Degradace proteinů ubiquitin-proteazomovou dráhou

Degradation of Proteins by Ubiquitin-Proteasome Pathway

Matějčková J.¹, Kubiczková L.^{1,2}, Sedlaříková L.¹, Potáčová A.¹, Hájek R.^{1,2}, Ševčíková S.^{1,2}

¹ Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno

² Oddělení klinické hematologie, FN Brno

Souhrn

Všechny intracelulární a některé extracelulární proteiny jsou kontinuálně degradovány a nahražovány syntézou nových proteinů. Oba tyto děje musejí zůstat ve vzájemné rovnováze, neboť její narušení by mohlo vést ke vzniku závažných onemocnění. Buňky obsahují mnoho proteolytických systémů, které zajišťují vysoce specifickou a kontrolovanou degradaci proteinů. Jedním z nich je proteazom, složitý molekulární stroj sloužící k degradaci proteinů konjugovaných s ubiquitinem. Od první izolace proteazomu v roce 1968 bylo objeveno mnoho detailů o fungování tohoto systému. V roce 2004 byla za tyto objevy dokonce udělena Nobelova cena za chemii. V naší přehledové práci jsme se zaměřili na shrnutí dosavadních poznatků o mechanismech vysoce selektivní degradace proteinů ubiquitin-proteazomovou dráhou. Jednotlivé kapitoly tohoto článku pojednávají o struktuře a funkci systému ubiquitin-proteazom, mechanismech regulace degradace proteinů a biologických účincích inhibitorů proteazomu.

Klíčová slova

proteazom – ubiquitin – NF-kappa B – proteazomové inhibitory – degradace proteinů

Summary

All intracellular and some extracellular proteins are continually degraded and replaced by synthesis of new proteins. Both these processes need to stay in equilibrium since their balance may lead to emergence of diseases. Cells contain many proteolytic systems that ensure highly specific and controlled degradation of proteins. One of these systems is the proteasome, a very complex molecular engine allowing degradation of proteins conjugated to ubiquitin. Since the first isolation of proteasome in 1968, many details about its function have been uncovered. In 2004, Nobel Prize for chemistry was awarded for these discoveries. In our review article, we aimed to summarize information about the mechanism of highly selective degradation of proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. Individual parts of the paper summarize current knowledge about highly selective degradation of proteins by the ubiquitin-proteasome system, mechanisms of protein degradation regulation and biological effects of proteasome inhibitors.

Key words

proteasome – ubiquitin – NF-kappa B – proteasome inhibitors – protein degradation

Tato práce byla podpořena výzkumnými projekty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM0021622434, Grantové agentury ČR GAP304/10/1395 a Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví NT12130, NT11154, NT13190 a NT14575.

This study was supported by scientific programs of the Ministry of Education, Youth and Sports MSM0021622434, Grant Agency CR GAP304/10/1395 and Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health NT12130, NT11154, NT13190 and NT14575.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.
Babákova myelomová skupina
Ústav patologické fyziologie
LF MU, Brno
Kamenice 5, A3
625 00 Brno
e-mail: sevcik@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 16. 1. 2013

Přijato/Accepted: 31. 3. 2013

Úvod

Všechny intracelulární a některé extracelulární proteiny jsou kontinuálně degradovány a nahrazovány syntézou nových proteinů. Jednotlivé proteiny v jádře a cytosolu, ale i v endoplazmatickém retikulu a mitochondriích jsou degradovány různě rychle – od několika minut pro některé regulační proteiny až do dnů a týdnů pro proteiny, jako jsou aktin a myosin [1,2]. Buňky obsahují mnoho proteolytických systémů, které provádějí degradaci tak, aby byla vysoce specifická a kontrolovaná. Ve zdravé buňce musí existovat rovnováha mezi degradací a syntézou proteinů. Poruchy v těchto systémech mohou vést ke hromadění nefunkčních nebo poškozených proteinů, což ve svém důsledku vede ke vzniku mnoha onemocnění. Většina intracelulárních proteinů je degradována ubiquitin-proteazomovou dráhou [3]. A právě tímto systémem se práce zabývá.

Systém ubiquitin-proteazom

Proteazom je složitý molekulární stroj sloužící k degradaci proteinů konjugovaných s ubiquitinem. Skládá se ze základny a na ni navázaných regulačních jednotek, které dále upravují proteazomovou aktivitu a specifitu [4]. Proteazom byl objeven a poprvé izolován roku 1968 a pro svůj tvar dutého válce byl původně nazván cylindrin [5]. Vyskytuje se ve velkém množství v cytosolu a v jádře s odlišnou distribucí u různých typů buněk a v různých fázích buněčného cyklu [6]. Zaujímá 0,5 % až 1 % všech buněčných proteinů [7]. Vysoce proliferující a transformované buněčné linie vykazují vyšší hladiny proteazomu a jeho aktivity než klidové a netransformované buňky [8].

Z evolučního hlediska se jedná o vysoce konzervativní strukturu. Existují dva základní evoluční typy proteazomových jednotek. Ancestrální forma popsána u archeí obsahuje stejné uspořádání podjednotek jako ta savčí, ale sestává pouze z jednoho typu α podjednotek a jednoho typu β podjednotek [4].

V roce 2004 byla udělena Nobelova cena za objev ubiquitinem zprostředkované degradace proteinů. V historickém kontextu se jednalo o zcela „nezajíma-

vou“ oblast výzkumu. Po odhalení trojrozměrné struktury DNA se zájem soustředil spíše na syntézu proteinů než na jejich degradaci. Ačkoliv se již na konci 60. let vědělo, že proteiny jsou odbourávány vysoce selektivním nonlysozomálním způsobem, kovalentní vazba ubiquitinu na proteinové substráty byla rozpoznána až na přelomu let 80. Hlavním předpokladem pro objev byla skutečnost, že k dosažení selektivity byla zapotřebí energie v podobě ATP [9].

V rámci zachování homeostázy buněčného metabolismu využívá buňka dvou hlavních cest recyklace proteinů. Každou cestu doprovází specifické proteázy. Kromě selektivní ATP-dependentní degradace zprostředkované ubiquitin-proteazomovým systémem (UPS) jsou proteiny odbourávány prostřednictvím membránového kompartmentu lysozomu. Lysozomální degradace probíhá mechanismem autofagie za účasti hydrolytických enzymů katepsinů v prostředí s nízkým pH. Jejím substrátem jsou extracelulární proteiny s dlouhým biologickým poločasem či struktury větších rozměrů, jakými jsou buněčné organely [10]. Substrátem pro proteazomovou degradaci jsou oproti tomu intracelulární proteiny s krátkou životností, což jsou i špatně sbalené, poškozené či dále nepotřebné proteiny [11].

UPS je svou činností zapojen do regulace buněčného cyklu, kontroly nově syntetizovaných proteinů, regulace transkripčních faktorů, genové exprese, imunitní odpovědi i patologických procesů, jakými jsou nádorová a neurodegenerativní onemocnění, zánětlivé procesy, a v neposlední řadě hraje roli v procesu stárnutí [12].

Struktura proteazomu

Má-li protein podstoupit degradaci, je ve většině případů označen vazbou několika ubiquitinových molekul. Polyubikvitinovaný protein je následně transportován k multikatalytickému enzymovému komplexu – proteazomu, kde dochází k vlastnímu štěpení na krátké peptidové sekvence.

Běžným proteazomovým systémem savčích buněk je 26S proteazom o molekulové hmotnosti 2,5 MDa a s 31 typy

Obr. 1. Struktura proteazomu. Čtyři prstence po 7 podjednotkách v pořadí $\alpha\beta\beta\alpha$.

podjednotek [13]. Skládá se z hlavní části 20S proteazomu, dutého útvaru tvaru válce poskytujícího uzavřený prostor pro vlastní proteolýzu a na něj navázaných jedné či dvou 19S regulačních jednotek (PA700), které obsahují několik aktivních a ubiquitin-vazebných míst [14].

20S proteazom se skládá ze čtyř homologních prstencových struktur. Každý prsteneček je tvořen buď sedmi podjednotkami α , nebo sedmi podjednotkami β . Prstence jsou uspořádány v pořadí $\alpha\beta\beta\alpha$ nad sebou (obr. 1) [15].

Vnější α prstence regulují přístup substrátu do vnitřního proteolytického centra. Jestliže α podjednotky rozpoznají substrát, dojde ke konformační změně, při které dochází k odstranění blokády vstupní brány N-konci aminokyselinových zbytků podjednotek α -2, α -3 a α -4 [16]. Vnitřní β prstence jsou zodpovědné za proteolytickou degradaci substrátu. Konkrétně proteolytickou aktivitu vykazují podjednotky β 1, β 2 a β 5. Tyto podjednotky se nacházejí v proteolytickém centru, ve středu dutiny proteazomu. Každá z nich obsahuje aktivní místo na svém N-konci, ve kterém se nachází zbytek aminokyseliny threoninu (Thr1). Podjednotka β 1 vykazuje proteolytickou aktivitu podobnou kaspázám, které štěpí polypeptidový řetězec v místě za kyselou aminokyselinou v sekvenci. Podjednotka β 2 vykazuje aktivitu podobnou trypsinu, který štěpí po přítomnosti bazických aminokyselin, a pod-

jednotka $\beta 5$ má aktivitu podobnou chymotrypsinu, který štěpí po hydrofobních aminokyselinách [17]. Oligopeptidovým produktem proteazomové degradace je minimálně 2 a maximálně 35 aminokyselin dlouhý řetězec s průměrnou délkou 8 až 12 aminokyselin [18].

Pro stabilizaci trojrozměrné struktury aktivního místa jsou důležité serinové zbytky v lokusech Ser129/166/169 a pro funkčnost proteolýzy zbytky aminokyselin Asp17 a Lys33, které obklopují Thr1. Z hlediska proteolýzy nejsou všechny aktivní β podjednotky stejně důležité, ale platí hierarchie v pořadí $\beta_5 > \beta_2 > \beta_1$ [17].

Aby se předešlo nekontrolované degradaci buněčného materiálu, existuje v UPS několik na sobě nezávislých regulačních mechanismů. Jedním z vysoce efektivních je přítomnost regulačních molekul. 19S regulátor je proteazomovým aktivátorem o molekulové hmotnosti 700 kDa (PA700) [19]. Je složen z 19 samostatných proteinů, přičemž 10 proteinů tvoří základnu, která se váže k α prstencům 20S proteazomu, a 9 proteinů vytváří strukturu podobnou víku, kam se váže polyubikvitinový řetězec. PA700 umožňuje přístup vyšší koncentrace označeného substrátu do proteolytického prostoru [20].

Podjednotky Rpn10 a Rpn13 19S regulátoru slouží jako ubikvitinové receptory. Rpt2, Rpt3 a Rpt5 podjednotky jsou zapojeny do otevírání přístupu k 20S proteazomu. Podjednotka Rpn11 obsahuje Zn^{2+} -dependentní proteolytické centrum, které odbourává polyubikvitinový řetězec a uvolňuje jej do svého okolí [20].

Mechanizmus degradace ubiquitinem

Ubikvitin (Ub) je malý protein složený ze 76 aminokyselin s celkovou molekulovou hmotností 8,5 kDa. Ubikvitinem označený protein je degradován v proteazomu a jeho aminokyseliny jsou využity k seskládání nových proteinů [9].

Proces ubikvitinace sestává ze tří kroků a vyžaduje přítomnost tří různých tříd enzymů (E1 až E3). Počátečním krokem je dvoustupňová ATP-dependentní aktivace ubikvitinu enzymem E1. Nejdříve je vytvořen adenylovaný meziprodukt,

Obr. 2. Mechanismus ubikvitinace cílového proteinu (CP) enzymy E1 (ubikvitin-aktivní enzym), E2 (ubikvitin-konjugující enzym) a E3 (ubikvitin-ligáza).

který je atakován cysteinovým zbytkem aktivního centra E1 enzymu, na který se ubiquitin naváže thioesterovou vazbou. Ubikvitin-aktivující enzym E1 následně ubiquitin přenáší k ubiquitin-konjugujícímu enzymu E2, na jehož cysteinový zbytek se ubiquitin naváže svým C-koncovým glycinem 76 transthioesterifikační reakcí. Posledním krokem je navázání ubiquitinu na substrát pomocí enzymu ubiquitin-ligázy E3. Vzniká izopeptidová vazba mezi lyzinem cíleného proteinu a C-koncovým glycinem ubiquitinu [...-CO-NH ϵ -...]. Substrátová ubiquitinace může probíhat dvěma různými způsoby. Za první způsob nese zodpovědnost RING doména E3 enzymů a dochází k přímému přenosu ubiquitinu na substrát. V druhém případě dochází k vytvoření E3-ubikvitin intermediátu, jehož vznik je katalyzován HECT doménou E3 enzymů (obr. 2) [21].

Předpokládá se, že existuje několik málo E1 enzymů, několik desítek E2 enzymů a zhruba 600 různých E3 enzymů zakódovaných v lidském genomu [22]. Substrátová specifita je dána právě velkým počtem ubikvitinových ligáz (E3),

přičemž každá z nich je specifická pro limitní počet substrátových proteinů [23].

Abyste mohli být substráty pro degradaci rozpoznány proteazomem, musejí být v řetězci navázány alespoň čtyři molekuly ubikvitinu [24]. Způsob vazby ubikvitinů není jednotný a určuje, zda daný protein bude opravdu degradován, nebo dojde k alternativním buněčným procesům, jakými mohou být aktivace enzymů, transkripce genů či transport membránových proteinů [25]. V ubikvitinové sekvenci aminokyselin se nachází sedm lyzinových zbytků, mezi kterými může docházet k vazbě [26]. Nejčastější spojení ubikvitinů se uskutečňuje přes lyzin 48 (K48 řetězce) a vede k destrukci označeného proteinu [27]. Nekanonické spojení řetězců vedoucí ke stejnému cíli bylo *in vitro* prokázáno také mezi lyziny 63 [28]. Katalýzy polyubikvitinace se kromě E4 enzymů účastní i poslední rodina E3 U-box proteiny [29].

Polyubikvitinovaný protein je rozpoznávan ubikvitinovými receptory proteazomu jako substrát proteolýzy. Rpt2 podjednotka 19S regulátoru regu-

Tab. 1. Substráty proteazomu důležité pro nádorové buňky.

Proteiny s krátkým biologickým poločasem rozpadu	Substrát	Funkce v organismu	Ubikvitin ligáza
regulátory BC	cyklin A	řízení průchodu jednotlivými fázemi BC	
	cyklin B		APC/Cdc20; C6orf157
	cyklin D		
	cyklin E		SCF/FWB7
	Cdc25A/B/C	regulace Cdk	SCF/β-TrCP
	p27Kip1	inhibice Cdk	SCF/Skp2
	p21Cip1		DTL
inhibitory apoptózy	XIAP	inhibice efektorových kaspáz	
	cIAP		
transkripční faktory	I-κB/NFκB	transkripce genů ovlivňujících metastázování, angiogenezi a buněčné adheze	SCF/β-TrCP
	β-katenin	řízení kontrolních bodů BC	SIAH1; SCF/β-TrCP
	HIF1	přizpůsobení nádorových buněk hypoxii	VHL
	ATF2	transkripce genů pro proteinkinázy	
	STATs	regulace onkogenních drah	
onkogeny	c-fos, c-myc, c-jun	regulace onkogenní aktivity	SCF/FWB7; MEKK1
tumor supresory	p53	regulace exprese genů pro růst buněk, apoptózu, opravu DNA a angiogenezi	MDM2; E6-AP; HUFE; RFWD2; TOPORS; RFFL; HECW1
tumor-specifické antigeny	survivin	interakce s prostředím	
	Muc-1		
enzymy	DNA topoizomeráza	změna terciární struktury DNA	

luje vstup substrátu i uvolňování produktu do/ze základny proteazomu. Ubikvitinové molekuly jsou uvolněny do cytozolu deubikvitinázou Rpn11 ve formě polyubikvitinového řetězce [30]. Zde jsou řetězce degradovány na jednotlivé molekuly dalšími deubikvitinázami (DUBs) [31].

Regulační mechanismus UPS v sobě zahrnuje přítomnost antagonisticky působících, ubikvitinu podobných proteinů (UBLs), mezi které patří SUMO modifikující protein p53 a substrát specifických DUBs, mezi které patří CYLD odstraňující ubikvitin ze signálních molekul NFκB dráhy a USP9X regulující ubikvitinaci Mcl-1 [32–34].

Vlastní degradaci proteinu předcházejí procesy jako rozbalení do primární struktury a přemístění do proteolytického centra, které jsou zprostředkované proteázami podobnými chaperonům

za spotřeby energie získané hydrolýzou ATP. Tyto ATPázy (podjednotky Rpt 1–6) jsou součástí 19S regulační partikule [35]. Štěpení proteinu probíhá tak dlouho, dokud nejsou vytvořeny všechny oligopeptidové produkty schopné difundovat ven z proteazomu.

V buňkách hematopoetické řady je hlavním typem proteazomu jeho inducibilní izoforma – imunoproteazom, jehož výskyt koreluje s hladinou cytokinů. Je charakterizován nahrazením proteolyticky aktivních podjednotek β1, β2 a β5 jejich ekvivalenty β1i (LMP2), β2i (MELC1) a β5i (LMP7). Zároveň je 20S základna spojena s odlišnou regulační jednotkou – 11S regulátorem. Imunoproteazom štěpí proteiny na 8–10 aminokyselin dlouhé oligopeptidy, které jsou optimální pro prezentaci hlavním histokompatibilním komplexem I na povrchu buňky [36].

Karcinogenní substráty proteazomové degradace a jejich funkce

Roli proteazomu a jeho inhibitorů v procesu karcinogeneze lze nejlépe demonstrovat identifikací reprezentativních substrátů proteolýzy. Substráty související s karcinogenezi lze obecně rozdělit na strukturně nefunkční proteiny a proteiny s krátkým biologickým poločasem.

Ačkoliv primární sekvence aminokyselin každého nově syntetizovaného proteinu obsahuje veškerou informaci potřebnou pro zformování jeho terciární struktury, je ve skutečnosti 30 % proteinů sbaleno chybně, bez možnosti správného znovusbalení [37]. Aby buňka předešla akumulaci nefunkčních proteinů uvězněných v nízkoenergetickém stavu a jejich aminokyseliny mohly být dále recyklovány, využívá systém chaperonů, který tyto struktury rozpoznává,

a systém transmembránových proteinů, který je dále transportuje z endoplazmatického retikula, kde probíhá jejich sbalování, do cytozolu, kde se nachází proteazom. Tento proces se nazývá degradace asociovaná s endoplazmatickým retikulem (ERAD) [38]. Také cytozolové proteiny s narušenou strukturou nebo náchylné k agregaci jsou vychytávány k proteazomové degradaci pomocí dvou vysoce konzervovaných kompartmentů JUNQ a IPOD [39]. Kromě *a principio* špatně sbalených proteinů vstupuje do proteazomové degradace převážná většina proteinů s dlouhým biologickým poločasem poškozených reaktivními radikály kyslíku, intracelulární denaturací či jinak strukturně modifikovanými a neschopnými plnit svou funkci. Hlavním substrátem UPS však zůstávají proteiny s krátkým biologickým poločasem. Zpravidla na svém N-konci obsahují hydrofobní zbytky aminokyselin. Mezi takové substráty řízené proteolýzy patří regulační molekuly buněčného cyklu, transkripční faktory, onkogenní produkty, nádorové supresory, apoptotické faktory a antigeny (tab. 1) [40].

Mezi nejvýznamnější molekuly regulované proteazomem patří členové signální dráhy NFκB (obr. 3). Jaderný faktor NFκB je souhrnný název pro skupinu rychle působících primárních transkripčních faktorů patřících do rodiny Rel (reticuloendotheliosis), které ovlivňují transkripci genů pro růstové faktory, cytokiny, chemokiny, modulatory angiogeneze, adhezivní molekuly a antiapoptotické faktory [41]. Poprvé byl NFκB popsán roku 1986 jako B-lymfocytární jaderný faktor potřebný pro transkripci κ lehkých řetězců Ig [42]. Od té doby mu byly připsány desítky dalších funkcí v rámci většiny typů buněk lidského organismu.

NFκB existuje v cytoplasmě v podobě inaktivních dimerických komplexů navázaných na inhibitor κB (IκB). Tento inhibitor maskuje jaderný lokalizační signál, a tím brání translokaci NFκB do jádra [43]. Aktivaci dimeru předchází fosforylace inhibitoru specifickou IκB kinázou (IKK), která se nachází v cytoplasmě a vykazuje serin-proteinkinázovou aktivitu. IKK se skládá ze tří podjednotek – heterodimeru IKKα/IKKβ s katalytickou aktivitou a regulační podjednotky IKKγ (NEMO) [44].

Obr. 3. Role proteazomu v kanonické a nekanonické cestě aktivace transkripčního faktoru NFκB.

Inaktivní komplex NFκB-IκB je stimulován celou řadou podnětů, jakými jsou prozánětlivé cytokiny TNFα a IL-1, mitogeny, růstové faktory, stresory, lipopolysacharidy či volné radikály. Různé stimuly mohou vyvolat aktivaci NFκB dvěma odlišnými způsoby.

Klasickou signální cestou je IκBα fosforylován na serinu 32 a 36 podjednotkou βIKK. Fosforylovaný IκBα je rozpoznán ubiquitin-ligázovým komplexem SCF/β-TrCP, polyubikvitinován a degradován proteazomem [45]. Odstraněním inhibitoru je NFκB schopen přenosu do jádra a následné indukce exprese více než 50 různých genů, mimo jiné pro IL-6, IL-1, IL-2, TNFα, COX-2, ICAM-1, VCAM-1, XIAP, cIAP a dalších molekul významných pro onkogenezi [41]. Nejznámějším zástupcem aktivovaným kanonickou dráhou je heterodimer proteinů p50/p65, známý jako specifický NFκB.

Nekanonická alternativní dráha je založena na odlišném inhibitoru, kterým je prekurzorový protein p100. Aktivace je zahájena fosforylací NFκB-inducibilní kinázy (NIK) podjednotkou α IKK homodimeru. Aktivovaná NIK dále fosforyluje protein p100 (100 kDa) na C-konci, což vede k jeho zkrácení proteolytickým štěpením v proteazomu na p52 (52 kDa). Výsledkem

je transkripčně aktivní dimer p52/RelB [46,47]. Deregulace NFκB nastává při závažných, autoimunitních, virových a především nádorových onemocněních [48].

Biologické účinky inhibitorů proteazomu

Vzhledem k důležitosti proteazomu v mnoha aspektech buněčného metabolismu jsou účinky jeho inhibitorů na živé buňky komplexními procesy založenými na akumulaci, inhibici, inaktivaci, snížení anebo zvýšení hladiny jednotlivých proteinů, které spolu vzájemně interagují v rámci signálních drah.

Primárním důsledkem inhibice proteazomu je úplný pokles odbourávání proteinů, čímž nastává jejich hromadění. Velká množství proteinů konjugovaných s ubiquitinem 40 se akumulují v podobě agresomů v perinukleární oblasti buňky, kde jsou lokalizovány nefunkční proteazomy. Formování agresomů vyžaduje histonovou deacetylázu 6 (HDAC6) k vytvoření pevného spojení mezi mikrotubuly a ubiquitinovanými proteiny. Formace proteinů v agresomy nakonec vyvolá autofagické odbavení v podobě lyzozomální degradace [49]. Nahromadění nesbalených proteinů také vyvolává zvýšení hladiny chaperonů a stresových proteinů

ER, které buňce zprostředkují ochranu před toxickými podmínkami [50].

I přes prvotní obrannou linii dochází po dlouhodobém vystavení působení inhibitoru k programované smrti téměř všech typů buněk. Existuje několik možných vysvětlení závislosti selektivity na stupni proliferace buňky. V prvé řadě jsou vysoce proliferující nádorové buňky odlišné od ostatních buněk organismu tím, že mají narušené kontrolní body, a tedy jsou mnohem více závislé na proteazomem mediované degradaci pozitivních i negativních regulátorů buněčného cyklu. Za druhé, je pravděpodobné, že dysregulace buněčného cyklu tyto buňky činí citlivější k proapoptickým faktorům. A konečně, je možné, že transkripční faktory, které regulují progresi buněčného cyklu, jsou také svým dílem zodpovědné za inhibitor vyvolanou buněčnou smrt [51].

Inhibitory proteazomu se v současnosti používají i v klinické praxi. V léčbě mnohočetného myelomu, krevního nádorového onemocnění, došlo k výraznému pokroku v přežívání pacientů právě díky používání těchto inhibitorů [52].

Závěr

Regulované odbourávání proteinů u eukaryot pomocí 26S proteazomu má zásadní význam pro degradaci regulátorů buněčného cyklu, transkripčních faktorů, onkogenních produktů a nádorových supresorů, což je nezbytně nutné pro řádnou kontrolu a řízení buněčných procesů. Zároveň slouží k odbourání poškozených bílkovin z cytozolu a endoplazmatického retikula. Protože aktivita proteazomu v nádorových buňkách je obecně zvýšena, je také klíčovým cílem pro vývoj protinádorových léčiv. Některá jsou již užívána v klinické praxi při léčbě mnohočetného myelomu.

Literatura

1. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(7): 1807–1819.
2. Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med* 1996; 335(25): 1897–1905.
3. Rock KL, Gramm C, Rothstein L et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994; 78(5): 761–771.
4. Löwe J, Stock D, Jap B et al. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 1995; 268(5210): 533–539.
5. Harris JR. The isolation and purification of a macromolecular protein component from the human erythrocyte ghost. *Biochim Biophys Acta* 1969; 188(1): 31–42.
6. Wójcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(5): 579–589.
7. Peters JM. Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci* 1994; 19(9): 377–382.
8. Kumatori A, Tanaka K, Inamura N et al. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(18): 7071–7075.
9. Herskko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell-division cycle (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2005; 44(37): 5932–5943.
10. Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(1): 3–13.
11. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 1998; 8(10): 397–403.
12. Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med* 2009; 30(4): 191–296.
13. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 1015–1068.
14. Bedford L, Paine S, Sheppard PW et al. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol* 2010; 20(7): 391–401.
15. Unno M, Mizushima T, Morimoto Y et al. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 2002; 10(5): 609–618.
16. Groll M, Bajorek M, Köhler A et al. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 2000; 7(11): 1062–1067.
17. Jäger S, Groll M, Huber R et al. Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol* 1999; 291(4): 997–1013.
18. Luciani F, Keşmir C, Mishto M et al. A mathematical model of protein degradation by the proteasome. *BioPhys J* 2005; 88(4): 2422–2432.
19. DeMartino GN, Moormaw CR, Zagnitko OP et al. PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J Biol Chem* 1994; 269(33): 20878–20884.
20. Sharon M, Tavernier T, Ambroggio XI et al. Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol* 2006; 4(8): e267.
21. Hochstrasser M. Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly. *Cell* 2006; 124(1): 27–34.
22. Li W, Bengtson MH, Ulbrich A et al. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* 2008; 3(1): e1487.
23. Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 3): 531–537.
24. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M et al. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 2000; 19(1): 94–102.
25. Pickart CM, Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 2004; 8(6): 610–616.
26. Peng J, Schwartz D, Elias JE et al. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 2003; 21(8): 921–926.
27. Petroski MD, Deshaies RJ. Mechanism of lysine 48-linked ubiquitin-chain synthesis by the cullin-RING ubiquitin-ligase complex SCF-Cdc34. *Cell* 2005; 123(6): 1107–1120.
28. Saeki Y, Kudo T, Sone T et al. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J* 2009; 28(4): 359–371.
29. Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M et al. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* 2001; 276(35): 33111–33120.
30. Verma R, Aravind L, Oania R et al. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 2002; 298(5593): 611–615.
31. Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 363–397.
32. Rodriguez M, Desterro J, Lain S et al. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* 1999; 18(22): 6455–6461.
33. Sowa ME, Bennett EJ, Gygi SP et al. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell* 2009; 138(2): 389–403.
34. Schwickart M, Juany X, Lill JR et al. Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 2010; 463(7277): 103–107.
35. Striebel F, Kress W, Weber-Ban E. Controlled destruction: AAA+ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes. *Curr Opin Struct Biol* 2009; 19(2): 209–217.
36. Klotzel PM. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695(1–3): 225–233.
37. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002; 110(10): 1389–1398.
38. Brodsky JL. The protective and destructive roles played by molecular chaperones during ERAD (endoplasmic-reticulum-associated degradation). *Biochem J* 2007; 404(3): 353–363.
39. Bagola K, Sommer T. Protein quality control: on IPODs and other JUNQ. *Curr Biol* 2008; 18(21): R1019–R1021.
40. Kropff M, Bisping G, Wenning D et al. Proteasome inhibition in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006; 42(11): 1623–1639.
41. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18(49): 6853–6866.
42. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a post-translational mechanism. *Cell* 1986; 47(6): 921–928.
43. Régnier CH, Song HY, Gao X et al. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 1997; 90(2): 373–383.
44. Makris C, Roberts JL, Karin M. The carboxyl-terminal region of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is required for full IKK activation. *Mol Cell Biol* 2002; 22(18): 6573–6581.
45. Kanarek N, Ben-Neriah Y. Regulation of NF-kB by ubiquitination and degradation of the IKBs. *Immunol Rev* 2012; 246(1): 77–94.
46. Dejardin E. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(9): 1161–1179.
47. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007; 12(2): 115–130.
48. Luqman S, Pezzuto JM. NFkB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res* 2010; 24(7): 949–963.
49. Hideshima T, Bradner JE, Wong J et al. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(24): 8567–8572.
50. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002; 110(10): 1389–1398.
51. McConkey DJ, Zhu K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat* 2008; 11(4–5): 164–179.
52. Kubiczková L, Matějčková J, Sedlářková L et al. Inhibitory proteazomu v léčbě mnohočetného myelomu. *Klin Onkol* 2013; 26(1): 11–18.