

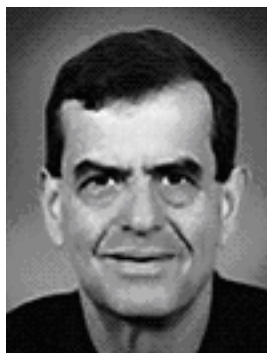


КАТАРИНА МИЛОВАНОВИЋ, студент биохемије, Хемијски факултет Универзитета у Београду, (katarina_milovanovic@yahoo.com) и

НАТАЛИЈА ПОЛОВИЋ, Катедра за биохемију, Хемијски факултет Универзитета у Београду, (polovicn@chem.bg.ac.yu)

ОВАЈ ТЕКСТ ЈЕ ПОСВЕЂЕН ОВОГОДИШЊИМ ДОБИТНИЦИМА НОБЕЛОВЕ НАГРАДЕ ЗА ХЕМИЈУ

НОБЕЛОВА НАГРАДА ЗА ХЕМИЈУ, 2004. ГОДИНЕ
За откриће деградације протеина посредоване убиквитином

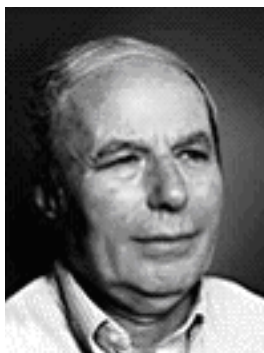


Арон Чикановер
(**Aaron Ciechanover**)

Израел

Technion – Израелски институт за технологију
Хаифа, Израел

рођен 1947. године у Израелу

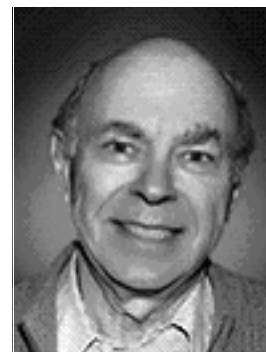


Аврам Хершко
(**Avram Hershko**)

Израел

Technion – Израелски институт за технологију
Хаифа, Израел

рођен 1937. године у Мађарској



Ирвин Роуз
(**Irwin Rose**)

САД

Калифорнијски Универзитет
Irvine, CA, САД

рођен 1926. године у САД

УБИКВИТИНОМ ПОСРЕДОВАНА ДЕГРАДАЦИЈА
УНУТАРЋЕЛИЈСКИХ ПРОТЕИНА

У еукариотској ћелији је присутно од 6000 до 30000 гена који кодирају (носе информацију за биосинтезу) бар исто толико протеина са веома различитим функцијама. Протеини у ћелији имају свој полуживот који може трајати од пар минута до више од неколико недеља. Биосинтеза и деградација протеина до аминокиселина у ћелији се паралелно одвијају. Контролисана и специфична деградација протеина убиквитин-протеазом системом служи за елиминасање абнормалних протеина чија би акумулација у ћелији била штетна, и за регулацију ћелијског метаболизма деградацијом краткоживећих регулаторних протеина. На почетку се са доста пажње истраживао начин на који се протеини синтетишу, а тек касније се истраживања усмеравају и на проучавање процеса разградње протеина. Поред овог система деградације, постоји и лизозомални систем деградације протеина. Протеини се хидролизују неспеци-

фично у лизозому и потичу, углавном, из спољашње средине.

Ове године Нобелову награду за хемију добила су тројица научника, Арон Чикановер (**Aaron Ciechanover**) и Аврам Хершко (**Avram Hershko**) са Израелског института за технологију и њихов колега Американац Ирвин Роуз (**Irwin Rose**), са Калифорнијског универзитета, који су својим открићима дали велики допринос разумевању процеса унутарћелијске деградације протеина. Првенствено на основу њихових радова дошло се до закључка да је цитоплазматична разградња протеина високо специфичан и контролисан процес, неопходан при регулацији низа биохемијских процеса као што су имуни одговор, ћелијски циклус, транскрипција гена, контрола квалитета новосинтетисаних протеина, репарација ДНК итд.

Прва открића у области хидролизе протеина забележена су открићем улоге трипсина и лизозомалног система. Године 1953. утврђено је да, поред ова два система која не захтевају утрошак енергије, постоји и трећи енергетски зависан систем за деградацију протеина [1]. Чикановер, Хершко и Роуз су окарактерисали *АТФ* зависне компоненте цитоплазматичног система за деградацију протеина [2, 3, 4, 5]. Седамдесетих година отпочела су интензивна истраживања у овој области и утврђено је да протеини бивају разграђени после обележавања малим протеином убиквитином [4,6,7]. Убиквитин је изолован и окарактерисан 1975. године [8].

Убиквитин је мали протеин који се састоји од 76 аминокиселина, висококонзервиране секвенце¹. Синтезише се у форми прекурсора који се потом процесује помоћу деубиквитинационих протеина (*DUB*) како би се ослободила *Gly-Gly* *C*-терминална секвенца која је неопходна за иницијалну фазу активације убиквитина (Слика 1).

Протеазом кога граде 32 субјединице представља највећи ћелијски протеолитички комплекс и има доминантну улогу у разградњи краткоживећих регулаторних протеина код еукариота [9]. Препознавање супстрата од стране протеазома се остварује обележавањем убиквитином у процесу који се назива *убиквитинација*. Овај процес се састоји од три различита догађаја у којима учествују три ензима: Е1, Е2 и Е3 (Слика 2).

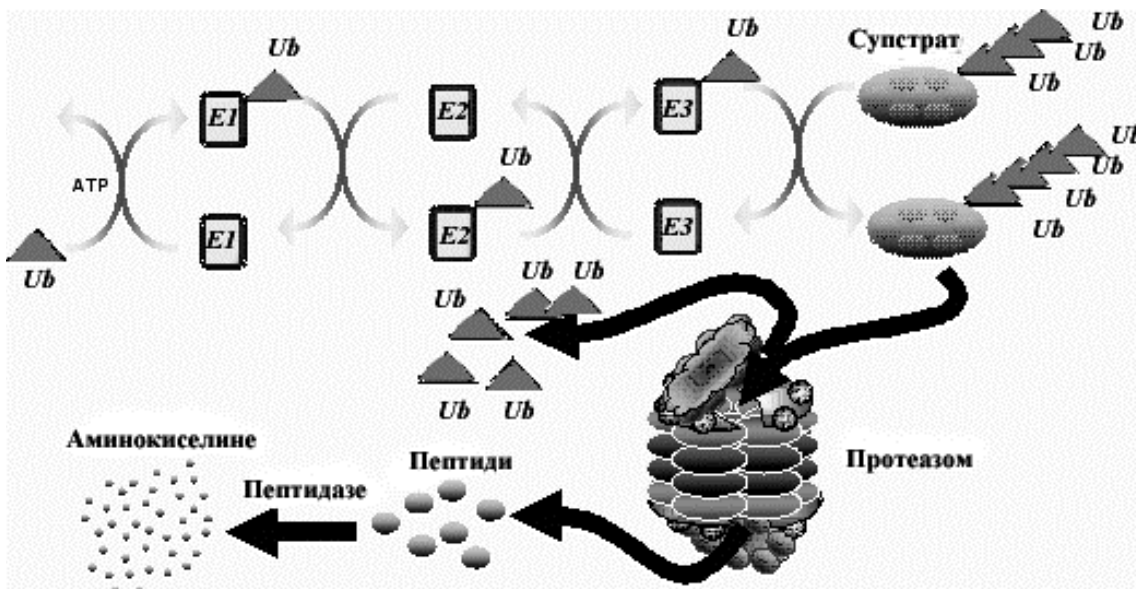


Слика 1. Шема тродимензионалне структуре полипептидног ланца убиквитина. Спиралом је представљен α -хеликс, а стрелицама β -плочице.

- Е1 : убиквитин-активирајући ензим (количина у ћелији-само један или неколико)
- Е2 : убиквитин-коњугујући ензим (више од 40)
- Е3 : убиквитин-протеин лигаза² (више од 500 структурно различитих)

МЕХАНИЗАМ УБИКВИТИНАЦИЈЕ ПРОТЕИНА:

Е1: формира високоенергетску тиоестарску везу између *C*-терминалне карбоксилне групе *Gly* убиквитина и *Cys* у активном месту Е1 [10,11,12].



Слика 2. Шема унутарћелијске деградације протеина посредоване убиквитином

Ензими Е1, Е2 и Е3 врше специфично везивање убиквитина (*Ub*) за протеин који треба деградирати (супстрат) уз утрошак енергије у форми *АТФ*-а. Настале полиубиквитином обележене протеине деградира протеазом до пептида које пептидазе разлажу до аминокиселина. Убиквитин се не деградира у протеазому.

1 Када протеини исте функције, а из различитих организама имају висок проценат сличности у аминокиселинској секвенци сматра се да им је секвенца висококонзервирана.
2 Лигазе су група ензима који катализују повезивање два супстрата ковалентном везом.



Слика 3. Шема механизма убиквитинације

Објашњење у тексту.

Е2: убиквитин се пребацује на $E2-Cys$ и формира се нова тиоестарска веза – трансестерификација [13].

Е3: формира изопептидну везу између C -терминалне карбоксилне групе убиквитина и ϵ -амино групе Lys са циљног протеина (Слика 3) [14].

Протеини могу бити обележени убиквитинским ланцима различите дужине, али се у сваком ланцу Lys^{48} претходног убиквитина везује за C -терминалну карбоксилну групу наредног формирајући изопептидну везу. Протеин-полиубиквитин комплекс препознају $19S$ регулаторне субјединице протеазома; ове субјединице одстрањују убиквитин и транспортују протеин у протеолитичко језгро протеазома. Убиквитин се не разграђује у протеазому.

Моноубиквитинирани протеини учествују као регулатори у процесима интернализације рецептора, сортирања везикула, репарације ДНК итд. [15]

Полиубиквитински ланци који су формирани везивањем преко Lys^{63} учествују у активацији протеин киназа, ДНК репарацији, усмеравању везикула итд. [15]

Убиквитин везујући домени нађени су код великог броја различитих протеина: оних који су растворни у цитоплазми (солубилних), или интегрисаних у неке ћелијске структуре, код различитих фактора транскрипције¹, код тумор супресора и циклина² итд. Све ово указује на то да пут деградације убиквитин-протеазом регулише широк спектар ћелијских процеса.

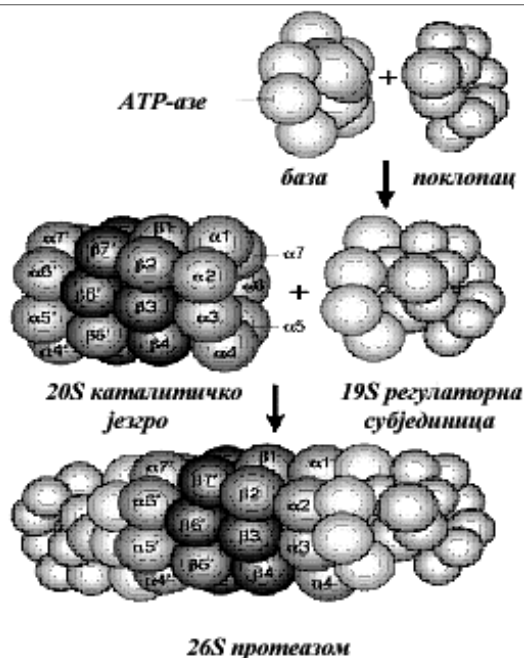
Супстрат	Функција
p53	Тумор супресор
Митотички циклини	Регулација ћелијског циклуса
НФ	Транскрипциони фактор
c-Jun	Транскрипциони фактор
МАТ 2	Транскрипциони фактор (квасац)
IgE, Т ћелијски рецептори	Имуни одговор
Г протеини	Трансдукција сигнала
Mos	Ser/Thr протеин киназа ооцита
Ste6	Експорт феромона (квасац)

1 Фактори транскрипције су протеини који одређују који ће се протеини синтетисати у датом тренутку у ћелији.

2 Тумор супресори и циклини су протеини који учествују у регулацији ћелијског циклуса, односно дефинишу да ли ће и када ћелија кренути да се дели.

ПРОТЕАЗОМ

Еукариотски $26S$ протеазом представља централну протеазу у ATP -зависној деградацији убиквитинираних протеина. Цео комплекс има молекулску масу око $2,5 MDa$, а граде га два субкомплекса: $20S$ језгро и $19S$ регулаторна партикула. $19S$ субкомплекс препознаје супстрат-протеин, расплиће га и усмерава у $20S$ субкомплекс који врши разградњу тј. протеолизу (Слика 4) [9,15,16].



Слика 4. Структура протеазома

Објашњење у тексту.

$20S$ протеазом има молекулску масу $700 kDa$, дијаметар цилиндра је $11 nm$, а висина $15 nm$. Састоји се од 4 седмочлана прстена од којих су два спољашња изграђена од α -субјединица, а два унутрашња од β -субјединица који облажу централну шупљину дијаметра $\sim 5 nm$ и садрже протеолитички активна места.

Активно место садржи N -терминални Thr који се налази на β -субјединицама, и то само на три: $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$, што значи да на једном протеазому постоји 6 активних места. Активни Thr се излажу у шупљину тек након аутокаталитичког одстрањивања њихових пропептида. Неактивне β -субјединице: $\beta 3$, $\beta 6$, и $\beta 7$ служе за прихватање и позиционирање супстрата.

Три активне субјединице имају различиту специфичност за супстрат: хомотрипсину-сличну (*chymotrypsin-like*), трипсину-сличну (*trypsin-like*) и пептидил-сличну (*peptidyl-like*). Хомотрипсин, трипсин и *N*-пептидаза су ензими панкреаса који врше хидролизу протеина хране у танком цреву. Показано је и да хомотрипсину-сличне и пептидил-сличне субјединице међусобно регулишу своју активност. Приликом формирања протеозома показано је да се каталитичке β -субјединице прво налазе у форми пропептида који се након удруживања аутокаталитички уклањају и остају каталитички активне субјединице са слободним *Thr* који су деблокирани. Пропептидна форма штити *N*-терминалне каталитички активне *Thr* од *N*-ацетиловања које би довело до инхибиције активних субјединица (Слика 4).

19S регулаторни субкомплекс препознаје и везује супстрат, врши деубиквитинацију, развијање протеина и транслокацију у језгро протеозома. Регулаторни субкомплекс се састоји, код еукариота, од базе и поклопаца. Поклопац се састоји од 8 не-*ATP*-азних субјединица. База се састоји од 6 субјединица, *ATP*-аза (*Rpt1-6*) и две велике не-*ATP*-азне субјединице (*Rpn1-2*). База није потребна у разградњи убиквитин-ом обележених протеина, али је неопходна у *ATP*-зависној разградњи неуубиквитинираних протеина, док је поклопац одговоран за интеракције са убиквитинима (Слика 5).



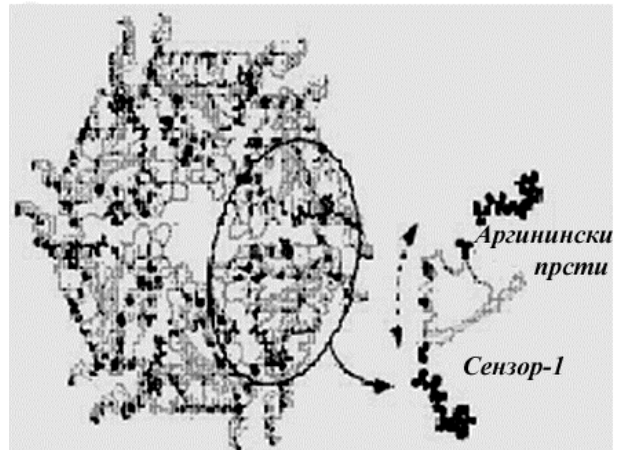
Слика 5. Електронска микрографија протеозома

Регулаторне компоненте *ATP*-зависних протеаза су организоване у форми прстена који формира пролаз до централне шупљине. За отварање каталитичке шупљине је неопходно присуство регулаторних партикула.

Везивањем супстрата за регулаторне субјединице долази до конформационих промена α -субјединица језгра које доводе до отварања централне шупљине. Продукти протеолизе протеозома су величине од 3 до 30 аминокиселина у зависности од организације активног места.

Протеолитички активне субјединице припадају различитим класама протеаза док су све *ATP*-азне субјединице из исте суперфамилије протеина: *AAA ATP*-азе (*ATPases Associated with a variety of cellular Activities*) [17].

Супстрат везује место има два региона одговорна за везивање супстрата: "сензор-1" на *C*-терминусу и "аргинински прст" на *N*-терминусу који се налазе на спољашњој ивици хексамерног прстена (Слика 6) [17].



Слика 6. Структура супстрат везујућег места базе 19S протеозома

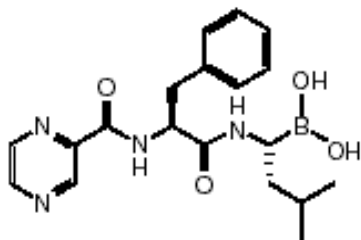
На основу приказане структуре и *ATP*-азне функције регулаторних партикула може се уочити њихова велика сличност са шаперонима. Шаперони су протеински комплекси који катализују процес увијања протеина у правилну терцијарну структуру. Енергија потребна за увијање протеина се добија хидролизом *ATP*-а. Шаперони се никада не асосују са каталитичким језгром протеозома, нити учествују у протеолизи. Као закључак следи да се холоензим понаша као протеаза, док се издвојена регулаторна партикула понаша као шаперон (*chaperon-like* активност) [17].

Усмерена елиминација убиквитинираних регулаторних протеина помоћу 26S протеозома има фундаменталну улогу у контроли многих процеса укључујући и активацију транскрипционих фактора, регулацију ћелијског циклуса и апоптозу.

Дефекти у систему за протеолизу су могући узрочници многих болести. У проучавању механизма на који убиквитин-протеазом систем утиче на развој канцера код људи, дошло се до закључка да нерегулисана разградња циклина или циклин-регулатора (који су одговорни за нормално одвијање ћелијског циклуса) [18,19], тумор супресора и онкогена може резултовати развојем канцера [20]. Овакви закључци су утицали да се почне са истраживањем инхибитора протеозома као потенцијалне анти-канцер терапије [21].

Показано је да инхибиција разградње наведених протеина води ћелију у апоптозу што је искоришћено у анти-тумор терапијама тј. уништавању туморских ћелија.

Један од инхибитора протеозома је пептидил-борна киселина PS-341 (Слика 7).



Слика 7. Структура инхибитора протеазома пептидил-борне киселине PS-341

Лактацистин, високоспецифични инхибитор еукариотског протеазома инхибира раст *Plasmodium falciparum* изазивача маларије, као и раст сисарских туморских ћелија, поготово лимфоцита.

Закључак

Убиквитином посредована деградација протеина је високо специфичан механизам за одржавање физиолошког стања ћелије. Укључена је у контролу квалитета протеина, као и у регулацију количине одређене врсте протеина у датом тренутку. Уколико нека ћелија изгуби контролу над количином и функционалношћу регулаторних протеина, она почиње неконтролисано да се дели и губи своју физиолошку функцију што може довести до патолошких стања на нивоу целог организма.

ABSTRACT

UBIQUITIN MEDIATED DEGRADATION OF INTRACELLULAR PROTEINS

Katarina Milovanović, Student of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, (katarina_milovanovic@yahoo.com) and **Natalija Polović**, Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, (polovicn@chem.bg.ac.yu)

Eukaryotic cells, from yeast to human, contain some 6000 to 30000 protein-encoding genes and at least as many proteins. While much attention and research had been devoted to how proteins are synthesized, the reverse process, i.e. how proteins are degraded, long received little attention.

The Nobel Prize in Chemistry for 2004 is shared between three scientists: Aaron Ciechanover, Avram Hershko and Irwin Rose who discovered ubiquitin-mediated proteolysis. Numerous cellular processes regulated by ubiquitin-mediated proteolysis include the immune response, cell cycle, DNA repair and transcription and protein quality control.

ЛИТЕРАТУРА

1. Simpson, M.V. The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices. *J. Biol.Chem.*, **201** (1953) 143-154
2. Ciechanover, A., Hod, Y., and Hershko, A. A heat-stable polypeptide component of an ATPdependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81** (1978) 1100-1105
3. Hershko, A., Ciechanover, A., and Rose, I.A. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: A component that interacts with ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76** (1979) 3107-3110

4. Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L. and Rose, I.A. 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*, **77** (1980) 1783-1786.
5. Ciechanover, A., Heller, H., Katz-Etzion, R., and Hershko, A. Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78** (1981) 761-765
6. Hershko, A., Ciechanover, A., and Rose, I.A. Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J. Biol. Chem.*, **256** (1981) 1525-1528.
7. Hershko, A., Eytan, E., Ciechanover, A., and Haas, A.L. Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. *J. Biol. Chem.*, **257** (1982) 13964-13970
8. Goldstein, G., Scheid, M.S., Hammerling, V., Boyse, E.A., Schlesinger, D.H., and Niall, H.D. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72** (1975) 11-15
9. Baumeister, W., Cejka, Z., Kania, M., and Seemuller, E. The proteasome – a macromolecular assembly designed to confine proteolysis to a nanocompartment. *Biol. Chem.*, **378** (1997) 121-130
10. Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., and Hershko, A. "Covalent affinity" purification of ubiquitin activating enzyme. *J. Biol. Chem.*, **257** (1982) 2537-2542
11. Haas, A.L., Rose, I.A., and Hershko, A. Purification of the ubiquitin activating enzyme required for ATP-dependent protein breakdown. *Fed. Proc.*, **40** (1981) 1691.
12. Haas, A.L., and Rose, I.A. The mechanism of ubiquitin activating enzyme. *J. Biol. Chem.*, **257** (1982) 10329-10337
13. Goebel, M.G., Yochem, J., Jentsch, S., McGrath, J.P., Varshavsky, A., and Byers, B. The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Science*, **241**(1988) 1331-1335
14. Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. Components of ubiquitin-protein ligase system. *J. Biol. Chem.*, **258** (1983) 8206-8214
15. Hochstrasser, M. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7** (1995) 215-223
16. Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.*, **68** (1999) 1015-1068
17. Schmidt, M, Lupas, A.N, Finley, D. Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3** (1999) 584-591
18. DeSalle, L.M., Pagano M. Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett.*, **490** (2001) 179-189
19. Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, **349** (1991) 132-138
20. Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.*, **420** (1997) 25-27
21. Adams J. Preclinical and clinical evaluation of proteasome inhibitor PS-341 for the treatment of cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6** (2000) 493-500