuoja PARP aktyvumą. Todėl poliADPr polimero gyvavimo puslaidis yra mažesnis nei 1 min. Tačiau PARP stipriai aktyvinama oksidacinio streso arba genotoksinio pažeidimo sąlygomis atsiradus viengrandžiams DNR trūkiams. Stiprus genotoksinis pažeidimas taip stipriai aktyvina PARP, kad gali sukelti visos ląstelės NAD⁺ sancaupos sunaudojimą per 15 min. [Yu, 2002]. Teigiama, kad PARP yra dvideidis (Jin ir Jan) ląstelės aktorius: jeigu ląstelės DNR pažeidimas nėra labai stiprus, PARP veikia kaip angelas sargas, greitinantis jų taisymą ir padedantis ląstelei išlikti; tačiau jeigu pažeidimas yra stiprus, PARP hiperaktyvinimas sukelia energijos krizę ir gerokai paspartina ląstelės mirtį. Tokiais atvejais PARP slopikliai stabdo nekrozę ir nukreipia pragaištingus vyksmus audiniui palankesnio mirties kelio – apoptozės link.

Biologinių baltymų poliADPribozilinimo funkcijų sąrašas labai platus [Virag, 2005]:

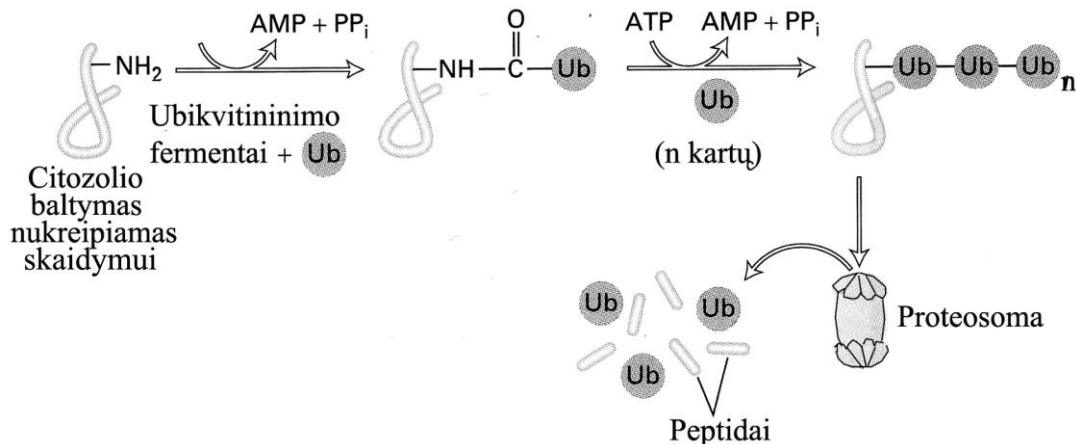
- PARP vadinamas “angelu sargu”, nes svarbus DNR pažeidų taisymui ir genomo apsaugai.
- Chromatino remodeliavimas.
- Replikacijos ir diferenciacijos valdymas. PARP - replikosomos sandas.
- Reguliuoja baltymų raišką, nes PARP jungiasi su iRNR. Streso metu aktyvina teisingų iRNR transkripciją
- PARP reguliuoja telomerazės aktyvumą.

- PARP gali ląstelės žūties kelią nukreipti nuo apoptozės į nekrozę.
- Poli(ADP)r gali būti naudojamas ATP sintezei.
- Baltymų (20S proteosomos) poli(ADP)ribozilimas skatina baltymų skaidymą oksidacinį streso metu.
- PARP svarbi ląstelės griaučių struktūrai (padidinta raiška sutrikdo F-aktino struktūrą).

Ubikvitilimas

Ubikvitilimas yra paskutinė PTM baltymų „gyvenime“, kuri lemia jų suardymą. Savitas eukariotų baltymas ubikvitiną (Ub, angl. k. - *ubiquitin*) yra baltymų skaidymo žymė. Ub yra pats konservatyviausias (mielių ir žinduolių Ub skiriasi tik 3 aminorūgštim) iš visų žinomų baltymų. Tai mažos molekulinės masės ($M_m = 8451$) 76 aminorūgščių ilgio baltymas, paplitęs visose eukariotinėse ląstelėse (todėl pavadintas ubikvitinu). Ląstelėje Ub gali būti laisvas arba prisijungęs prie kitų baltymų. Ub prijungimas (ubikvitinimas) yra baltymo „pažymėjimas sunaikinimui“. Prie kitų baltymų Ub jungiasi izopeptidiniu ryšiu: Ub C-galo glicinas grįžtamai ir savitai jungiasi su „žymimo“ baltymo Lys- ϵ -NH₂ grupe. Vienos Ub molekulės nepakanka skaidymo signalui sudaryti, tai gali būti tik rūšiavimo signalas. Prie skaidymui nukreipiamo baltymo jungiama poli-Ub grandinė (13 pav.), kuri dažnai būna išsišakojusi, tarsi „šluota“.

Susidarant poli-Ub, sekantys Ub monomerai gali būti jungiami prie jau prijungto Ub Lys- ϵ -NH₂ grupių, esančių 29, 48 ir 63 padėtyse. Modifikacija pirmose dviejose padėtyse turi skaidymo žymės prasmę, tačiau nuo 63 padėties prasidedanti grandinė lemia kitokių baltymų likimą.



13 pav. Baltymų kovalentinė modifikacija ubikvitinu (Ub) yra nukreipimo proteolizei 26S proteosomoje žymė.

Sąveika su poli-Ub yra būtina greitai šalinamų baltymų skaidymui. Baltymų poliubikvitilimą lemia trys fermentai:

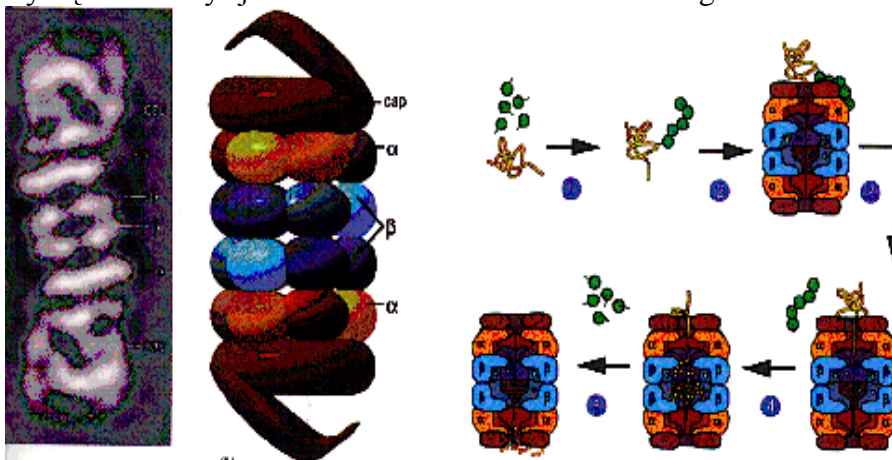
- aktyvinantis fermentas E₁ katalizuoja Ub aktyvinimą, prijungiant jį prie fermento E₁ tioesterine jungtimi:
- konjuguojantis fermentas E₂ sudaro tioesterinį ryšį su Ub: Ub* - E₂. Šis fermentas savitai jungia ubikvitiną prie žymimų baltymų Lys- ϵ -NH₂ grupės, gali būti ubikvitinamos kelios Lys grupės iš karto.
- Ub-ligazė E₃ lemia savitą sąveiką su baltymu substratu

Substrato pažinimą lemia E₂ ir E₃ heterodimerai. Prie pirmos Ub grupės jungiamos kitos Ub molekulės, taip formuojama šakota struktūra, kurią atpažįsta 26S proteazė. Kai nuo ATP priklausoma 26S proteazė suardo pažymėtą baltymą, Ub atsilaisvina sekančiam skaidymo ciklui.

Reguliaciniu požiūriu labai svarbus yra baltymų modifikacijos ubikvitinu grįžtamumas. Susidariusios ant įvairių baltymų poli-Ub grandinės labai dinamiškos, prie jų gali būti greitai pridamos ar pašalinamos Ub liekanos. Baltymų ubikvitininimo laipsnį lemia sudėtingai reguliuojama pusiausvyra tarp ubikvitininimo ir deubikvitininimo reakcijų. Tai atlieka deubikvitininimo fermentai, kurie keisdami baltymų ubikvitininimo laipsnį, keičia jų skaidymo 26 S proteosomoje tikimybę.

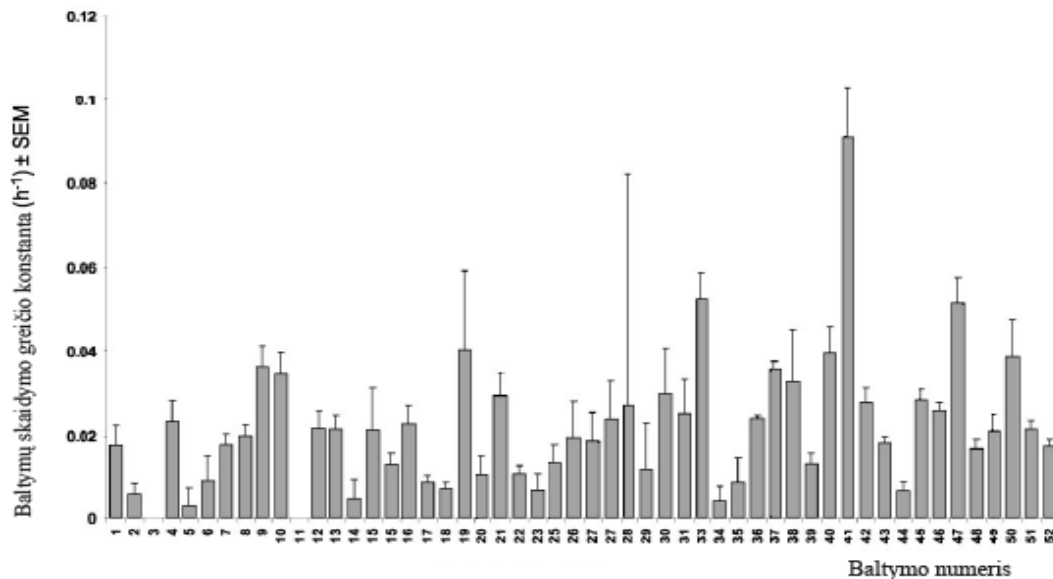
Ub pažymėti seni baltymai prijungiami prie 26S proteosomos 19S komplekso atpažinimo subvieneto, išvyniojami ir pernešami į proteosomos 20S šerdies ertmę, kur yra labai greitai suardomi (14 pav.).

Ypač greitai ubikvitiliniami oksiduoti baltymai. Kita vertus, apskaičiuota, kad net apie 30 proc. naujai susintetinamų baltymų yra iš karto suardomi, nes turi struktūros defektų. Svarbiausia ubikvitilininimo savybė yra tai, kad jis užtikrina labai savitą ląstelės vidaus baltymų skaidymą (15 pav.). Baltymų „žymėjimo ubikvitinu“ greitis priklauso nuo tam tikrų jo sekos ypatumų – N galo aminorūgščių sudėties (Varšavskio N galo taisyklė), taip vadinamų PEST arba skaidymo dėžių sekų buvimo. Šie baltymo skaidymą skatinantys jo struktūros elementai vadinami degronais.



14 pav. 26S proteosomos rentgenostruktūrinė nuotrauka, modelis ir veikimo schema. Cap – reguliacinis subvienetas, 20S centrinę šerdį sudaro keturi heptameriniai žiedai iš α ir β subvienetų.

2003 m. Gygi ir autoriai atliko mielių *Sach. cerevisiae* baltymų ubikvitilininimo tyrimus. Jie sukūrė mielių kamieną, turintį šešis papildomus histidino kodonus turintį ubikvitino geną. Šių mielių ląstelėse vyko N galo histidino „vėliavą“ turinčio ubikvitino raiška. Tyrėjai nustatė daugiau kaip 1000 ubikvitilintų baltymų, tiksliai nustatė 110 ubikvitilininimo vietų 72 baltymuose. Tokio pobūdžio tyrimai vadinami ubikvitinomika [Peng, 2008].



15 pav. Tirpių mielių baltymų skaidymo greitis yra labai nevienodas (Pratt et al.).

Literatūra:

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

R.M. Twyman. Principles of Proteomics, 2004, Taylor&Francis group, New York

Yu et al., Science 297, 2002, p. 259.

[Pollak N, Dölle C, Ziegler M.](#) Biochem J. 2007 Mar 1;402(2):205-18.

[Ziegler M.](#) Eur J Biochem. 2000 Mar;267(6):1550-64.

[Berger F, Ramírez-Hernández MH, Ziegler M.](#) Trends Biochem Sci. 2004 Mar;29(3):111-8.

[Virág L.](#) Curr Vasc Pharmacol. 2005 Jul;3(3):209-14.

http://finley.med.harvard.edu/ubiquitin/chapters/Peters_et_al.html

<http://www.nottingham.ac.uk/biochemcourses/students/ub/ubindex.html>

[Peng J.](#) BMB Rep. 2008;41(3):177-83.

[Weake VM, Workman JL.](#) Mol Cell. 2008 Mar 28;29(6):653-63.

Teasdale R.D., Jackson M.R. Annu Rev Cell Dev Biol. 1996;12:27-54.

Pratt JM, Petty J, Riba-Garcia I et al. Mol.Cell. Proteom., 2002, 1, 579-591.