



UNIVERZA  
V LJUBLJANI

**FKKT**

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

# MODIFIKACIJA PROTEINOV Z LIPIDI

Mentor: prof. dr. Igor Križaj

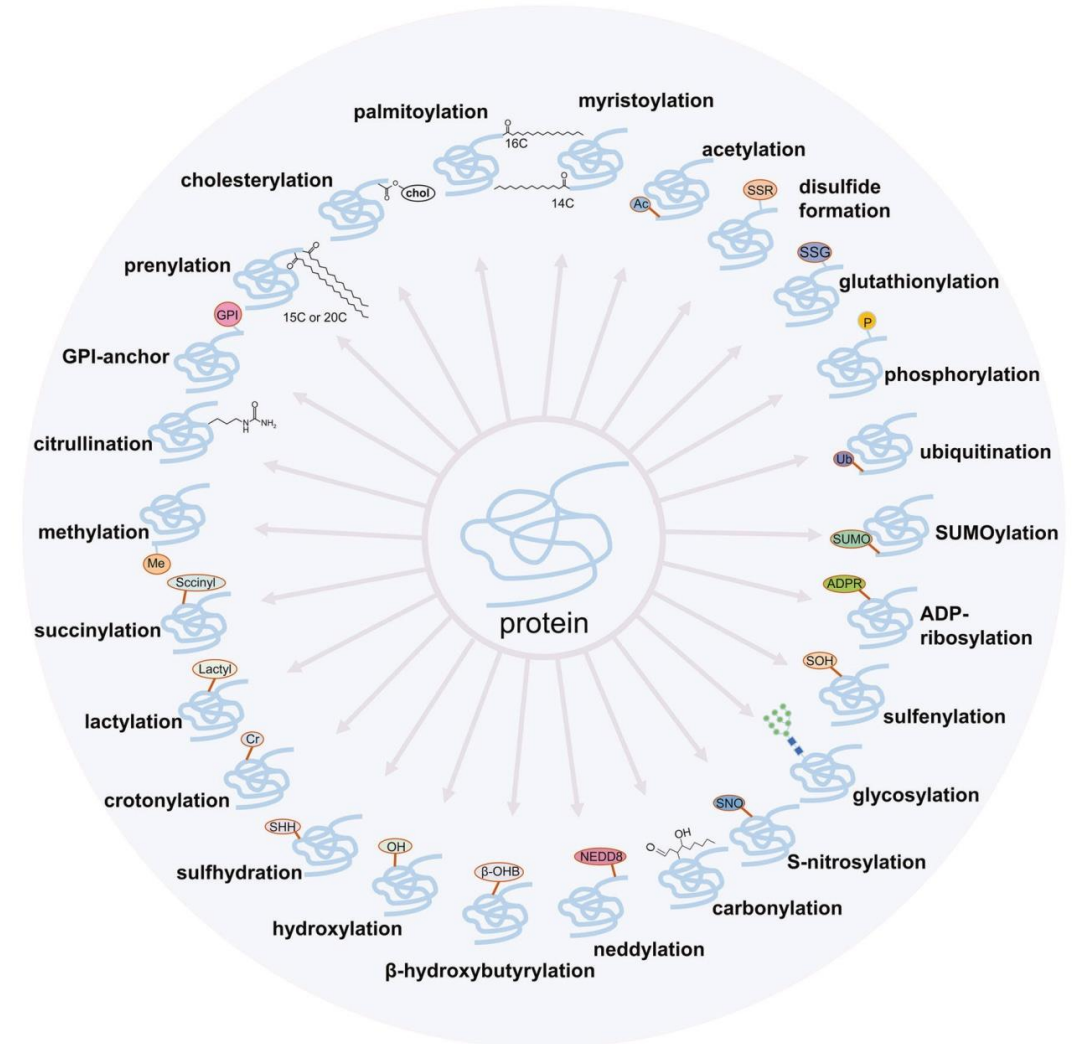
Ljubljana, maj 2025

*Seminarska naloga pri predmetu Biološke membrane*

Ena Kartal, Irina Kostadinowska, Nataša Vujović, Miljan Trajković, Erik Štromberger

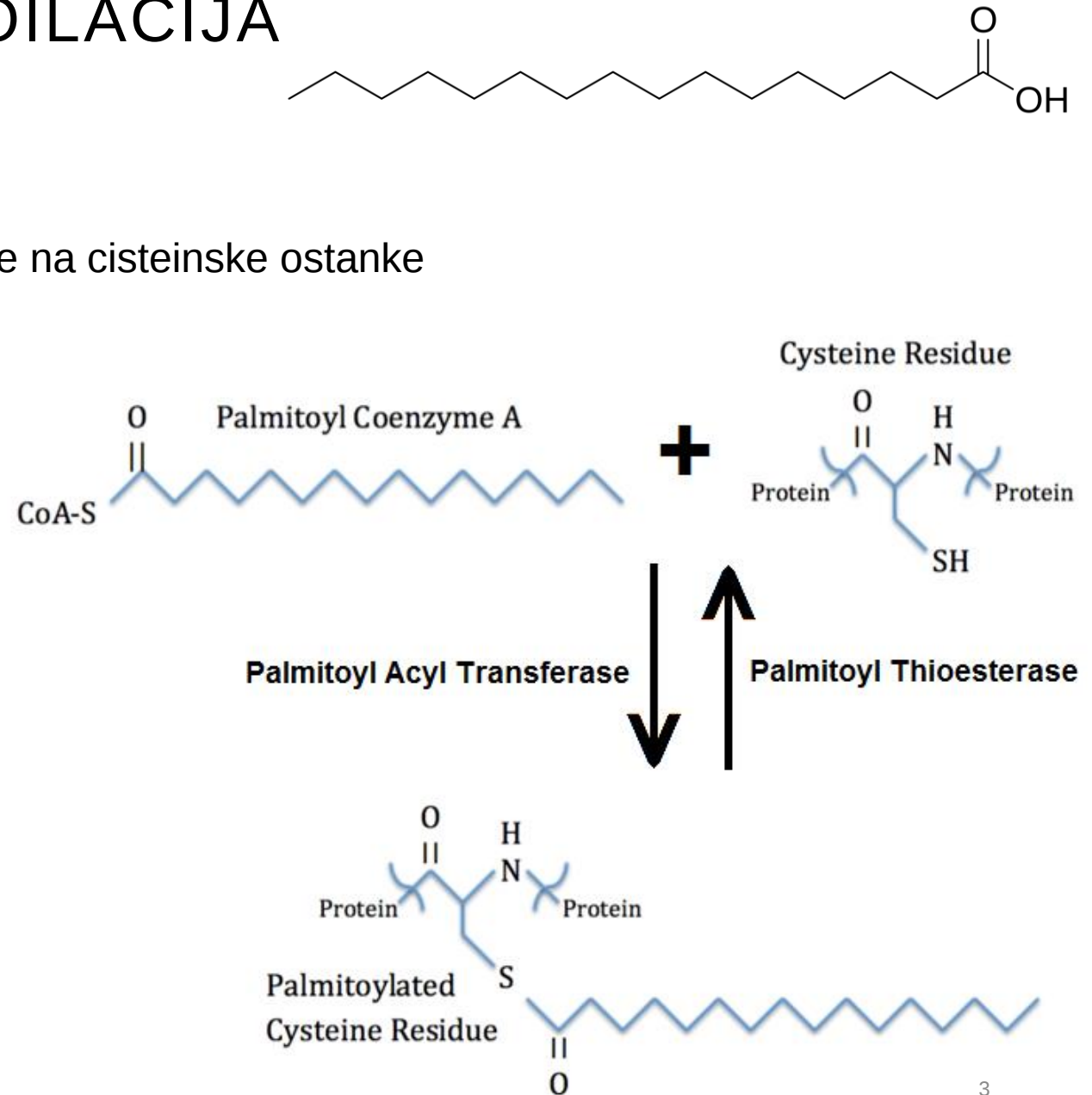
# UVOD

- Modifikacije proteinov z lipidi – **posttranslacijske modifikacije**, pri katerih se kovalentno vežejo maščobne kisline, izoprenoidi, steroli
- Povečana hidrofobnost omogoča:
  - Sidranje v membrane
  - Pravilno lokalizacijo (plazemska membrana, endomembrane)
- Stabilizacija in zaščita pred razgradnjo
- Sprememba konformacije → vpliv na interakcije



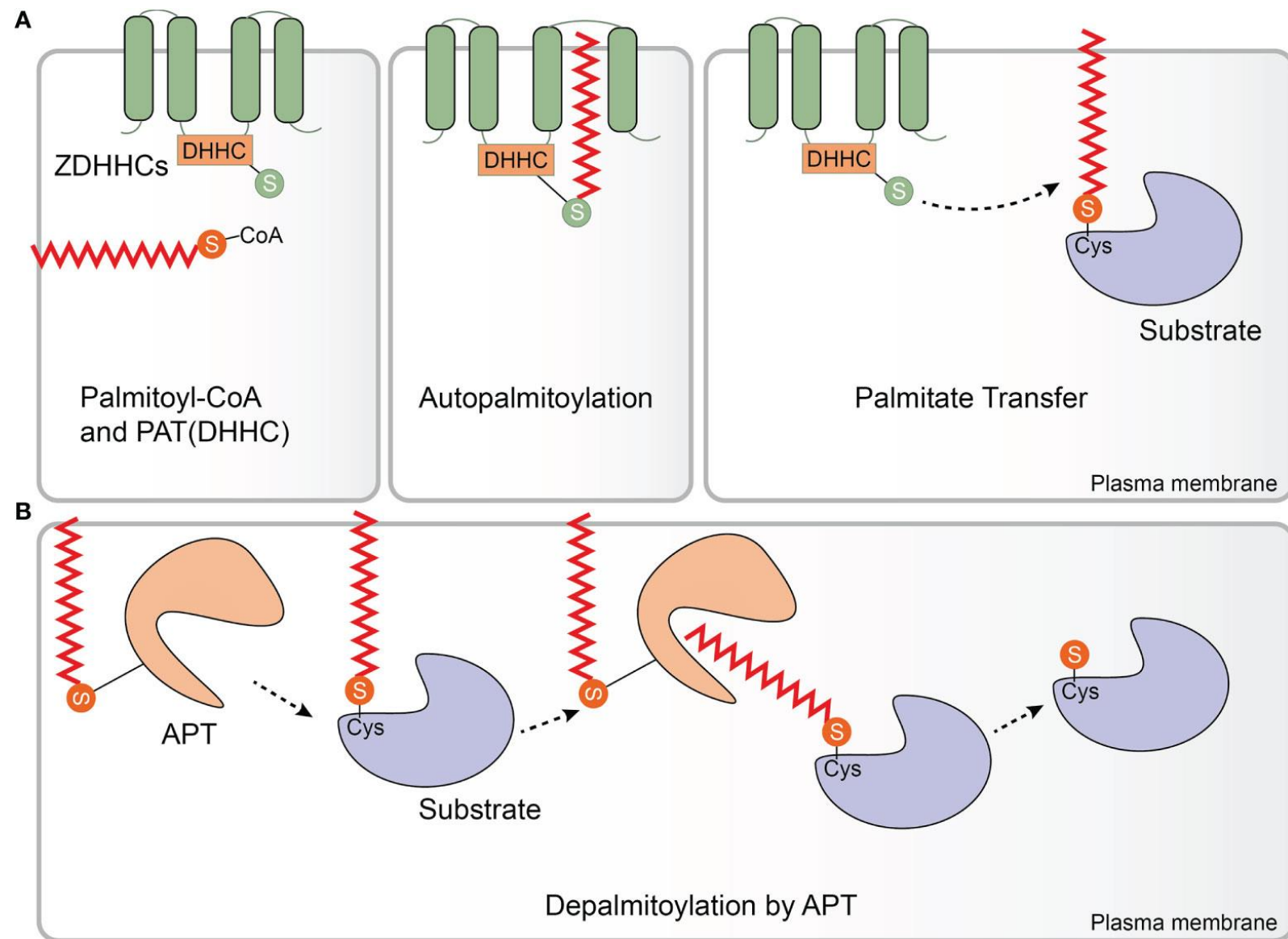
# PALMITOILACIJA

- S-palmitoilacija
- Reverzibilna kovalentna vezava palmitinske kisline na cisteinske ostanke
- Vpliva na lokalizacijo in stabilnost proteinov
- DHHC-palmitoil transferaze (DHHC-PAT)



# PALMITOILACIJA

- DHHC-motiv (Asp–His–His–Cys)
- Avtopalmitoilacija encima (nukleofilni napad Cys156 na palmitoil-CoA)
- Prenos palmitoilne verige na substratni protein
- Depalmitoilacija: serinske hidrolaze APT1/2, PPT1/2, ABHD17



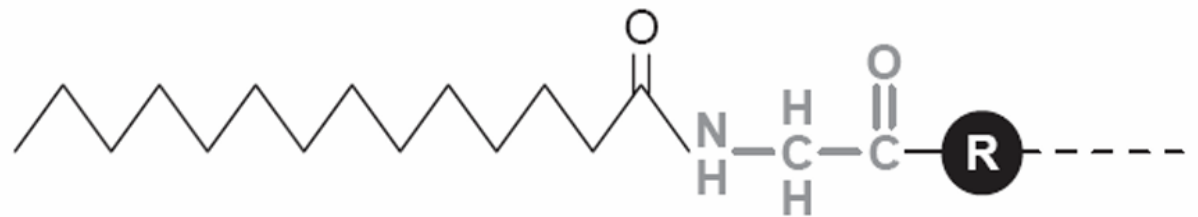
# MIRISTOILACIJA

- Lipidna modifikacija, pri kateri se miristoilna skupina (C14) veže na N-terminalni glicin proteina
- N-miristoil transferaza (NMT)

## ***N*-Myristylation**

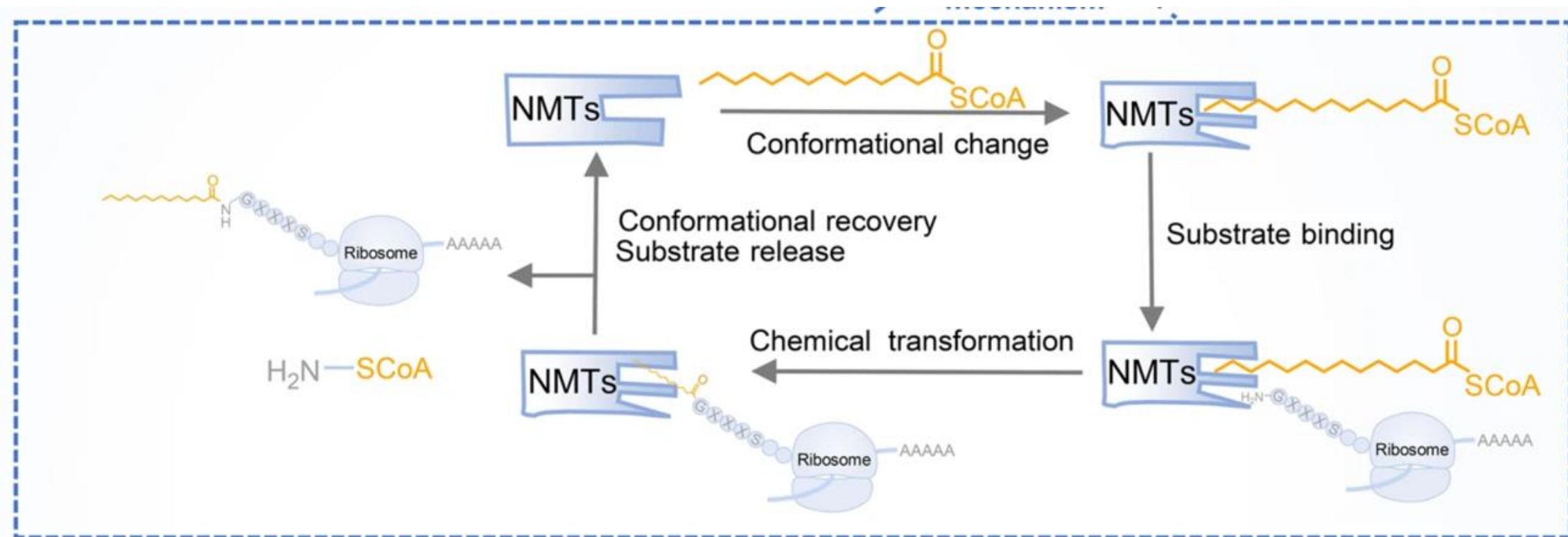
Stable  
amide bond

$$K_d^{\text{eff}} = 80 \mu\text{m}$$



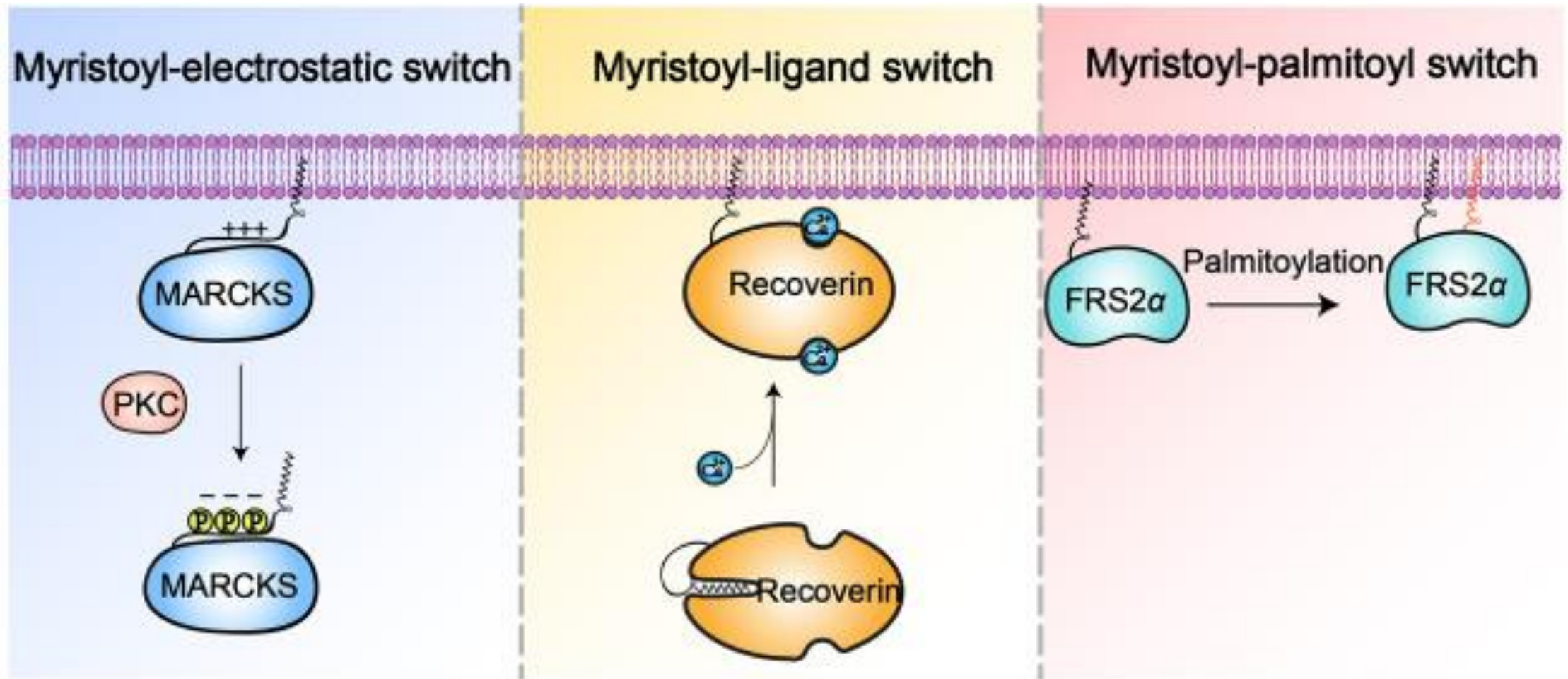
# MIRISTOILACIJA

- Bi-Bi mehanizem
- Veže se miristoil-CoA → konformacijska sprememba encima
- Sledi vezava substrata, prenos miristoilne skupine
- Sprostita se CoA + miristoiliran substrat → encim se povrne v začetno stanje
- NMT1 in NMT2



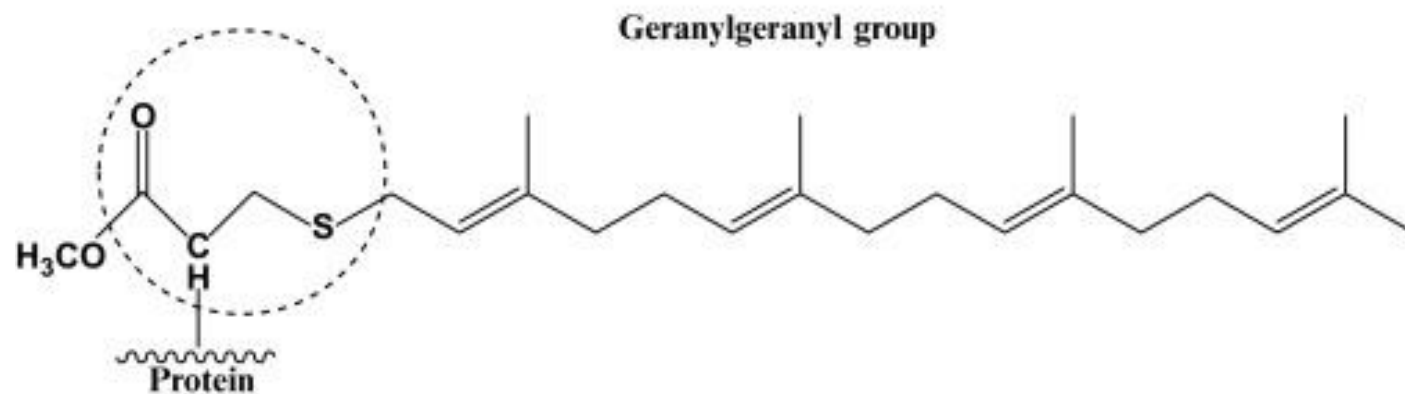
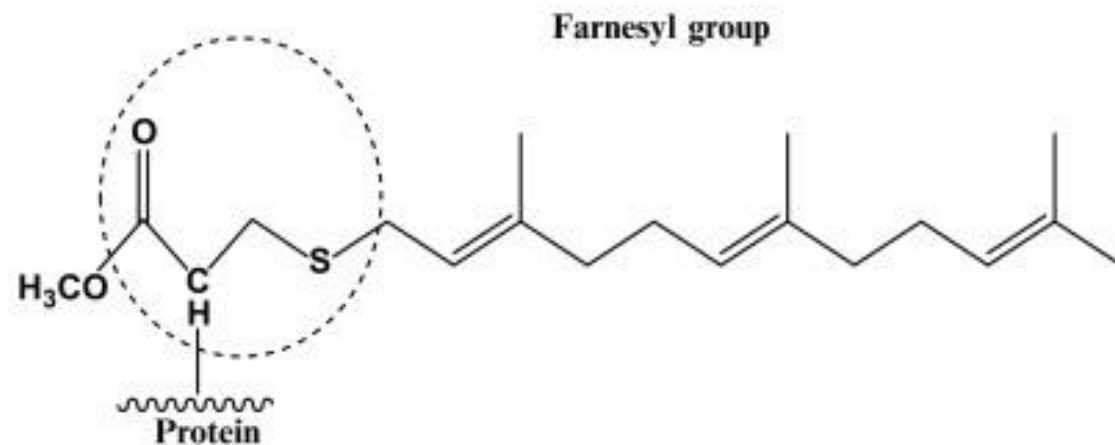
# MIRISTOILACIJA

- Uravnavajo dinamično interakcijo proteinov z membrano, kar vpliva na signalizacijo, transport, polarizacijo



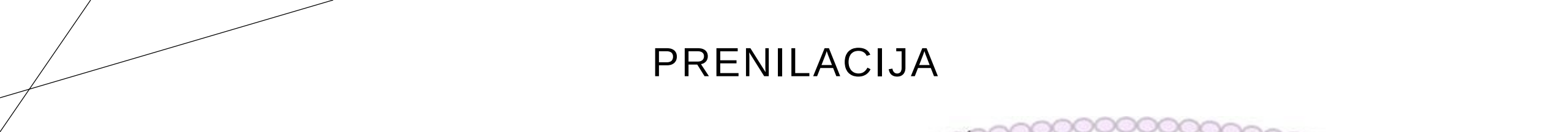
# PRENILACIJA

- Prenilacija je ireverzibilna posttranslacijska lipidna modifikacija, kjer se izoprenoidne skupine kovalentno vežejo na proteine
- Izoprenoidne skupine:
  - Farnezil (C15)
  - Geranilgeranil (C20)
- Vezava poteka na cisteinski ostanek
- Motiv CaaX (C = Cys, a = alifatski AK, X = določa encim)
- FTaza (farnesiltransferaza)
- GGTaza-I (geranilgeraniltransferaza tip I)
- GGTaza-II (Rab-GGTaza, deluje na CC/CXC motive, potrebuje REP proteine)



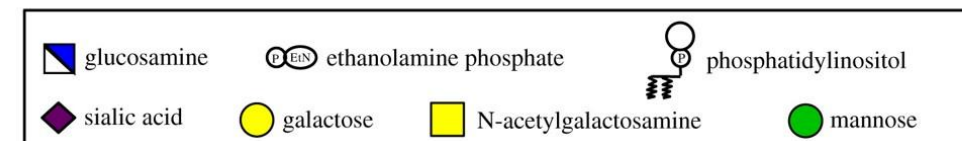
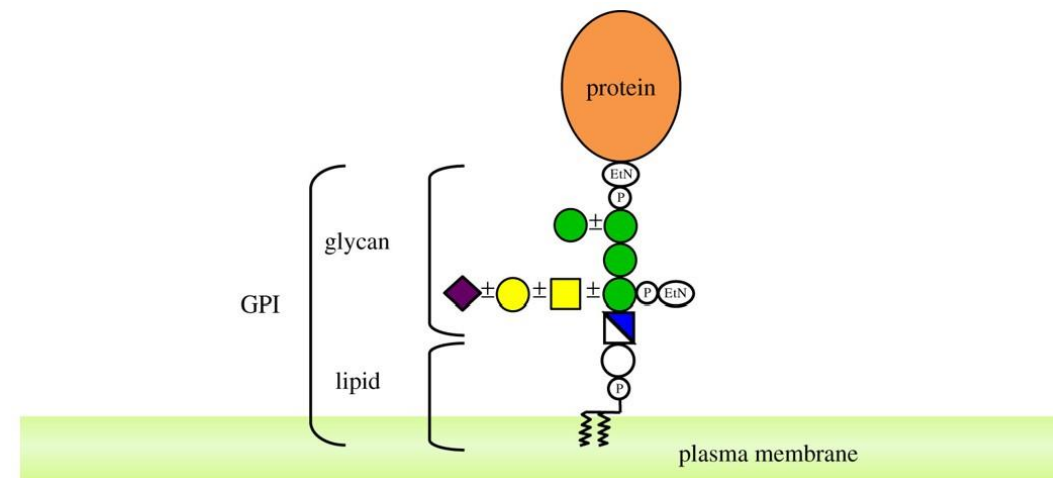
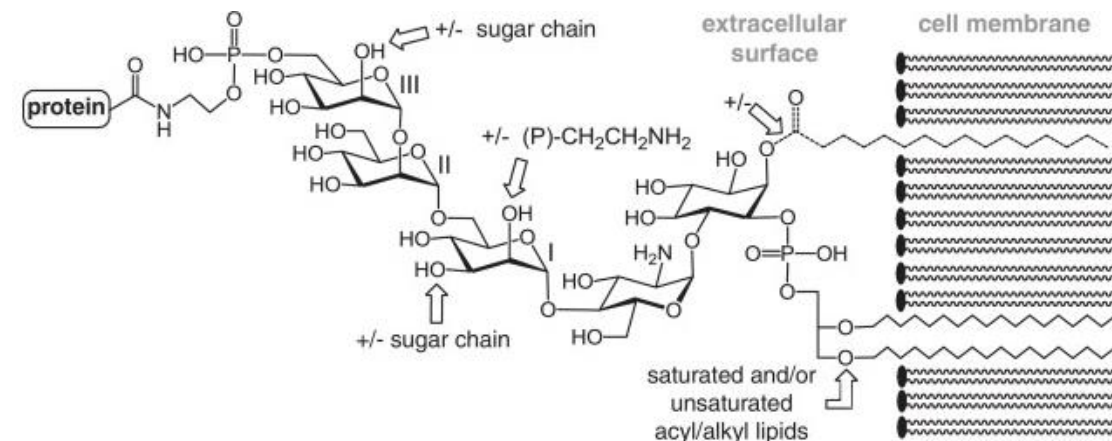
# PRENILACIJA

- # PRENILACIJA



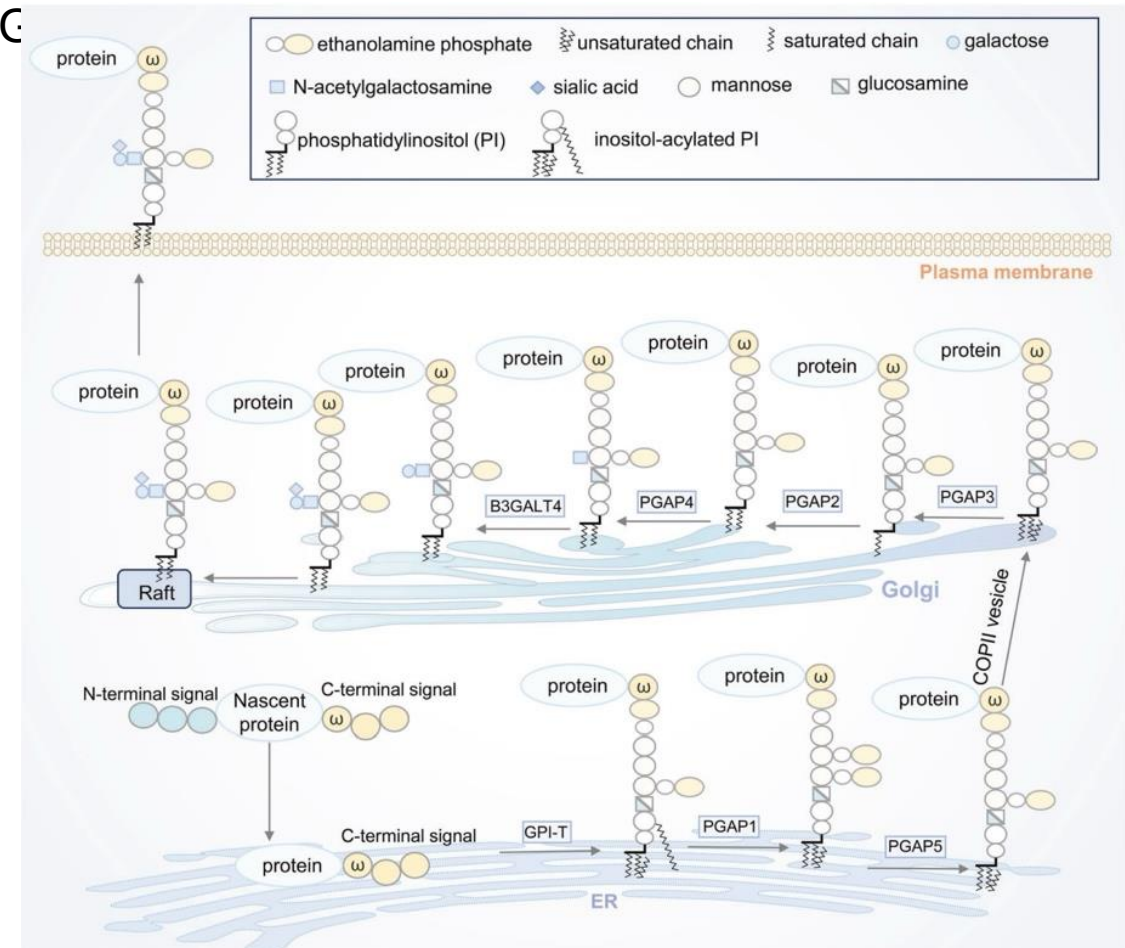
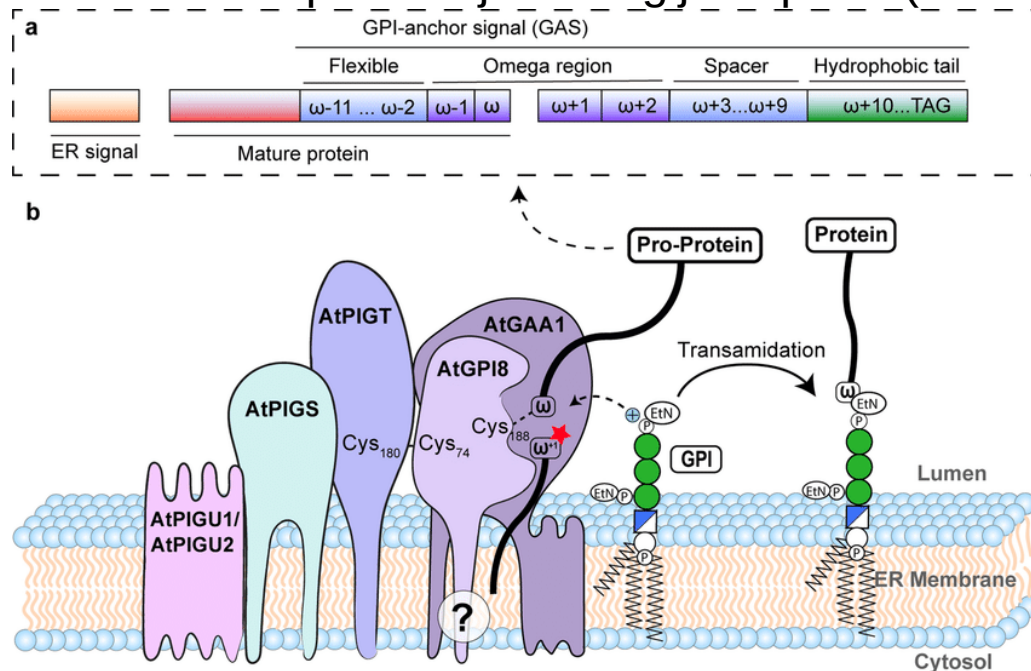
# GPI SIDRO

- GPI se sintetizira v endoplazemskem retikulumu (ER) v **11 korakih**
- Sestava GPI: fosfatidilinozitol, glukozamin, 3 manoze, fosfoetanolamin; možne dodatne modifikacije z monosaharidi
- **GPI-AP** (GPI-zasidrani proteini) imajo na N-koncu **signalno zaporedje za translokacijo v ER**
- GPI se veže na C-konec prekursorja na **mestu  $\omega$**  (npr. Ser, Asn, Asp, Ala, Gly, Cys in Thr)
- Amidna vez nastane med fosfoetanolaminom GPI in karboksilno skupino aminokisline  $\omega$
- Signalni peptid za pripenjanje GPI vsebuje 20–30 aminokislin, pretežno **hidrofobnih**



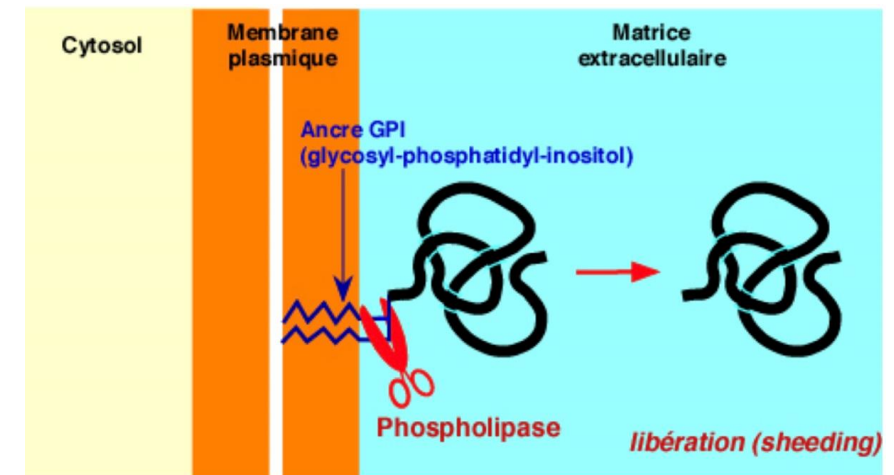
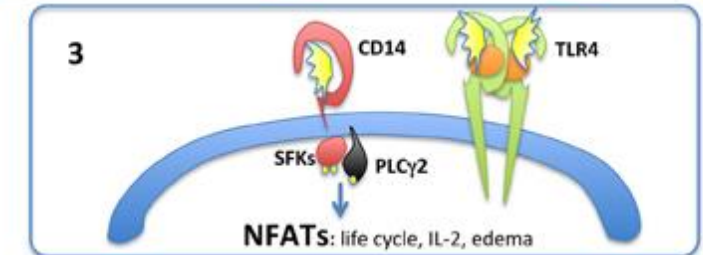
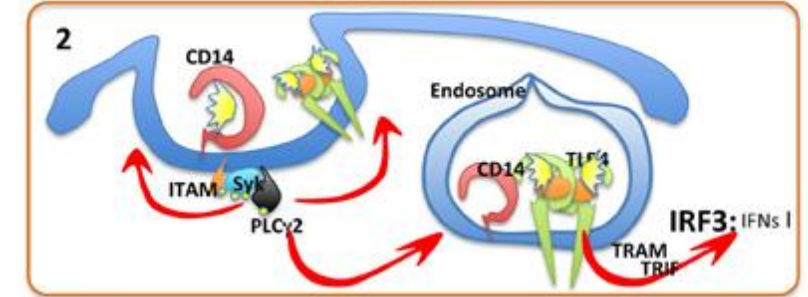
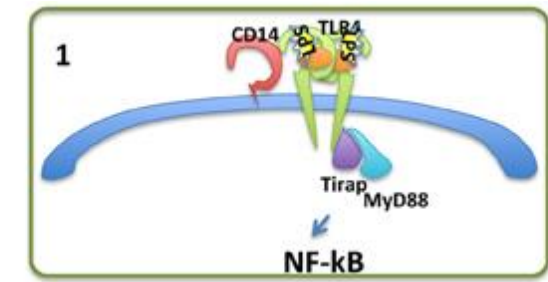
# VEZAVA GPI SIDRA IN TRANSPORT GPI-AP

- Kompleks GPI-transamidaze (GPI-T) ima **5 podenot**: PIGK (katalitična domena), GPAA1, PIGT, PIGS, PIG-U
- PIGK cepi peptidno vez** med aminokislinama  $\omega$  in  $\omega+1$ , odstrani signalni peptid
- Nato katalizira tvorbo tioestrске vezi, ki jo amino skupina C
- GPI-AP se nato prenesejo v Golgijev aparat (**COPII**)



# FIZIOLOŠKA VLOGA GPI-AP

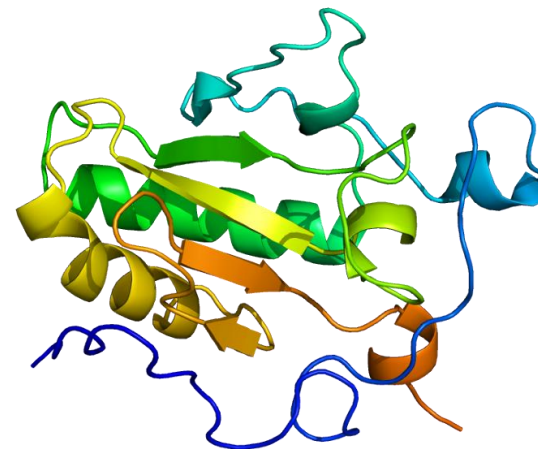
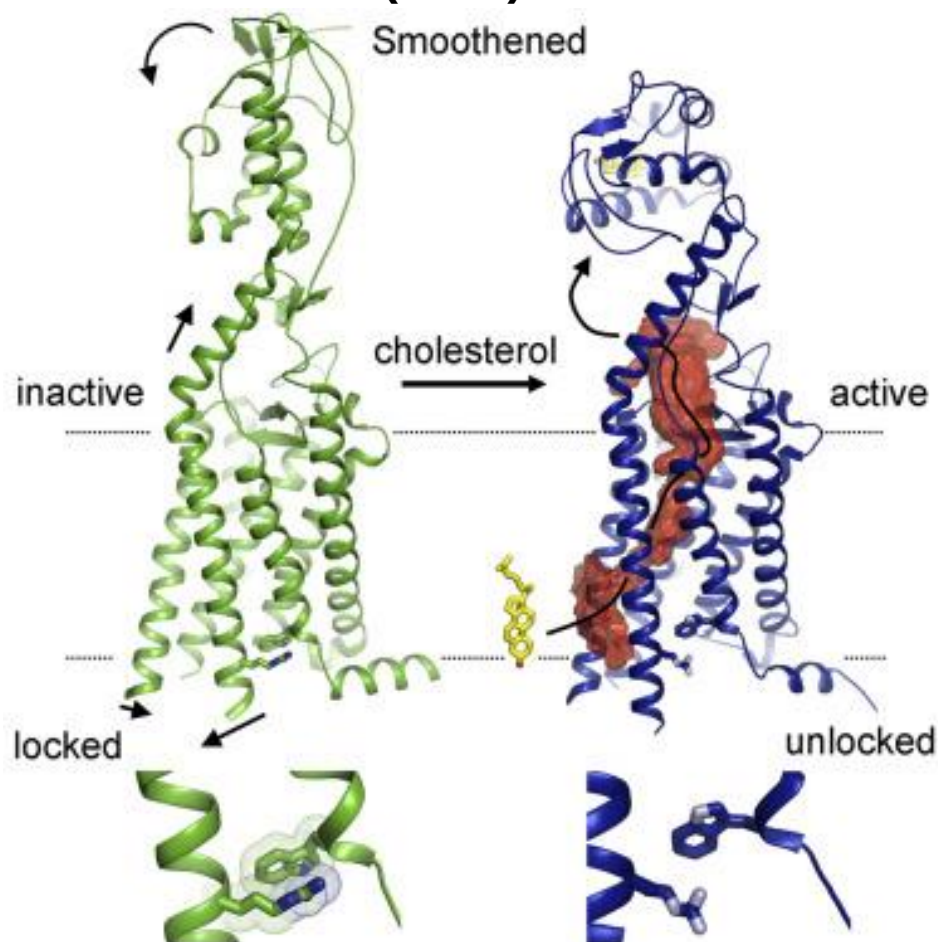
- GPI sidro omogoča pravilno **asociacijo z lipidnimi rafti** – ključna za delovanje proteinov
- Nepravilne modifikacije motijo transport in delovanje GPI-AP
- Bistvenega pomena pri imunskem odzivu:
- CD109:
  - **Zaviranje TGF- $\beta$  signalne poti** → zmanjšanje imunosupresije
  - Potencialna protitumorska funkcija – reaktivacija T-celic in NK celic
- CD14:
  - Koreceptor za TLR4, **prepozna lipopolisaharide bakterij**
  - Aktivira vnetni odziv prek NF- $\kappa$ B → sinteza citokinov
- **Fosfatidilinozitol-fosfolipaza C (PI-PLC)** lahko odreže GPI sidro GPI-zasidranim proteinom → sekundarni obveščevalci pri transdukciji signala



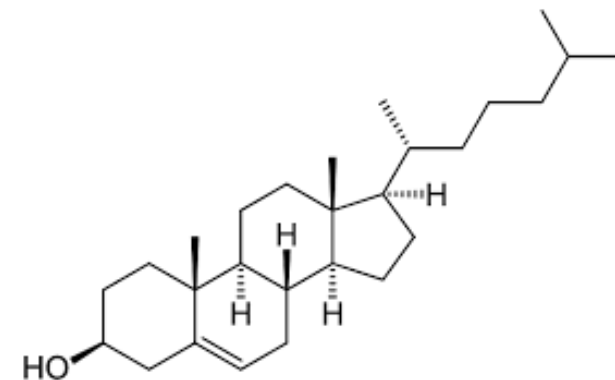
# MODIFIKACIJE S HOLESTEROLOM

- Le dva znana proteina, ki kovalentno vežeta holesterol:

- Hedgehog (Hh)
- Smoothened (SMO)



Struktura proteina Hh

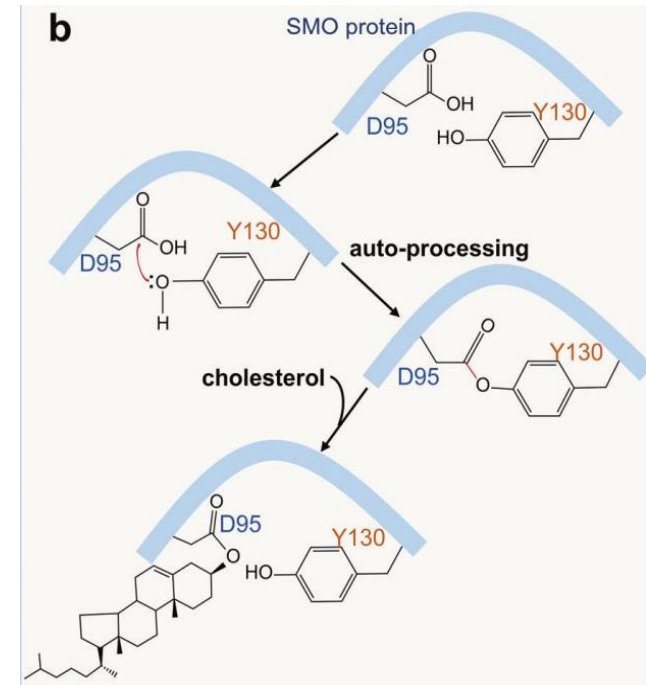
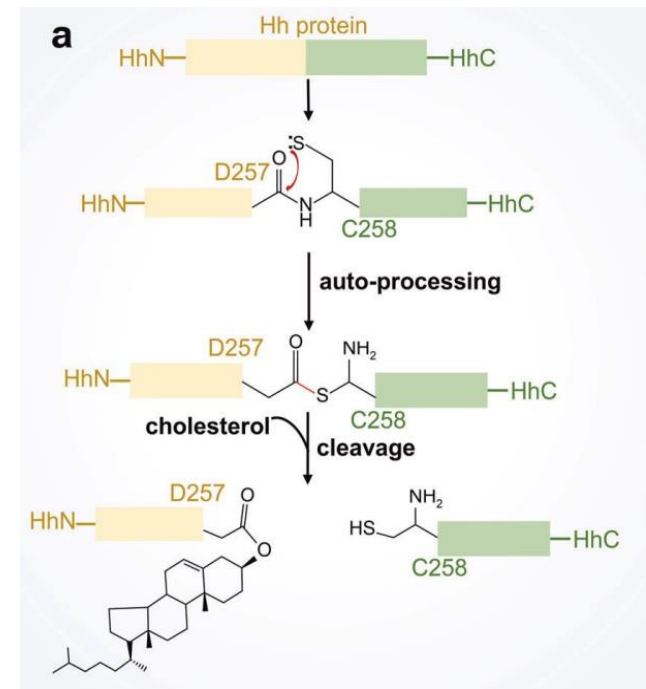


Molekula holesterola

- Ključna vloga v **signalni poti Hedgehog**:
  - Esencialna za **rast in razvoj** embrijev (vretenčarji, nevretenčarji)
  - Pomembna tudi pri odraslih
- **Modifikacija poteka preko avtoprocesiranja**
- Holesterol vpliva na:
  - **Lokalizacijo, aktivacijo in signalno funkcijo Hh in SMO**

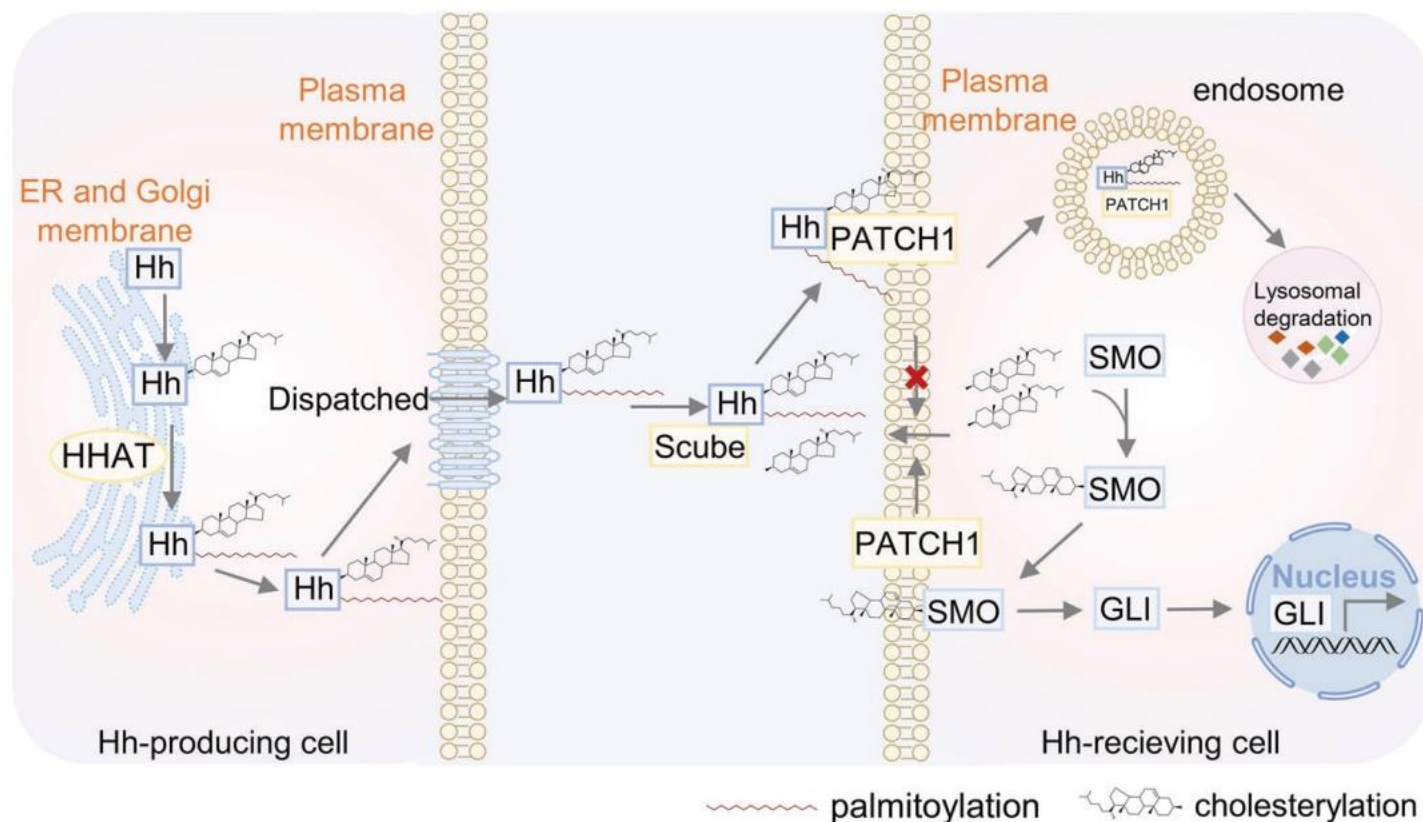
# MEHANIZEM MODIFIKACIJE S HOLESTEROLOM

- **Protein Hh:**
- Podvržen avtokatalitični cepitvi → nastaneta N-Hh in C-Hh
- N-Hh se modificira v dveh korakih:
  - Tioestrna vez med Cys in Gly (nukleofilni napad tiolne skupine)
  - Prenos holesterola –  $3\beta$ -OH skupina holesterola cepi tioester
- Ključne aminokisline: His, Thr, Cys, Asp → tvorba vezavnega mesta in aktivacija cepitve
- **Protein SMO:**
- Dvostopenjska reakcija:
  - Tyr130 napade karbonil Asp95 → tvorba esterske vezi
  - Estrska izmenjava: D95-Y130 v D95-holesterol
- Za pravilno konjugacijo sta bistvena: Tyr85, Lys133



# FIZIOLOŠKA VLOGA PROTEINOV HH IN SMO

- N-Hh in SMO sta ključna proteina signalne poti Hedgehog:
  - **Spodbujata proliferacijo, zavirata apoptozo, usmerjata diferenciacijo**
- Transmembranski protein **Dispatched**:
  - Prepozna holesterolski del Hh in **omogoča njegovo sproščanje v zunajcelični prostor**
- Deluje skupaj s **Scube2**, ki posreduje pri prencipiranju
- **PATCH1/2**:
  - **Inhibirata SMO**, kadar Hh ni vezan
  - Redukcija ligandov Hh s spodbujanjem njihove endocitoze in lizosomske razgradnje
- Ko se Hh veže na PATCH1, se ta razgradi → **SMO se aktivira**
- Aktiviran SMO sproži delovanje **transkripcijskih faktorjev GLI** v jedru



# VPLIV LIPIDNEGA OKOLJA NA MEMBRANSKE PROTEINE

**Lipidno okolje vpliva na fizikalne lastnosti membrane, kot so:**

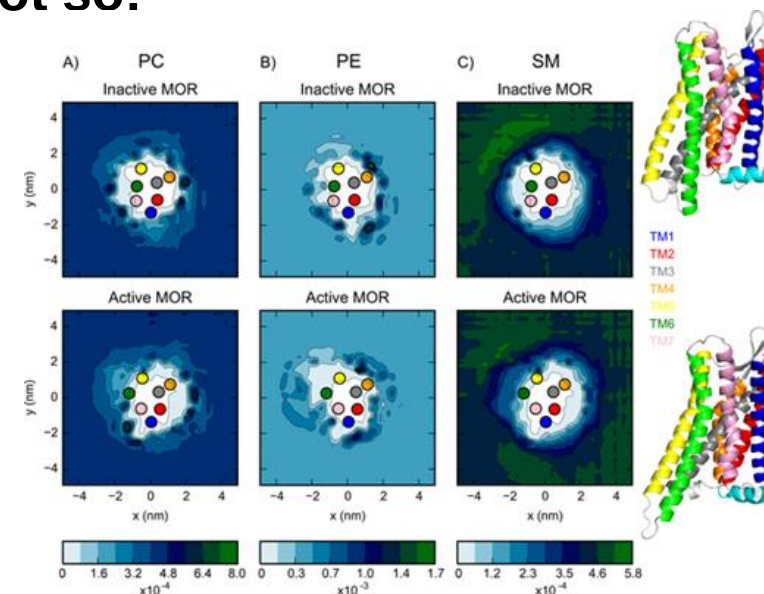
- Debelina lipidnega dvosloja,
- Ukrivljenost,
- Površinska napetost,
- Elastičnost membrane

**Holesterol:**

- Stabilizira strukturo receptorjev (npr.  $\beta 2AR$ ),
- Vpliva na vezavo agonistov (npr. adrenalina),
- Spodbuja oligomerizacijo receptorjev (tvorbo večjih funkcionalnih kompleksov)

**GPCR receptorji so posebej občutljivi na sestavo membrane:**

- Ravnovesje med aktivno in neaktivno konformacijo je odvisno od holesterola,
- Vplivajo tudi fosfolipidi in njihova nasičenost verig



# MEHANIZMI INTERAKCIJE - SPECIFIČNI VS. NESPECIFIČNI

| Vrsta učinka | Opis                                                                                   |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Specifični   | Lipidi se vežejo na točno določene ostanke na proteinih – neposredna interakcija       |
| Nespecifični | Lipidi spremenijo membrane kot celoto (npr. debelino), kar vpliva na proteine posredno |

# KAKO HOLESTEROL VPLIVA NA SEROTONINSKI RECEPTOR (5-HT<sub>1A</sub>)?

Stabilizacija strukture receptorja:

- Holesterol se veže na CRAC motive in ohranja funkcionalno obliko receptorja

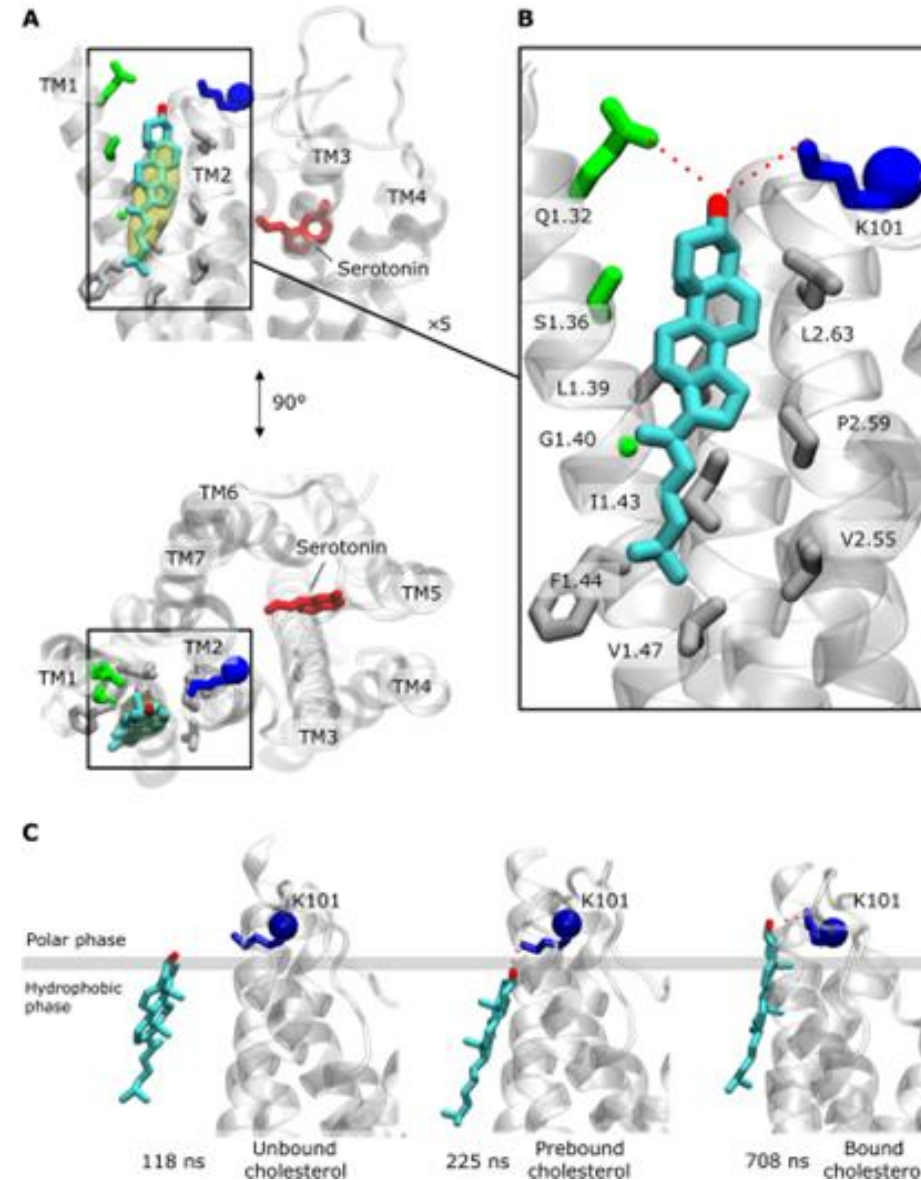
Vpliv na vezavo serotonina:

- Spremeni mikrookolje in afiniteto receptorja za ligand

Regulacija signalizacije:

- Holesterol podpira oblikovanje lipidnih mikrodomen,
- Ti mikrodomenski otoki koncentrirajo receptorje in G-proteine za učinkovitejšo signalizacijo

# PRIKAZ VPLIVA HOLESTEROLA NA SEROTONINSKI 1A RECEPTOR, KI JE TIPIČEN PRIMER GPCR



# MODIFIKACIJA PROTEINOV Z LIPIDI - EVOLUCIJA

- Prvo poročilo o modifikaciji proteinov z lipidi je iz leta 1951, ko so bili predstavljene dokazila o obstoju t.i. proteolipidov
- Milistoilirani proteini
- Proteini zasidrani z glikozilfosfatidilinozitolom (GPI)

- Modifikacije proteinov z lipidi-mehanizem za usmerjanje proteinov v specifične celične kompartmente, kar je omogočilo boljšo organizacijo in funkcionalnost celice

- Vplivajo na prostorsko zgradbo, stabilnost, celično lokalizacijo in funkcionalno vlogo proteinov

- Encimi, ki katalizirajo modifikacije proteinov z lipidi, so se skozi evolucijo ohranili in so prisotni v različnih organizmih, od enoceličnih mikroorganizmov do sesalcev

# VRSTE MODIFIKACIJ PROTEINOV Z LIPIDI

| Vrsta          | Primeri                                                                                             |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Prenilacija    | Ras GTPaze - sodelujejo v celični proliferaciji in diferenciaciji                                   |
| Miristoilacija | Src kinaza - celična signalizacija ali membranska lokalizacija                                      |
| Palmitoilacija | Signalni proteini - dinamično uravnavanje vezave proteinov na membrane in njihovo signalno funkcijo |
| GPI-zasidranje | Imunska signalizacija, encimska aktivnost                                                           |

# EVOLUCIJSKI RAZVOJ MODIFIKACIJ PROTEINOV Z LIPIDI

## **Arheje in bakterije**

- Tradicionalno se je domnevalo, da lipidacije ni
  - prisotne osnovne oblike prenilacije in miristoilacije
- Haloarheji – specifičnost MAP encimov

## **Enocelični evkarionti**

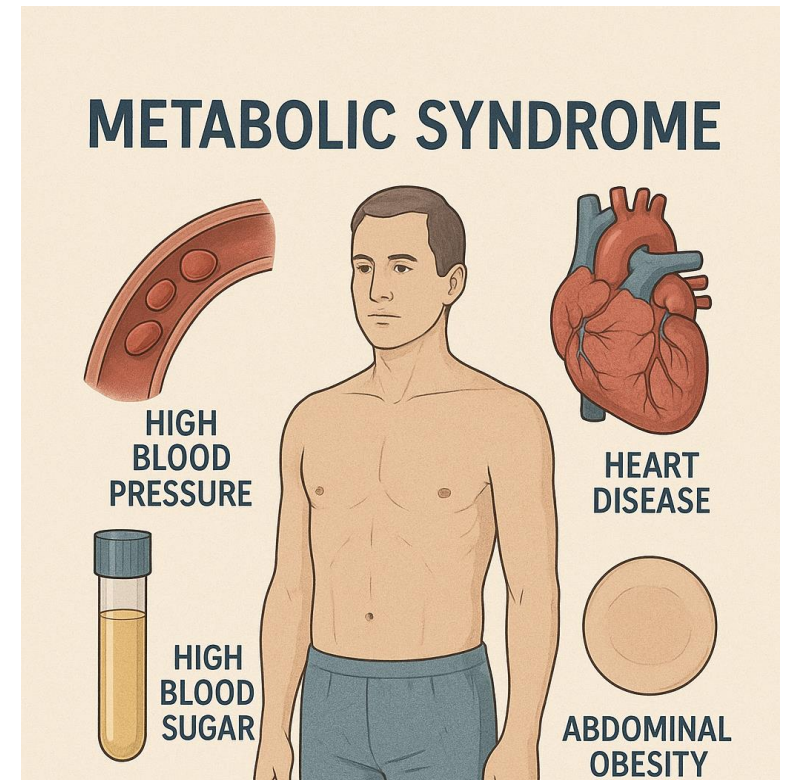
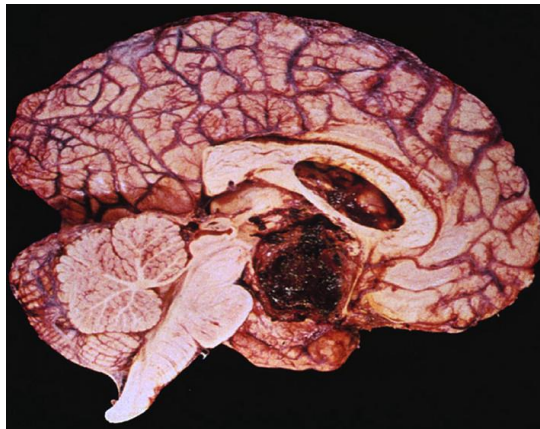
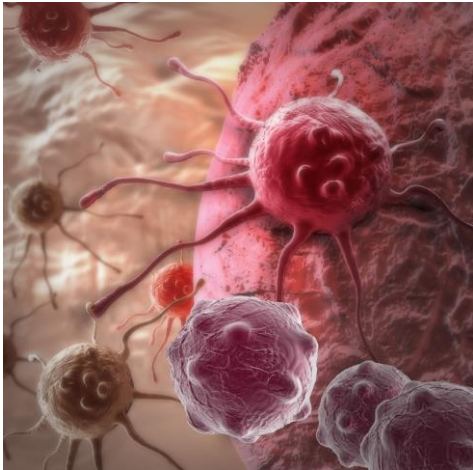
- Prisotne vse ključne vrste lipidacij (miristoilacija, palmitoilacija, GPI itd.)
  - Primer: *Ras2* pri kvasovkah je miristoiliran in palmitoiliran

## **Večcelični organizmi**

- Povečana kompleksnost encimskih sistemov
  - Palmitoilacija: ključna za sinaptično plastičnost, hitro odzivanje
  - GPI-zasidranje in prenilacija: pomembni za signalizacijo in transport

# PATOLOGIJA LIPIDNE MODIFIKACIJE PROTEINOV

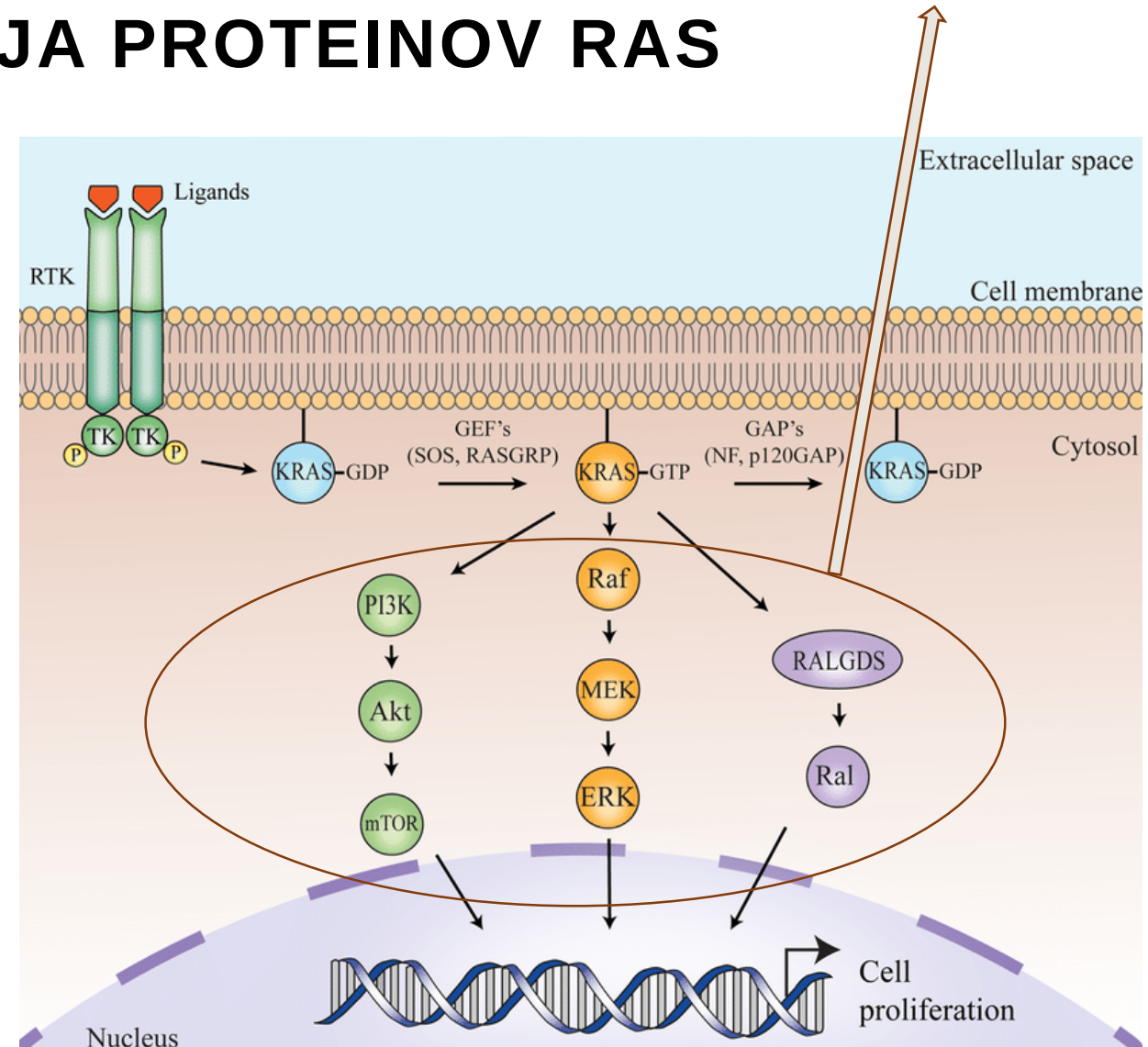
- Abnormalnosti lipidne modifikacije povezana z:
  - rakom (proteini Ras)
  - nevrodene degenerativnimi motnjami (palmitoilacija)
  - metabolnim sindromom (S-acilacija – diabetes tipa 2)



# RAK IN PRENILACIJA PROTEINOV RAS

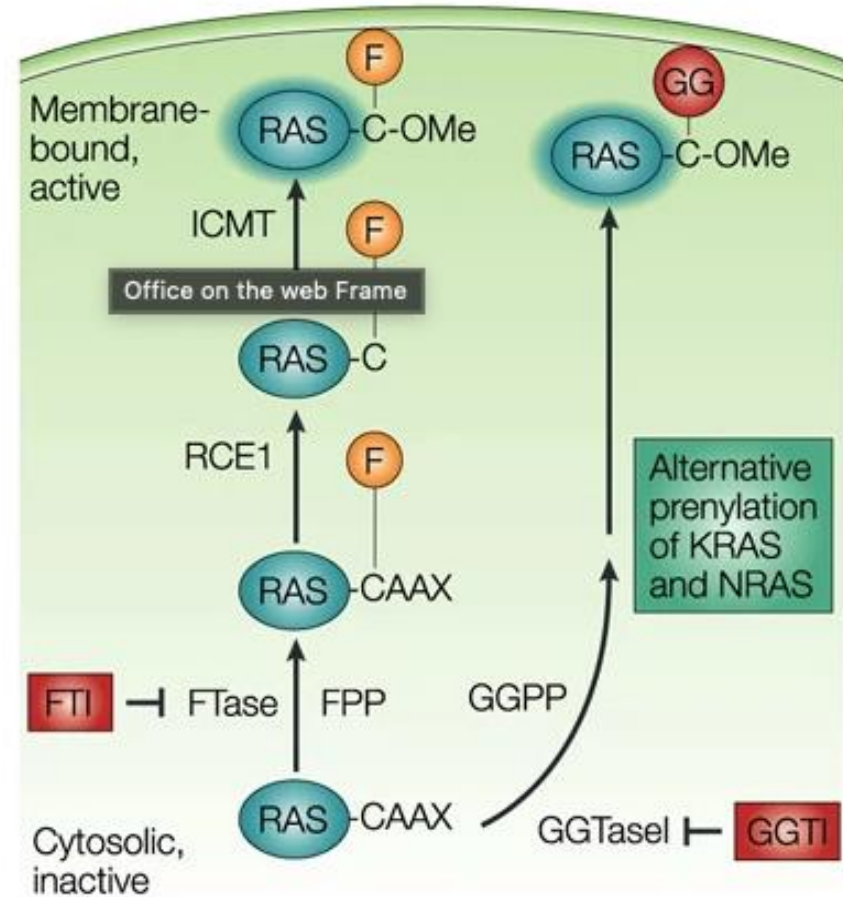
- Proteini družine **Ras**: celična proliferacija/diferenciacija/apoptoza  
- KRAS, HRAS, NRAS (molekularna stikala)
- Funkcionalnost = zasidranost v membrano – to omogoča **prenilacija**
- Ras se **farnezilirajo** – dodatek farnezil izoprenoida na cistein v CAAX motivu
- Mnogi tipi raka – mutacije KRAS: protein zaklenjen v "on" stanju – nenadzorovana rast celic
- Prenilacije ni: protein se ne zasidra v membrano/ne aktivira signalnih poti (npr. MAPK-ERK)

KRAS sprožijo različne  
kaskade signalne transdukcije



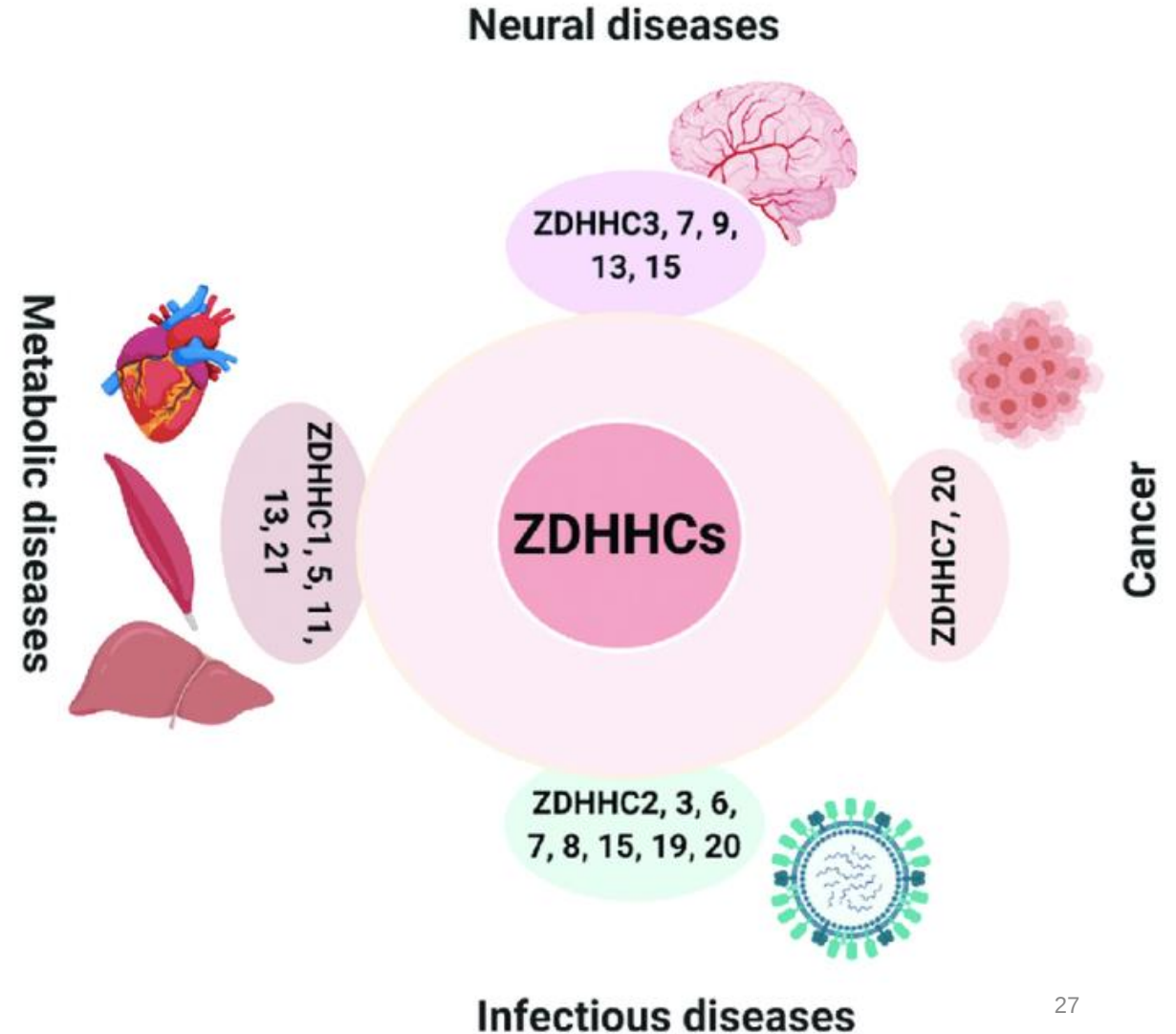
# RAS - TARČA TERAPIJE

- Razvoj **inhibitorjev farneziltransferaze (FTI)**
- Uspešna inhibicija s FTI pri HRAS, ne pa tudi pri KRAS. Zakaj?
  - KRAS uporabi alternativo – **geranilgeranilacija** omogoči zasidranje v membrano – zato razvili **dvojne zaviralce** + **zdravila** (**npr. PDE $\delta$** ), ki motijo prenašalce lipidiranih Ras - onemogočeno zasidranje v membrano – ni sprožene signalne kaskade, ki lahko privede do razvoja raka

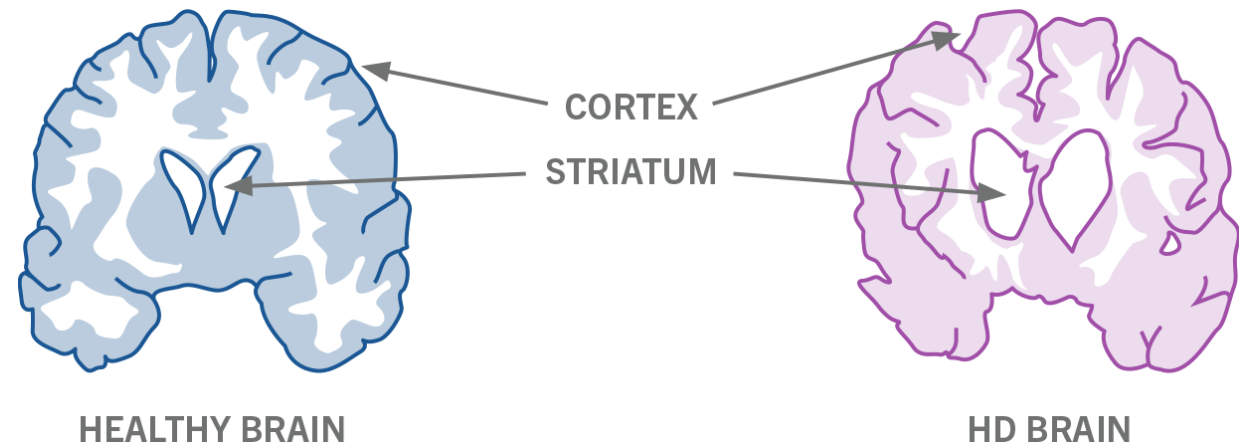


# TERAPEVTSKI POTENCIAL

- Novejše raziskave: Rak prostate/pankreas - povečano izražani encimi, ki izvajajo lipidacijo (npr. **NMT** oz. N-miristoiltransferaza in **zDHHC palmitoiltransferaza**)
- Rakave celice verjetno uporabljajo lipidacijo za stabilizacijo svojih onkogenov
- In-vitro zaviranje teh encimov: povišana celična smrt tumorjev, slabše signaliziranje

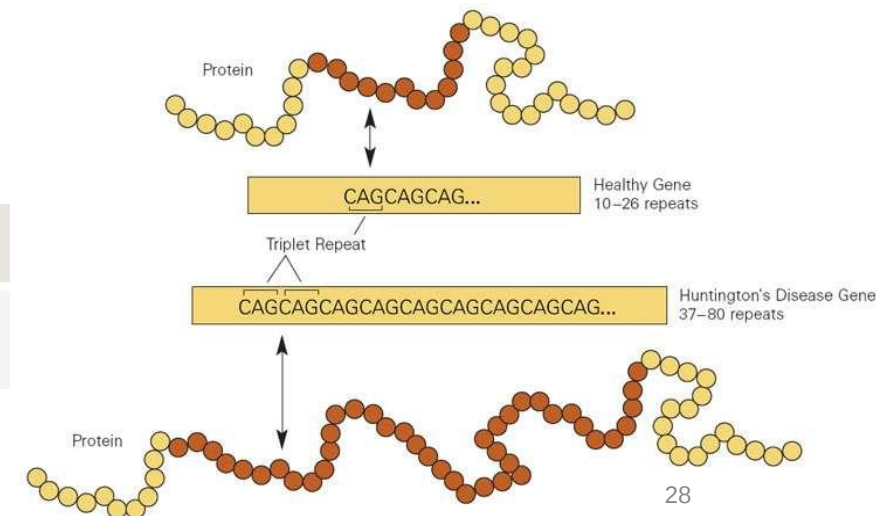


# NEURAVNOTEŽENA PALMITOILACIJA PRI HUNTINGTONOVI BOLEZNI



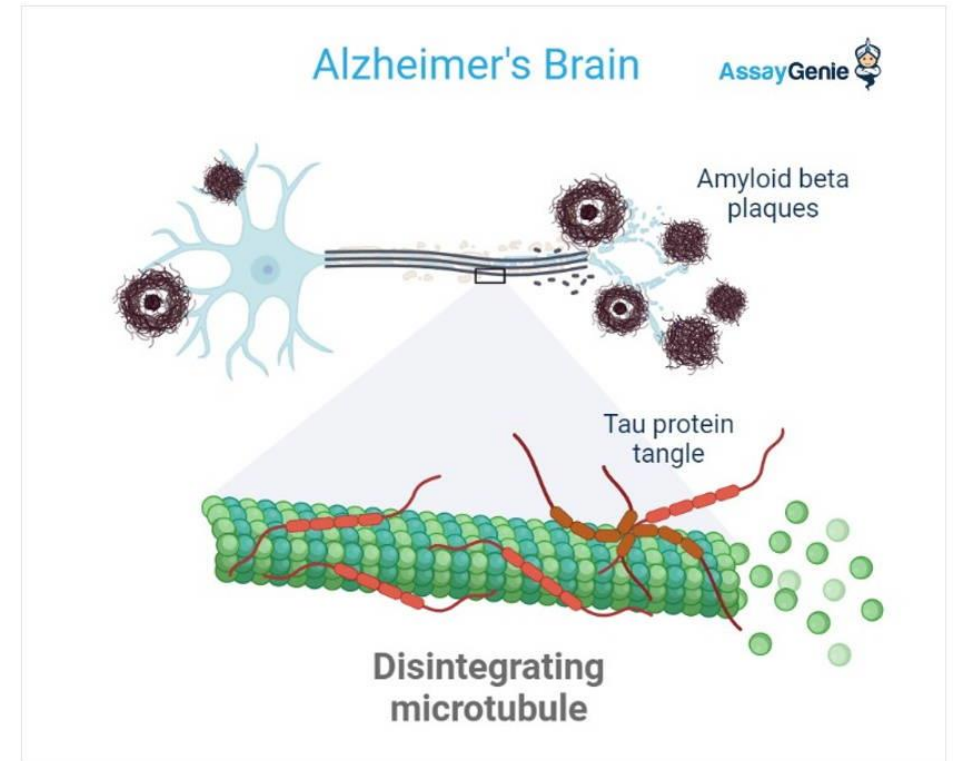
- V možganih: palmitoilacija - pravilno delovanje sinaps/regulacija PSD-95 proteinov, z G proteini sklopljeni receptorji in AMPA/NMDA receptorji
- **Hungtingtonova bolezen**: mutacija - kopičenje **CAG** ponovitev na genu **HTT** - nedelujoč protein **huntingtin** – agregira (toksičnost za živčne celice) - odmiranje **striatuma** (gibanje)

| Delujoč Huntingtin | Mutiran Huntingtin       |
|--------------------|--------------------------|
| palmitoiliran      | Neustrezno palmitoiliran |



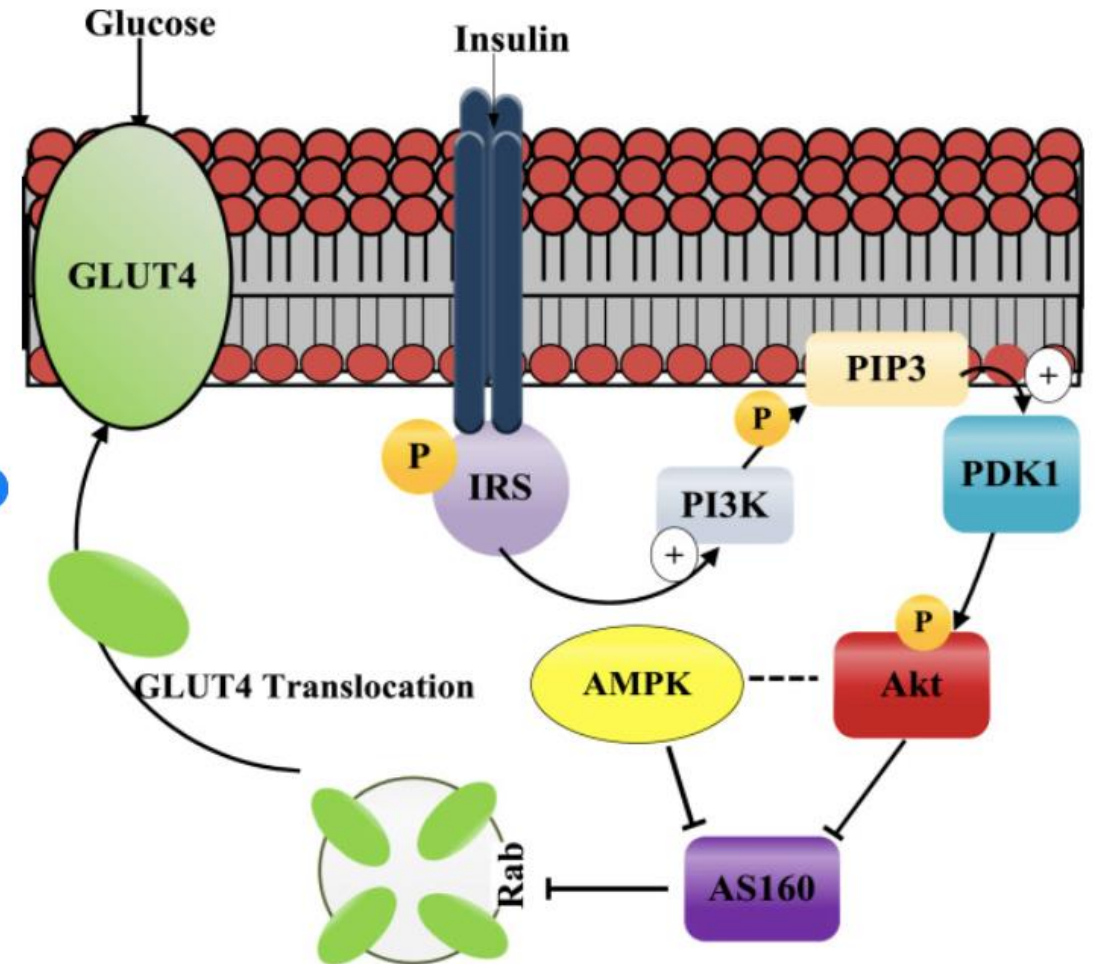
# NEURAVNOTEŽENA PALMITOILACIJA PRI ALZHEIMERJEVI BOLEZNI

- Spremembe v palmitoilaciji: spremenjeno delovanje/transport amiloidnega prekursorskega proteina (**APP**)
- Palmitoilacija **cys186** in **cys187** ostankov – vpletenost pri razvoju in poteku Alzheimerjeve bolezni
- Palmitoilacija – vpliv na agregacijo, vezavo na mikrotubule, hiperfosforilacijo proteinov **tau**.
- Motena palmitoilacija: povezava z drugimi nevrološkimi stanji – Parkinsonova bolezen, ALS, shizofrenija



# PRESNOVNI SINDROM IN MOTNJE V S-ACILACIJI

- S-acilacija: regulacija encimov za privzem glukoze, metabolizem lipidov, vzdrževanje energijske homeostaze
- Presnovni sindrom: debelost, odpornost na inzulin, hipertenzija, kopičenje maščobe v jetrih
- Proteini (reguliranje presnove): AMPK (AMP-activated protein kinase), GLUT4 (glucose transporter type 4) in IRS (insulin receptor substrate)

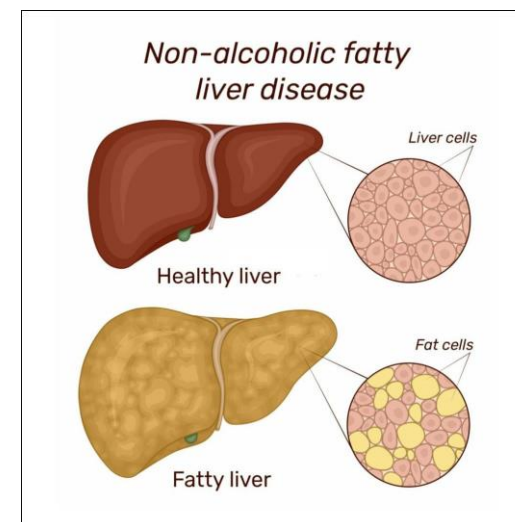
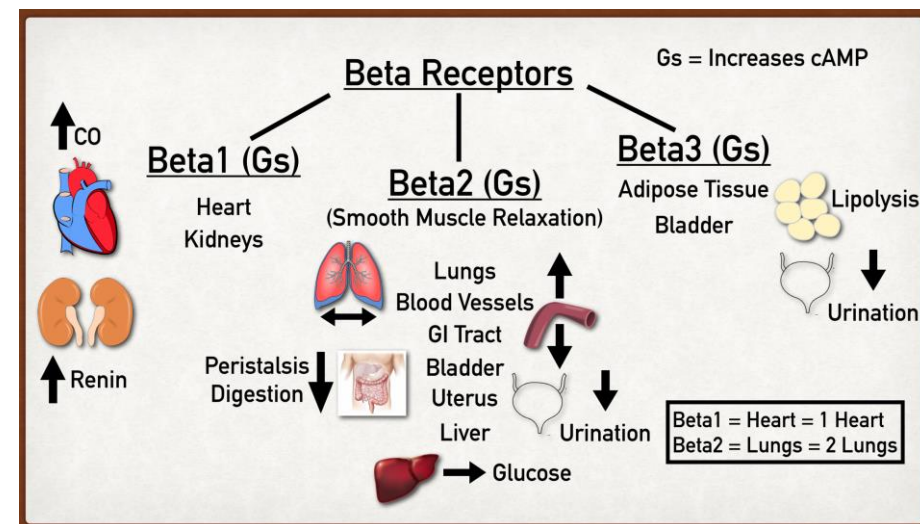


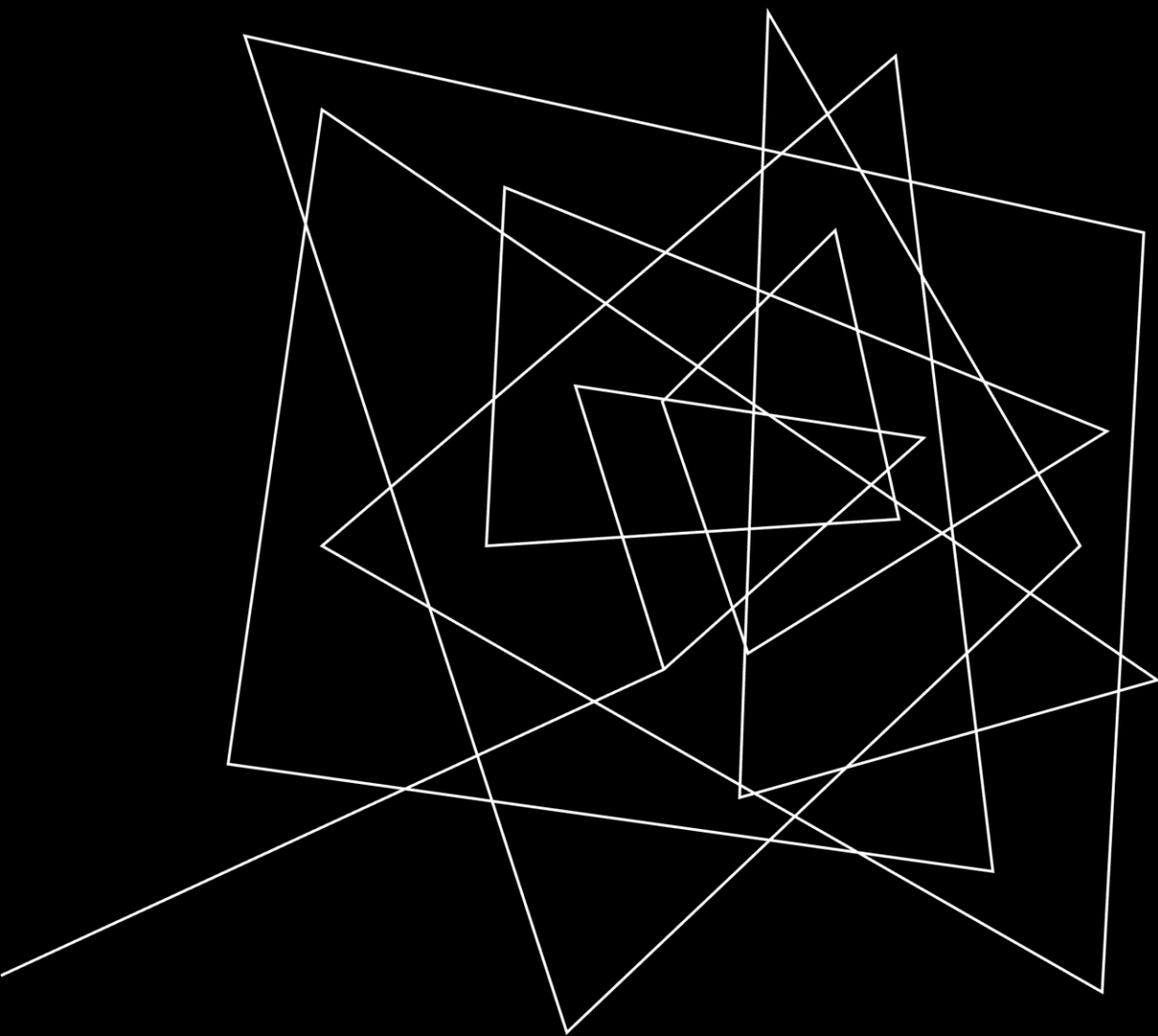
# DIABETES IN ODPORNOST NA INZULIN

- Sladkorna bolezen tipa 2: kronična preobremenitev z lipidi – spremenjena ekspresija **zDHHc** in **APT** (acil-protein tioesteraze) encimov - porušena palmitoilacija
- Okvarjena palmitoilacija pri:
  - **GLUT4** - zmanjšan privzem glukoze
  - **IRS** – inhibirana interakcija z receptorji inzulina – ugasnjena AKT signalna pot – inzulinska rezistenca
- Mišji modeli: okvare v **zDHHc7** in **zDHHc4** – metabolna bolezenska stanja: debelost, bolezen zamaščenih jeter, hiperglikemija

# SRČNO-ŽILNE IN JETRNE IMPLIKACIJE

- $\beta$ -adrenergični receptorji v srčni mišici za pravilno delovanje palmitoilirani
- Diabetiki: neuravnotežena palmitoilacija – aritmije, srčno popuščanje
- Metabolizem lipidov v jetrih: reguliran z **acetil-CoA karboksilazo (ACC)** - podvržen S-acilaciji (specifično palmitoilaciji) - okvare tukaj pomenijo oksidacijo mašč. kislin – nealkoholna maščobna bolezen jeter (NAFLD) + odpornost na inzulin





***Hvala za  
vašu  
pozornost!***