

# Ubikvitiny, proteazomy, sumoylace a použití dnes a zítra v terapii nádorů i jiných chorob I. Ubikvitin-proteazomový systém a transkripční faktor NF-κB

O. Fuchs<sup>1</sup>, R. Neuwirtová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, ředitel prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc.

<sup>2</sup>I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN, Praha, přednosta prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc.

**Souhrn:** Proteazom je bílkovinný komplex s proteázovou aktivitou. Proteazomy jsou vedle lyzozomů hlavním proteolytickým aparátem každé eukaryotické buňky. Proteiny určené k rozkladu jsou označeny tzv. ubikvitinylací, která spočívá v připojení polyubikvitinu k příslušnému proteinu. Následuje transport takto modifikovaného proteinu k proteazomu, ve kterém je protein rozložen na krátké peptidy. Vedle připojení polyubikvitinu k proteinu existuje i monoubikvitinylace proteinů, která hraje důležitou úlohu v opravě DNA, transkripci genů, endocytóze a přenosu signálu. S proteazomem je spojena funkce významného transkripčního faktoru NF-κB, který je aktivován po proteolýze jeho inhibitoru IκB v proteazomu. Ubikvitinylace a odbourávání proteinu v proteazomu a dále aktivace NF-κB hrají důležitou roli v odklizení proteinů a v expresi řady genů důležitých v regulaci buněčného cyklu a apoptózy buněk. Inhibice proteazomů má antiproliferační a protizánětlivý účinek a otevírá tak nové terapeutické přístupy v léčbě nádorů a některých zánětlivých stavů. Přehled jsme rozdělili do tří kapitol, a to I. *Ubikvitin-proteazomový systém a transkripční faktor NF-κB*, II. *Sumoylace a neddylace jako posttranslační modifikace proteinů podobné ubikvitinylaci a jejich význam*, a konečně III. *Využití poznatků v ubikvitin-proteazomovém systému v terapii nádorů i dalších chorob*.

**Klíčová slova:** ubikvitin – proteazom – transkripční faktor NF-κB

## Ubiquitins, proteasomes, sumoylation and application today and in future for cancer and other diseases therapy I. Ubiquitin-proteasome system and the transcription factor NF-κB

**Summary:** Proteasome is protein complex with proteolytic activity. Proteasomes are in addition to lysosomes the main proteolytic machinery of the eukaryotic cell. Proteins destined for degradation in proteasomes are marked by ubiquitinylation, which consists in attachment of polyubiquitin to relevant protein. The transport of polyubiquitinated protein follows to proteasome, where protein is cleaved into small peptides. Besides polyubiquitin attachment to protein, monoubiquitinylation of proteins exists and has an important role in DNA repair, transcription of genes, endocytosis and signal transduction. The function of an important transcription factor NF-κB is connected with proteasome. NF-κB is activated after the proteolysis of its inhibitor IκB in proteasome. Ubiquitinylation and degradation of protein in proteasome and the activation of NF-κB play significant roles in taking proteins away and in expression of great numbers of genes important for the regulation of the cell cycle and apoptosis of cells. The inhibition of proteasomes has antiproliferative and antiinflammatory effects and opens new therapeutic approaches to a treatment of cancer and some inflammatory diseases. We divided the review into three parts: I. *Ubiquitin-proteasome system and the transcription factor NF-κB*, II. *Sumoylation and neddylation as post-translational modification of proteins similar to ubiquitinylation and their significance* and lastly III. *Using of the knowledge of ubiquitin-proteasome system in cancer and other diseases therapy*.

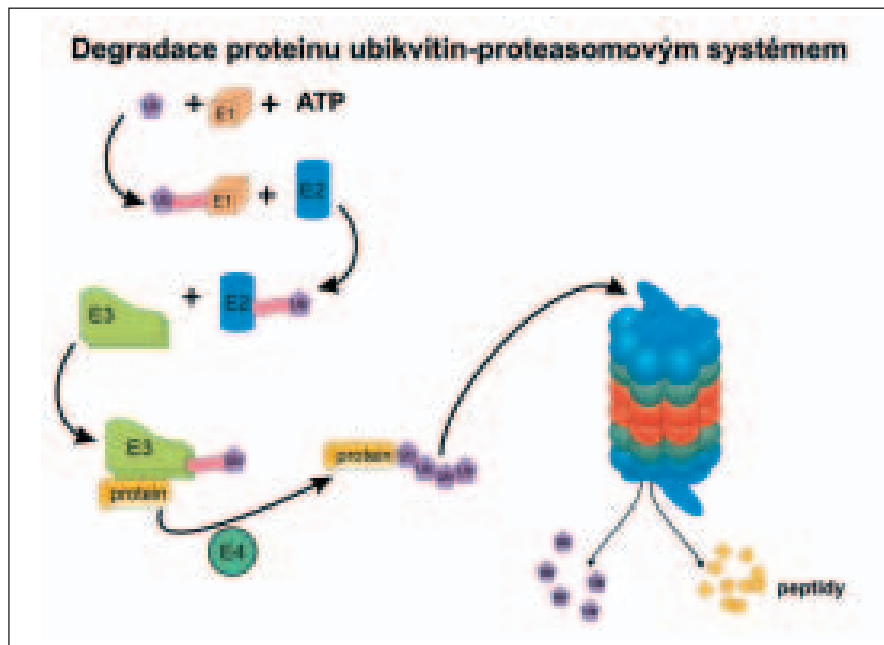
**Key words:** ubiquitin – proteasome – transcription factor NF-κB

### Úvod

**Proteazomy** se vyskytují ve všech eukaryotických buňkách, v kterých zajišťují z velké části proteolýzu. Selektivně rozkládají některé regulační proteiny a podílejí se na celé řadě zá-

kladních funkcí buněk. Proteazomy, známé též pod názvy prozomy nebo multikatalytické proteinázy, objevil Harris [1] koncem 60. let 20. století při elektronmikroskopickém studiu proteinových částic v extraktech lid-

ských erytrocytů. Arrigo et al [2] zavedli v roce 1988 termín proteazomy, který odpovídá mikročasticím, „tělískům“ ve tvaru válce s aktivitou proteáz. Vyskytují se už u archebakterií rodu *Thermoplasma acidophilum*.



**Obr. 1. Schéma ubikvitinylace substrátu (proteinu určeného k degradaci v proteazomu) a jeho proteolýza na malé peptidy v proteazomu. Průběh obou pochodů je popsán v textu.**

Sekvenční shoda podjednotek proteazomů těchto bakterií a proteazomů lidských dosahuje až 40 % [3]. Ztráta funkce proteazomů mutací jejich složek u kvasinek byla pro buňky letální. Stejného důsledku, tj. smrti buňky, lze dosáhnout u buněk savců pomocí specifických inhibitorů proteazomu.

Proteazomy jsou úzce spjaty se systémem ubikvitinů. **Ubikvitin** byl izolován již v roce 1975 skupinou Goldsteina [4]. Ještě v roce 1984 bylo publikováno méně než 100 prací s klíčovým slovem ubikvitin. Dnes je výzkum v této oblasti daleko rozsáhlejší; svědčí o tom asi 1 000 publikací v roce 2003. Za objev mechanismu označení proteinů určených k rozkladu v proteazomu polyubikvitinem [5–9] byli v roce 2004 odměněni Nobelovou cenou za chemii Aaron Ciechanover a Avram Herschko z Izraele a Irwin Rose z USA. Jejich objev bude moci být využit k výrobě léků proti mnohým onemocněním.

#### Ubikvitin a ubikvitinylace

Ubikvitiny jsou malé polypeptidy (76 aminokyselinových zbytků), které

jsou přítomny ve všech studovaných eukaryotických buňkách a tkáních. Termín ubikvitin pochází z latinského slova všudypřítomný. Sekvence aminokyselin ubikvitinu je velmi konzervativní a liší se jen ve 3 aminokyselinových zbytcích mezi ubikvitinem kvasinek a člověka. Ubikvitin je kódován genem pro **polyubikvitin**, kde sekvence kódující několik ubikvitinů následují za sebou bez intronů (vložených nekódujících sekvencí) [10]. Ubikvitin je však také kódován fúzními geny s informací jak pro ubikvitin, tak pro malé ribozomální podjednotky [11]. V buňkách se ubikvitin nachází jen ve formě jednoho proteinu (**monoubikvitin**).

**Proteazom-ubikvitinová cesta** (ubiquitin-proteasome pathway) spočívá ve čtyřstupňové **enzymatické kaskádě**, ve které dochází za použití ATP a energie k označení proteinu, určeného pro rozklad v proteazomu [9,12–14], jak ukazuje obr. 1. **Enzym E1 (aktivující enzym)** aktivuje C-konec bílkoviny ubikvitinu a tvoří s ní meziprodukt E1-ubikvitin. Aktivovaný ubikvitin je přemístěn z E1 na thiolovou skupinu **konjugujícího**

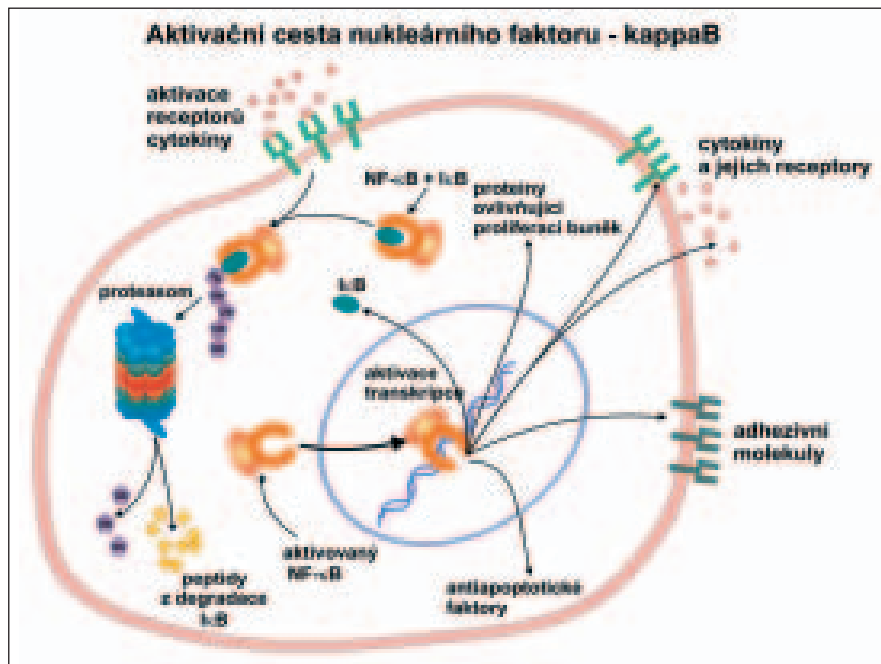
**ho enzymu E2**. Ve třetím stupni se ubikvitin připojí na **ubikvitinligázu E3**, která už specificky rozpoznává bílkovinný substrát, tedy protein určený k degradaci. C-konec ubikvitinu je potom spojen s 6-aminoskupinou lyzinu v proteinu, určeném k proteolýze. Na protein musí být napojeny další molekuly ubikvitinu, což je úloha **elongačního faktoru E4** [15]. Ubikvitin obsahuje 7 lyzinových zbytků. Jeden z nich (**Lys-48**) je použit k připojení dalších molekul ubikvitinu při polyubikvitinylationi [16]. Polyubikvitin je složen z minimálně 4 ubikvitinů. Teprve po připojení více ubikvitinů, minimálně jakéhosi „čtyřspřeží“ ubikvitinů, tzv. polyubikvitinu, je bílkovina určená k proteolýze rozpoznána a dopravena k proteazomu (obr. 1). Do proteazom-ubikvitinového systému patří i rodina **deubikvitinylačních enzymů**, které odštěpují ubikvitin ze substrátu [17–19]. Ovlivňují stabilitu ubikvitinem označených proteinů a hladinu volného ubikvitinu.

**Ubikvitinligázy (E3)** jsou velmi početnou heterogenní skupinou proteinů, které umožňují najít a specificky označit polyubikvitinem určité proteiny určené k proteolýze. Pravděpodobnost, že menší skupina proteinů nebo dokonce jednotlivé proteiny mají svou vlastní ubikvitinligázu, dává naději pro vývoj inhibitoru pro velmi cílenou a specifickou terapii. Projekt sekvenace lidského genomu ukázal přítomnost více než 40 různých enzymů E2, přes 500 enzymů E3 a více než 80 různých deubikvitinylačních enzymů [20]. Pro značnou část proteinů, určených k degradaci v proteazomech, zatím neznáme rozpoznávací znaky. Obecně si např. představujeme, že v systému ubikvitin-proteazom je rozpoznávána změna konformace bílkoviny, která splnila svou funkci a má být rozložena. Nejde však jen o odklizení „starých“ bílkovin, ale ubikvitin-proteazomový systém je důležitý pro splnění některých fyziologických

funkcí v buňce. Pro některé z těchto procesů už známe mechanismy, které určují proteolýzu cílové bílkoviny nebo naopak chrání takovou bílkovinu před degradací. Zde uvádíme tři příklady.

1. Proteiny s krátkou životností obsahují specifické degradační signály („degrony“), často označované také jako **destrukční box**. Tato N-koncová sekvence je signálem pro ubikvitinylaci a následnou degradaci v proteazomu [21–25]. Uvedená sekvence obsahuje bazické a hydrofobní aminokyseliny, které destabilizují protein podle tzv. pravidla N-konce [24–26]. Ubikvitinylace podle pravidla N-konce probíhá např. u C-koncového fragmentu **kohezinu** během mitózy [27]. Kohezin spojuje dvě sesterské chromatidy, které musí být odděleny během mitózy a stávají se na sobě nezávislými dceřinými chromozomy. Při ubikvitinylaci **cyklinů**, uvádějících buňku do cyklu, je důležitá krátká sekvence 9 aminokyselin na N-konci těchto bílkovin (destrukční box). Tato sekvence je rozpoznávána ubikvitinligázou E3 a molekula cyklinu může být odbourána. Tím končí fáze dělení buňky.

2. V degradaci transkripčního faktoru **HIF-1 $\alpha$**  (hypoxia-inducible transcription factor 1  $\alpha$ ) hraje úlohu **hydroxylace** tohoto proteinu. HIF-1 $\alpha$  reaguje na hladinu kyslíku. Při normálních hladinách kyslíku je životnost  $\alpha$ -subjednotky tohoto faktoru velmi krátká (méně než 5 minut). E3-ubikvitinligáza rozpoznává hydroxylaci HIF-1 $\alpha$  na prolinovém zbytku (Pro564) a rychle uvádí tento protein do proteolýzy [28]. Naopak při hypoxii nedochází k hydroxylaci prolinového zbytku faktoru HIF-1 $\alpha$ , a tím ani ne k jeho proteolytické degradaci. Subjednotka HIF-1 $\alpha$  se spojí se subjednotkou  $\beta$ , faktor se přemístí z cytoplazmy do jádra, kde aktivuje transkripci genů pro erythropoetin, transferinový receptor, vaskulární endoteliální růstový faktor a další geny indukované hypoxií.



**Obr. 2.** Schéma aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B degradací jeho inhibitoru I $\kappa$ B v proteazomech. Po stimulaci buňky např. cytokiny dojde k fosforylaci a polyubikvitinylaci inhibitoru I $\kappa$ B a jeho rozkladu v proteazomech. Degradace I $\kappa$ B umožní přestup transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B do jádra buňky, kde nasedá na promotory různých genů a spouští jejich transkripci. Indukuje tak tvorbu cytokinů a jejich receptorů, antiapoptotických faktorů, adhezivních molekul, proteinů ovlivňujících proliferaci buněk a svého vlastního inhibitoru I $\kappa$ B.

3. **Fosforylace** je další modifikací proteinu určeného k degradaci. Fosforylace dvou specifických serinových zbytků na I $\kappa$ B (inhibitoru transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B) pomocí IKK (kináza I $\kappa$ B) je předpokladem pro rozpoznání tohoto proteinu enzymem E3 nebo-li ubikvitinligázou [29]. Ubikvitinylovaný inhibiční faktor I $\kappa$ B je potom v proteazomu odbourán. Obdobně **fosforylace** dvou aminokyselinových zbytků (treoninu a serinu) **c-myc** vede k rozpoznání tohoto proteinu enzymem E3 nebo-li ubikvitinligázou a k degradaci v proteazomech [30].

Je třeba upozornit, že fosforylace může mít i opačný efekt např. v případě **proteinu p53**. V odpovědi na poškození DNA je p53 **fosforylován**. Fosforylovaná forma proteinu p53 se nemůže vázat s ligázou E3 [31]. Protein p53 je stabilizovaný a může splnit svou úlohu uvést do apoptózy potencionálně maligní buňku.

### Transkripční faktor NF- $\kappa$ B

Ubikvitin-proteazomový systém je úzce spjat s aktivací transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B (nukleární faktor  $\kappa$ B). Aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B je vázána na proteolýzu svého inhibičního faktoru I $\kappa$ B v proteazomu (obr. 2) [32–34]. NF- $\kappa$ B je v cytoplazmě buněk asociován se svým inhibitelem I $\kappa$ B. Po stimulaci buňky cytokiny, chemokiny, bakteriálními a virovými produkty, UV zářením a volnými radikály dochází k aktivaci NF- $\kappa$ B. Uvedený inhibitor I $\kappa$ B je fosforylován proteinkinázou IKK, jak jsme již uvedli. Fosforylace je nezbytným předpokladem pro polyubikvitinylaci a degradaci I $\kappa$ B v proteazomu. Aktivovaný NF- $\kappa$ B, který se zbavil svého inhibitoru I $\kappa$ B, pak může přestoupit z cytoplazmy buňky do jádra buňky. Zde tento transkripční faktor řídí transkripci cílových genů pro řadu antiapoptotických proteinů (např. bcl 2, bcl-XL, buněčné

inhibitory apoptózy IAP1, IAP2 a další), pro cytokiny (např. interleukiny IL1 $\beta$ , IL2, IL6 a IL8, TNF $\alpha$  a další), pro proteiny ovlivňující proliferaci buněk (např. c-myc, cyklin D1 a další), pro receptory (např. receptor pro IL 2, receptor T lymfocytů a další), pro adhezni molekuly, např. ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1) a VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), pro vlastní inhibitor I $\kappa$ B a pro enzymy zúčastněné v zánětlivém procesu, např. iNOS (indukovatelná forma NO syntézy), COX2 (cyklooxygenáza 2) a další [35–37].

Aktivovaný NF- $\kappa$ B má tedy silný proliferanční a antiapoptotický efekt; převedeno do kliniky, podporuje růst nádorových buněk a jejich metastazování. Naopak inhibice NF- $\kappa$ B umožní apoptózu nádorové buňky. Takovým inhibitorem je bortezomib (Velcade), slibný protinádorový lék. Bortezomib nevyvolává apoptózu nádorových buněk jen inhibicí NF- $\kappa$ B, ale řadou dalších mechanismů. Mimo jiné bortezomib indukuje apoptózu způsobením stresu v endoplazmatickém retikulu buněk a vyvoláním tvorby reaktivních sloučenin kyslíku (ROS, „reactive oxygen species“) [38,39]. S těmito ději je spojena aktivace proapoptotických proteinů bik („bcl2-interacting killer“) a Noxa (pojmenování převzato z latiny) [40–43].

NF- $\kappa$ B plní funkci v zánětlivé reakci. Aktivovaný NF- $\kappa$ B v endoteliálních buňkách vede k syntéze adhezivních molekul, které způsobí koncentraci leukocytů v místě zánětu. Klinický význam inhibice proteazomů bude podrobněji probrán ve III. části.

### Monoubikvitinylace a polyubikvitinylace na jiném lyzinu než Lys-48

Vedle polyubikvitinylace proteinu může dojít k jeho **monoubikvitinylaci**. Monoubikvitinylace proteinu ho nepředurčuje k degradaci v proteazomech, ale hraje úlohu v endocytóze, opravě DNA, aktivaci proteinkináz v přenosu signálu a v regulaci struk-

tury chromatinu a transkripce [44–46]. **Polyubikvitinylace na jiném lyzinovém zbytku než uvedeném Lys-48 prvního připojeného ubikvitinu k proteinu**, např. na Lys-63, hraje také úlohu v procesech uvedených u monoubikvitinylace, a ne v degradaci proteinů v proteazomech [47,48].

Příkladem úlohy monoubikvitinylace proteinu v **endocytóze receptorů** je receptor pro epidermální růstový faktor (**EGFR**), který náleží do rodiny tyrosinkinázových receptorů [49, 50]. Malé molekuly se do buňky dostávají difuzí přes buněčnou membránu, ale makromolekuly (např. hormony, ale i viry) procesem endocytózy. Endocytóza může být zprostředkována receptory na buněčném povrchu. Makromolekuly se vážou k odpovídajícím receptorům a vstupují do buňky v podobě komplexů s receptory v klatrinových váčcích. Bílkovina klatrin (clathrin) se podílí na endocytóze právě pomocí při tvorbě uvedených váčků (vezikul), které se odědí z buněčné membrány a putují se svým obsahem na místo určení. Endocytóza zprostředkovaná receptory se využívá k příjmu řady pro buňku esenciálních látek (např. železa, vitaminu B<sub>12</sub>, cholesterolu vázaného na proteiny ve formě lipoproteinů s nízkou hustotou a dalších). Endocytóza probíhá sadou spojených membránových trubiček a větších váčků, které lze dělit na rané a pozdní endozomy. Vnitřek endozomálního oddílu je udržován v kyselém stavu ATP poháněnou H<sup>+</sup> pumpou. Kyselé prostředí endozomu vede k uvolnění vázaného nákladu z receptoru.

Endocytóza EGFR při fyziologické koncentraci epidermálního růstového faktoru (EGF) probíhá popsaným procesem endocytózy zprostředkované receptory přes uvedené klatrinové váčky. Při vyšší koncentraci ligandu však endocytóza EGFR probíhá cestou nezávislou na klatrinu a signálem pro tuto endocytózu je monoubikvitinylace EGFR na více místech

jeho molekuly. Endocytóza nezávislá na klatrinu vyžaduje rozpoznávací receptory pro ubikvitin (epsin a Eps15 – „EGFR pathway substrate 15“), které slouží po rozpoznání monoubikvitinylovaného EGFR jako jeho adaptory v endocytické pouti přes endozomy do lyzozomů [49,50]. Tyto rozpoznávací receptory obsahují ve své sekvenci aminokyselinových zbytků oblasti interagující s ubikvitinem. Zatímco endocytóza EGFR závislá na klatrinu umožňuje recyklaci nedegradovaného receptoru (EGFR) zpět na buněčnou membránu, monoubikvitinylace EGFR předurčí EGFR ke degradaci v lyzozomech a ukončí tak přenos signálu vyvolaný nefyziologickou koncentrací EGF.

Dalším příkladem vlivu monoubikvitinylace proteinu na jeho umístění v buňce a posléze vedoucí k **opravě DNA** je jeden z **proteinů Fanconioho anémie** (FANCD2, Fanconi disease). Fanconioho anémie je vzácným autosomálně recesivním syndromem, vrozeným onemocněním charakterizovaným nestabilitou chromozomů a predispozicí k leukemii [51,52]. FANCD2 je monoubikvitinylován ve fázi S buněčného cyklu na specifickém lyzinovém zbytku a tato modifikace stimuluje jeho translokaci do specifické oblasti jádra buňky, kde interaguje s proteiny BRCA1, BRCA2 (proteiny pro náchylnost k rakovině prsu). Dále interaguje s proteiny FANCD1 a RAD51 (jeden z rodiny proteinů – produktů exprese „radiation“ genů – angažovaných v „repair“ DNA) a celý komplex uvedených proteinů se podílí na opravě poškozené DNA.

Monoubikvitinylace **histonů** H2A a H2B hraje úlohu v transkripci genů. Molekula ubikvitinu má asi poloviční velikost ve srovnání s histony. Přítomnost ubikvitinylovaných histonů v nukleozomální struktuře chromatinu **rozvolňuje chromatin a stimuluje transkripci**. Mechanismus této stimulace transkripce spočívá v lepším přístupu transkripčních

faktorů k DNA podobně jako při rozvolnění chromatinu acetylací histonů.

Monoubikvitinylace a deubikvitinylace histonů je charakteristická i pro průběh buněčného cyklu. Deubikvitinylované histony jsou přítomny během G2 až M-fáze buněčného cyklu, kdy je chromatin v kondenzovaném stavu. Monoubikvitinylované histony se objeví až v G1 fázi buněčného cyklu, kdy podporují rozvolnění chromatinu. Tedy ubikvitinylace a deubikvitinylace histonů mají opačný vliv na transkripci [53]. Monoubikvitinylace histonu H2B podporuje metylaci histonu H3 a způsobí stimulaci transkripce [44,53,54]. Obecně však metylace histonu H3 nevede vždy ke stimulaci transkripce [55,56].

Polyubikvitinylace na jiném lyzinu než Lys-48 prvního připojeného ubikvitinu nevede k degradaci substrátu v proteazomu. Tento způsob polyubikvitinylace hraje úlohu v aktivaci proteinkináz. Jedná se například o polyubikvitinylaci několika faktorů účastnících se aktivace proteinkinázy IKK, která má, jak jsme uvedli, důležitou úlohu v aktivaci NF- $\kappa$ B. Polyubikvitinylace těchto faktorů probíhá na Lys-63 prvního připojeného ubikvitinu. Uvedená polyubikvitinylace vede nejprve k aktivaci proteinkinázy TAK1 (TGF- $\beta$  activated kinase 1), která následně aktivuje IKK [45–57]. Proteinkináza TAK1 má také schopnost aktivovat c-Jun N-terminální kinázu (JNK) a p38 kinázu.

### Proteazomy

Proteazom je komplexní bílkovinná částice o sedimentační konstantě 26S a hmotnosti přibližně 2,5 megadaltonů. Proteazomy jsou přítomny v cytoplazmě i v jádře všech eukaryotických buněk [58].

Proteazom se skládá ze dvou funkčních komplexů proteinů (obr. 3). První část (tělo proteazomu) nese katalytickou aktivitu a má tvar sudu délky 15 nm a průměru 11 nm. Sklá-



**Obr. 3. Schématické znázornění 26S proteazomu a jeho podjednotek. Protein regulační podjednotky, Rpn 10, může interagovat se základnou zátky i víčkem zátky v regulační části (podjednotce) proteazomu o sedimentační konstantě 19 S. Rpn 10 má i důležitou úlohu v rozpoznání substrátu pro degradaci v proteazomu, a to svou schopností vázat polyubikvitinový řetězec (receptor pro ubikvitin). ATPázy hrají úlohu v rozbalení proteinu, které mu umožňuje vstup do proteolytického centra proteazomu.**

dá se ze čtyř segmentů a má sedimentační konstantu 20S. Dva vnitřní segmenty jsou složeny ze sedmi různých β-podjednotek a dva vnější segmenty ze sedmi různých α-podjednotek. Proteolytickou aktivitu mají 3 ze 7 β-podjednotek a obsahují v katalytickém aktivním centru treoninový nebo serinový zbytek. Proteolytická aktivita je podobná trypsinu, chymotrypsinu a peptidylglutamylpeptid hydroláze [59–63]. Tělo sudu je z obou stran uzavřeno jakýmsi zátkami či pokličkami, tvořenými komplexem proteinů o sedimentační konstantě 19S, který nese název regulační částice (RP). **Regulační podjednotka proteazomu** (její protein Rpn10 u kvasinek nebo jeho lidský homolog S5a) a další proteiny s ní asociované se podílí na rozpoznání

polyubikvitinylovaného proteinu a na jeho vtažení dovnitř do dutiny proteazomu (viz obr. 3) [64–67]. Uvedené proteiny tedy slouží jako rozpoznávací receptory, které proteazom využívá k výběru proteinů určených k degradaci a k jejich dopravě do proteazomu. V proteazomu, jakémisi „minimixéru“, dojde k rozbalení proteinu a odštěpení ubikvitinů z polyubikvitinylovaných proteinů. Protein je dále rozložen na krátké oligopeptidy, které spolu s molekulami ubikvitinu jsou vypuštěny z proteazomu (obr. 3).

### Degradace proteinů v proteazomech nezávislá na předchozí polyubikvitinylaci proteinů

U některých proteinů dochází k degradaci v proteazomech nezávisle na

ubikvitinylaci příslušných proteinů [68–72]. Jako rozpoznávací znak pro proteazomy zde slouží jiný protein interagující s proteinem určeným k degradaci nebo nějaký degradační signál v sekvenci proteinu určeného k degradaci. Například ornitindekarboxyláza využívá dalšího proteinu antizymu jako signálu k rozkladu v proteazomech [68,69]. V proteazomech dochází i k degradaci důležitého inhibitoru na cyklinech závislých kináz (cdk), proteinu p21<sup>waf1/cip1</sup> nezávisle na předchozí polyubikvitinylaci [70]. Některé proteiny, například supresory vzniku nádorů, proteiny p53 a p73, jsou degradovány v proteazomech po předchozí polyubikvitinylaci i bez ní [72].

#### Inhibice degradace proteinů v proteazomech pomocí ubistatinů

Nízkomolekulární přirozené inhibitory (ubistatiny) se váží na řetězec polyubikvitinu připojený k proteinu určenému k degradaci v proteazomech, a ruší tím jeho interakci s proteazomy. Konkurují rozpoznávacím receptorům proteazomů pro ubikvitin [73,74]. V kapitole o proteazomech jsme popsali uvedené receptory proteazomů pro rozpoznání polyubikvitinylovaného proteinu. Ubistatiny jsou tedy schopné zrušit interakci protein-protein (polyubikvitinylovaný protein-vyhledávací receptor pro ubikvitin). Tato schopnost ubistatinů bude jistě využita při vývoji obdoby farmakologicky účinných látek.

#### Funkční důležitost degradace proteinů v proteazomech

Původně se proteazomu připisovala funkce „uklízecí čtyř buňky“, která měla likvidovat – odbourat proteiny, které už ukončily svou funkci. Odhaduje se, že 80 % proteinů určených k proteolýze, je degradováno v proteazomu. Brzo se však ukázalo, že ubikvitin-proteazomový systém má další funkce: účastní se v procesu rozpoznávání antigenních struktur, hraje významnou úlohu v regulaci

buněčného cyklu, podporuje proliferaci buněk a má významnou úlohu v apoptóze buněk [59,60,75–77].

Příkladem práce proteazomu v **procesu rozpoznávání antigenních struktur** je jeho úloha v dendritických buňkách v systému rozpoznávání a prezentace antigenu pro cytotoxickou reakci zprostředkovanou T-lymfocyty. Antigen je v proteazomu rozložen na fragmenty (krátké peptidy o 8–11 aminokyselinových zbytcích), které jsou transportovány pomocí specifických přenašečů do endoplazmatického retikula ke glykoproteinům MHC I. třídy. Ve spojení s histokompatibilním komplexem je pak peptid externalizován na povrch buňky a prezentován T-lymfocytům [78,79].

Úloha proteazomu v **regulaci buněčného cyklu** je zprostředkována mimo jiné aktivací transkripčního faktoru NF-κB a degradační cyklinů, jak jsme se již zmínili v kapitole Ubikvitin a ubikvitinylace. Aktivovaný NF-κB má tedy silný proliferační a antiapoptotický vliv. Degradace cyklinů v ubikvitin-proteazomovém systému vede k zástavě buněčného cyklu. Vedle toho jsou i inaktivovány kinázy závislé na cyklinech (cdk). Inhibitor těchto kináz, protein p27<sup>kip1</sup>, je také degradován v ubikvitin-proteazomovém systému. Další inhibitor cdk, p21<sup>waf1/cip1</sup>, je také rozložen proteazomy, ale bez předchozí polyubikvitinylace. Snížení hladiny těchto inhibitorů cdk stimuluje proliferaci buňky.

Vliv degradace proteinů v ubikvitin-proteazomovém systému na **apoptózu buněk** byl již zmíněn při popisu regulace aktivity transkripčního faktoru NF-κB, kdy dochází k degradaci jeho inhibičního faktoru IκB v proteazomech. Zmínili jsme se také o degradaci dalšího důležitého faktoru v aktivaci apoptózy buněk, proteinu p53, v ubikvitin-proteazomovém systému. Proteiny rodiny bcl2 pro- a anti-apoptotických proteinů jsou také degradovány v ubikvitin-

proteasomovém systému. Inhibitory apoptózy, proteiny IAP (inhibitor of apoptosis protein) vykazují aktivitu ubikvitinligáz a mohou být proto auto-ubikvitinylovány a degradovány, a tím je spuštěna apoptóza buněk.

#### Závěr

Díky intenzivnímu výzkumu ubikvitinylace a funkce proteazomu lze očekávat v dohledné době další informace o ubikvitinylaci a účasti proteazomu ve specifických buněčných procesech. Aktivita ubikvitinligáz i připravenost proteinů určených k degradaci (substrátů) je regulována fosforylací a dalšími posttranslačními modifikacemi, které zřejmě budou postupně v jednotlivých dosud nepopsaných případech objeveny a popsány. Důležitým faktorem bude také, kde v buňce k degradaci specifických proteinů v proteazomech dochází vzhledem k jejich umístění jak v cytoplazmě, tak v jádře buňky. Zatím nevíme, zda složení jaderných a cytoplazmatických proteazomů je shodné, či se nějak liší. Výzkum endogenních inhibitorů proteazomů a jejich cíleného působení v subcelulárních strukturách bude jistě také přístupem v blízké budoucnosti. Zatím popsané nízkomolekulární přirozené inhibitory (ubistatiny) jsou schopné zrušit interakci polyubikvitinylovaného proteinu s receptory proteazomů pro ubikvitin, a působí tak na úrovni přísunu polyubikvitinylovaných proteinů určených k degradaci k proteazomu. Otázka specifických inhibitorů jednotlivých enzymů E3 (ubikvitinligáz) pro cílené terapeutické využití a inhibitorů proteazomu s klinickými konsekvencemi bude probírána ve III. části přehledu. Inhibice proteazomů umožňuje apoptózu buněk potlačením aktivity transkripčního faktoru NF-κB a zvýšením aktivity proteinu p53, dalších proapoptotických proteinů a inhibitorů cdk. Zatím provedené klinické studie ukazují, že maligní buňky jsou daleko citlivější k inhibici pro-

teazomů než normální buňky zdravých jedinců. Již dnes je jasné z pokusů na zvířecích modelech a tkáňových a buněčných kulturách, že vedle onkologických onemocnění se inhibitory proteazomů uplatní v léčbě některých zánětlivých reakcí kolem ischemických ložisek (např. při cévní mozkové příhodě nebo u experimentálního infarktu myokardu). Naopak u neurologických onemocnění spojených s hromaděním bílkovinných komplexů (Alzheimerova, Huntingtonova a Parkinsonova choroba, Angelmanův syndrom a další onemocnění) dochází k poruchám v ubikvitin-proteazomovém systému a je třeba naopak zajistit jeho proteolytickou funkci. Podrobnější poznání příčin těchto a podobných onemocnění na základě poruch v ubikvitin-proteazomovém systému jistě povede k účinnějším způsobům jejich léčeni.

Práce vznikla za podpory grantu NC/7605-3 Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky.

## Literatura

- Harris JR. Release of a macromolecular protein component from human erythrocyte ghosts. *Biochim Biophys Acta* 1968; 150: 534–537.
- Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL et al. Identity of the 19 S „prosome“ particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 1988; 331: 192–194.
- Zwickl P, Lottspeich F, Dahlmann B et al. Cloning and sequencing of the gene encoding the large (alpha-) subunit of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett* 1991; 278: 217–221.
- Goldstein G, Scheid M, Hammerling U et al. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 11–15.
- Hershko A, Ciechanover A, Heller H et al. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1783–1786.
- Hershko A, Heller H, Elias S et al. Components of ubiquitin-protein ligase system. *J Biol Chem* 1983; 258: 8206–8214.
- Hershko A, Heller H, Eytan E et al. ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1619–1623.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425–479.
- Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82: 373–428.
- Baker RT, Board PG. The human ubiquitin gene family: structure of a gene and pseudogenes from the Ub B subfamily. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 443–463.
- Baker RT, Board PG. The human ubiquitin-52 amino acid fusion protein gene shares several structural features with mammalian ribosomal protein genes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 1035–1040.
- Adams J. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Drug Discovery Today* 2003; 8: 307–315.
- Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695: 55–72.
- Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 79–87.
- Hoppe T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: „one size“ doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 183–187.
- Pickart CM. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 544–548.
- Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J* 1997; 11: 1245–1256.
- D'Andrea A, Pellman D. Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1998; 33: 332–337.
- Wilkinson KD. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 141–148.
- Wong BR, Parlanti F, Qu K et al. Drug discovery in the ubiquitin regulatory pathway. *Drug Discov Today* 2003; 8: 746–754.
- Bachmair A, Finley DJ, Varshavsky A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 1986; 234: 179–186.
- Bachmair A, Varshavsky A. The degradation signal in a short-lived protein. *Cell* 1989; 56: 1019–1032.
- Chau V, Tobias JW, Bachmair A et al. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 1989; 243: 1576–1583.
- Johnson ES, Gonda DK, Varshavsky A. Cis-trans recognition and subunit-specific degradation of short-lived proteins. *Nature* 1990; 346: 287–291.
- Bartel B, Wüning I, Varshavsky A. The recognition component of the N-end rule pathway. *EMBO J* 1990; 9: 3179–3189.
- Varshavsky A, Turner G, Du F et al. The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biol Chem* 2000; 381: 779–789.
- Rao H, Uhlmann F, Nasmyth K et al. Degradation of cohesin subunit and the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. *Nature* 2000; 410: 955–959.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM et al. Targeting of HIF-1α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292: 468–472.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-κB activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621–663.
- Amati B. Myc degradation: dancing with ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8843–8844.
- Ashcroft M, Taya Y, Vousden KH. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3224–3233.
- Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-κB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066–1071.
- Yaron A, Hatzubai A, Davis M et al. Identification of the receptor component of the IκB-ubiquitin ligase. *Nature* 1998; 396: 590–594.
- Yaron A, Gonen H, Alkalay I et al. Inhibition of NF-κB cellular function via specific targeting of the IκB-ubiquitin ligase. *EMBO J* 1997; 16: 6486–6494.
- Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-κB pathway. *Nature Cell Biol* 2005; 7: 758–765.
- Yamamoto Y, Gaynor RB. IκB kinases: key regulators of the NF-κB pathway. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 72–79.
- Leníček M, Muchová L, Víték L. Nukleární faktor κB v léčbě zánětlivých a nádorových onemocnění. *Čas Lék Čes* 2004; 143: 680–684.

38. Fribley A, Zeng Q, Wang CY. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 9695–9704.
39. Nawrocki ST, Carew JS, Dunner K et al. Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 11510–11519.
40. Zhu H, Zhang L, Dong F et al. Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene* 2005; 24: 4993–4999.
41. Nikrad M, Johnson T, Puthalath H et al. The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 443–449.
42. Qin JZ, Ziffra J, Stennett L et al. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6282–6293.
43. Pérez-Galán P, Roué G, Villamor N et al. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* 2006; 107: 257–264.
44. Johnson ES. Ubiquitin branches out. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E295–E298.
45. Schnell JD, Hicke L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 2003; 278: 35857–35860.
46. Sun L, Chen ZJ. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 119–126.
47. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 503–533.
48. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 169–178.
49. Aguilar RC, Wendland B. Endocytosis of membrane receptors: Two pathways are better than one. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2679–2680.
50. Sigismund S, Woelk T, Puri C et al. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2760–2765.
51. D'Andrea AD. The Fanconi road to cancer. *Genes Dev* 2003; 17: 1933–1936.
52. Montes de Oca R, Andreassen PR, Margossian SP et al. Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with chromatin. *Blood* 2005; 105: 1003–1009.
53. Zhang Y. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev* 2003; 17: 2733–2740.
54. Zhu B, Zheng Y, Pham AD et al. Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol Cell* 2005; 20: 601–611.
55. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2001; 15: 2343–2360.
56. Zhang K, Dent SYR. Histone modifying enzymes and cancer: going beyond histones. *J Cell Biochem* 2005; 96: 1137–1148.
57. Deng L, Wang C, Spencer E et al. Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000; 103: 351–361.
58. Wojcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 579–589.
59. Fuchs O. Proteazomy. *Biol Listy* 1996; 61: 13–27.
60. Špička I, Kleibl Z, Hájek R. Bortezomibum. *Remedia* 2005; 15: 196–203.
61. Groll M, Huber R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 606–616.
62. Pickart CM, Cohen RE. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 77–187.
63. Wolf DH, Hilt W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695: 19–31.
64. Madura K. Rad23 and Rpn10: perennial wallflowers join the m $\acute{e}$ lée. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 637–640.
65. Verma R, Oania R, Graumann J et al. Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* 2004; 118: 99–110.
66. Elsasser S, Finley D. Delivery of ubiquitinated substrates to protein/unfolding machines. *Natur Cell Biol* 2005; 7: 742–749.
67. Varadan R, Assfalg M, Raasi S et al. Structural determinants for selective recognition of a Lys48-linked polyubiquitin chain by a UBA domain. *Mol Cell* 2005; 18: 687–698.
68. Orlowski M, Wilk S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys* 2003; 415: 1–5.
69. Hoyt MA, Coffino P. Ubiquitin-free routes into the proteasome. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 1596–1600.
70. Chen X, Chi Y, Bloecher A et al. N-acetylation and ubiquitin-independent proteasomal degradation of p21 (Cip1). *Mol Cell* 2004; 16: 839–847.
71. Asher G, Bercovich Z, Tsvetkov P et al. 20S proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by NQO1. *Mol Cell* 2005; 17: 645–655.
72. Asher G, Tsvetkov P, Kahana C et al. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev* 2005; 19: 316–321.
73. Bellows DS, Tyers M. Chemical genetics hits „reality“. *Science* 2004; 306: 67–68.
74. Verma R, Peters NR, D'Onofrio M et al. Ubistatins inhibit proteasome-dependent degradation by binding the ubiquitin chain. *Science* 2004; 306: 117–120.
75. Špička I, Klener P. Inhibitory proteasomu – nová možnost léčby nádorových onemocnění. *Čas Lék Čes* 2004; 143: 701–704.
76. Burger AM, Seth AK. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Europ J Cancer* 2004; 40: 2217–2229.
77. Rajkumar V, Richardson PG, Hideshima T et al. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 630–639.
78. Heemels M-T, Ploegh H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 463–491.
79. Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J et al. An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* 2004; 304: 587–590.

Ing. Ota Fuchs

[www.ubkt.cz](http://www.ubkt.cz)

e-mail: [Ota.Fuchs@ubkt.cz](mailto:Ota.Fuchs@ubkt.cz)

Doručeno do redakce: 7. 10. 2005

Přijato po recenzi: 26. 1. 2006