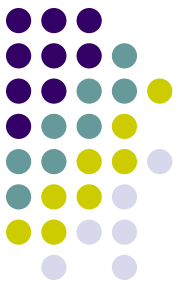


DEGRADACE PROTEINŮ V EUKARYOTICKÝCH BUŇKÁCH

Lucie Kozáková



PROTEOLÝZA = systém kontroly kvality proteinů



Typ abnormality	Příčina
Nedosyntetizovaný protein	mutace, inkorporace puromycinu, předčasná terminace, proteolytické štěpení
Nesmyslný protein	mutace, inkorporace AMK analogů, chyba v syntéze proteinu
Volné podjednotky vícepodjednotkového komplexu	nadměrná syntéza podjednotek
Postsyntetické poškození	kyslíkové radikály, intracelulární denaturace
Genové inženýrství	genová fúze, posun čtecího rámce, nesprávná lokalizace
Špatně sbalené proteiny	

Intracelulární podmínky, které poškozují buněčné proteiny:

- Teplota 37°C a vyšší (denaturační podmínky)
- Enzymy modifikující proteiny (proteázy, kinázy)
- Vysoká koncentrace solí (podporuje disociaci multimerů)
- Mnoho mastných kyselin (fungují jako detergenty)
- Nesbalené proteiny – vznikající polypeptidy, poškozené a mutantní polypeptidy a nerozpustné inkluze mohou agregovat

Proteiny se buňkách degradují různou rychlostí:

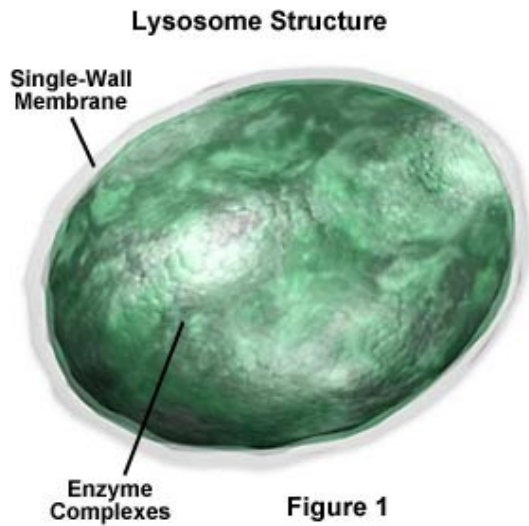
- minuty - regulační enzymy
- dny-týdny – aktin, myozin v kosterních svalech
- měsíce – hemoglobin v červených krvinkách

2 typy degradace

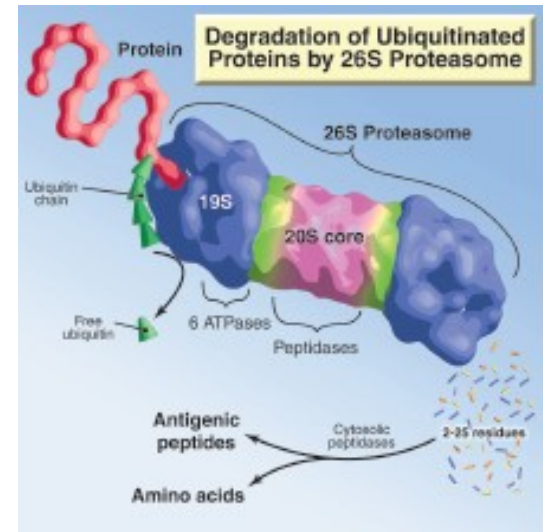


Lysozomální
(proteázy v acidické organele)

Cytozolická
(v proteazomech)



<http://faculty.muhs.edu/klestinski/cellcity/lysosomedata.htm>

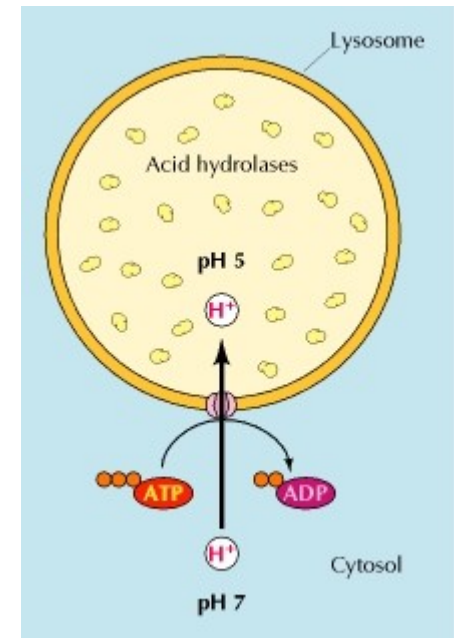


J Am Soc Nephrol 17: 1807-1819 (2006)

Lysozomální degradace

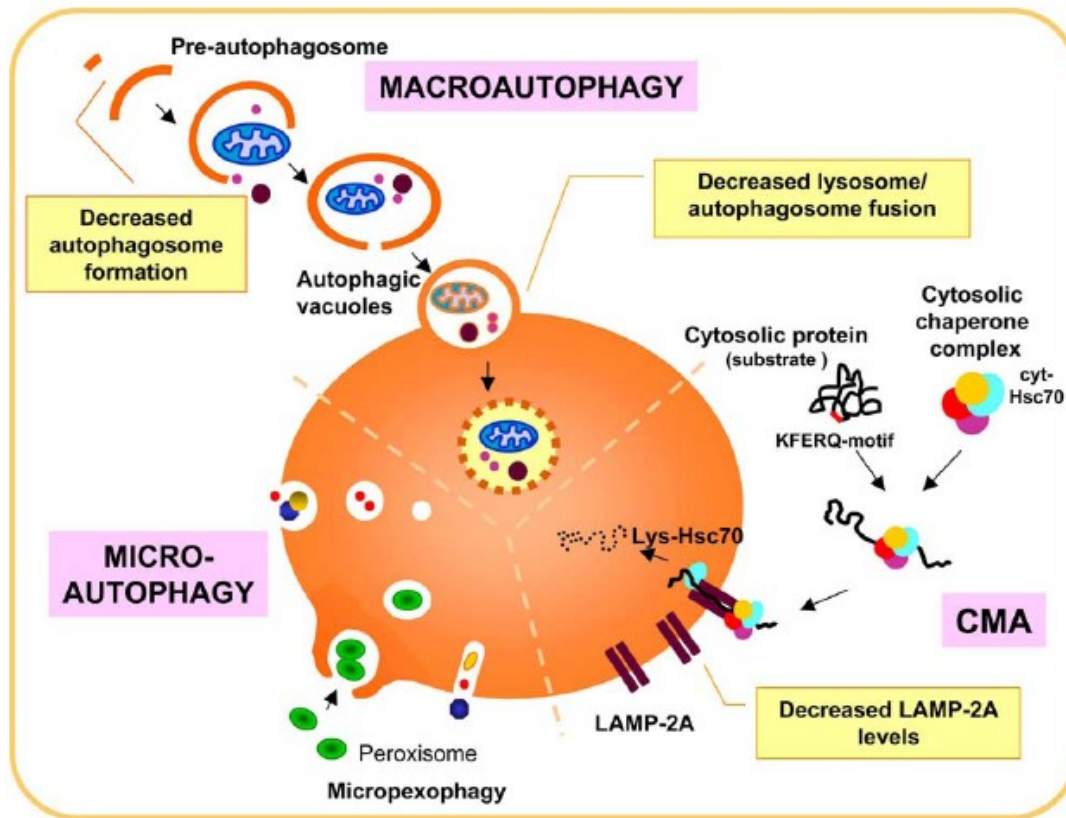


- objev 1949 – belgický cytolog Christian de Duve
- velikost 0,1-1,2 μm
- buněčný trávicí systém – enzymy pro všechny typy biologických makromolekul (proteiny, NK, uhlovodíky, lipidy)
- vzniká fúzí transportních váčků vzniklých z GA s pozdním endozomem, který se tvoří endocytózou z plazmatické membrány
- vakuolární struktura obsahující hydrolytické enzymy, které optimálně fungují v kyselém pH (cca 40 typů hydrolytických enzymů – nukleázy, fosfatázy, glykozylázy, lipázy, proteázy....)
- kyselé pH udržují protonové pumpy
- enzymy jsou syntetizovány jako prekurzory v ER a odtud přeneseny do GA



The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. (2000)

Degradace intracelulárních komponent se označuje rovněž termínem **autofagie**

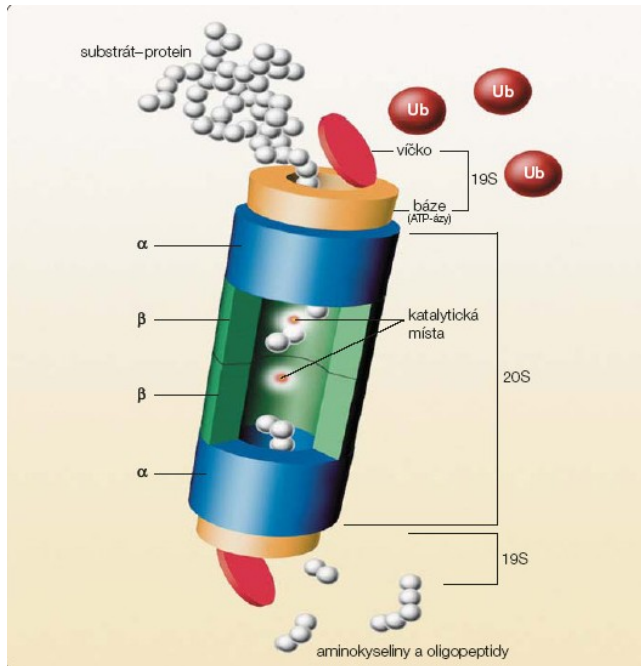


- aktivují se za stresových podmínek (zj. hladovění)
- MATG se aktivuje v ranných stádiích hladovění (4-6h v játrech), CMA se aktivuje po >6h (je selektivní, čímž se zabrání rozkladu esenciálních buněčných komponent při delším hladovění)
- může produkovat antigenní peptidy prezentované na MHC II molekulách, rozpoznávané CD4⁺ lymfocyty (aktivace produkce protilátek)

CYTOZOLICKÁ DEGRADACE V PROTEAZOMECH



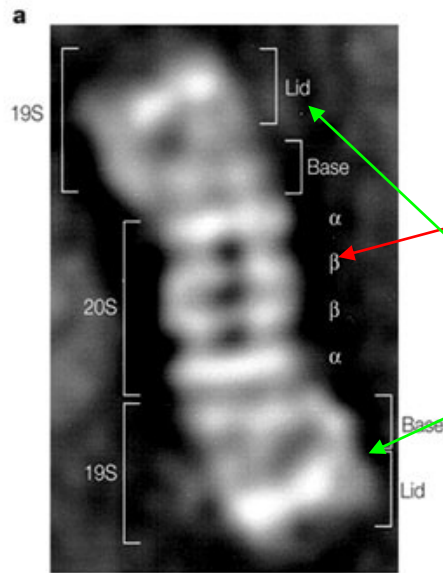
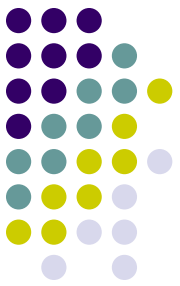
26S proteazom



- velký multienzymatický komplex (není to organela) na degradaci proteinů
- cíleně degraduje proteiny označené polyubiquitinací (4 a více)

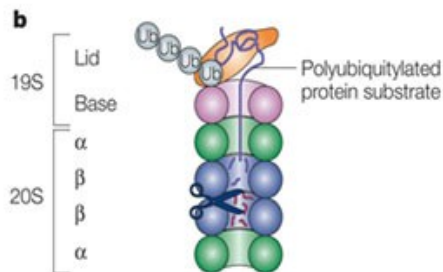
2004 Nobelova cena za chemii – objev ubiquitin-proteazomální degradace proteinů
Avram Hershko, Aaron Ciechanover, Irwin Rose

Struktura 26S proteazomu



Skládá se ze 2 subkomplexů:

- 20S centrální část (core particle) – vykazuje katalytickou aktivitu
- 19S regulační část (regulatory particle)



Struktura 26S proteazomu



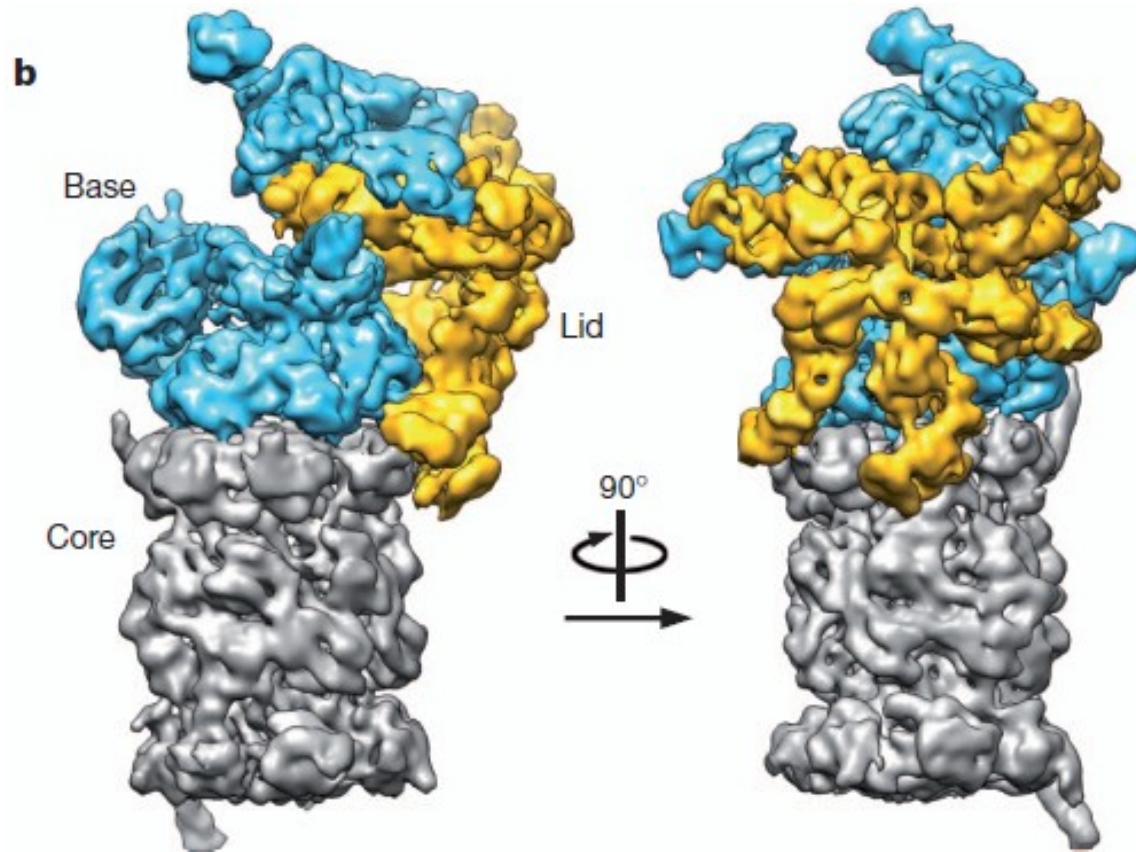
- **20S centrální část**

- tvar soudku → složen ze 4 spojených kruhů → 2 identické vnější α kruhy a 2 vnitřní β kruhy
- každý kruh je složen ze 7 různých podjednotek → obecně lze složení zapsat jako:
 $\alpha_{1-7}\beta_{1-7} \beta_{1-7} \alpha_{1-7}$
- proteolyticky aktivní místo na β podjednotkách
- α podjednotky obklopují vstup pro substrát a výstup pro produkt

- **19S regulační část**

- složena nejméně z 18 různých podjednotek, které tvoří subkomplex báze (base) a víčka (lid)
- víčko obsahuje podjednotky, které váží ubiquitinované řetězce a 2 deubiquitinační enzymy (izopeptidázy) odstraňující ubiquitiny (recyklace)
- báze obsahuje 6 ATPáz přiléhajících k vnějšímu kruhu 20S
- ATPázy vážou proteiny, které mají být degradovány a za hydrolýzy ATP je rozbalují a translokují do 20S

Architektura proteazomu

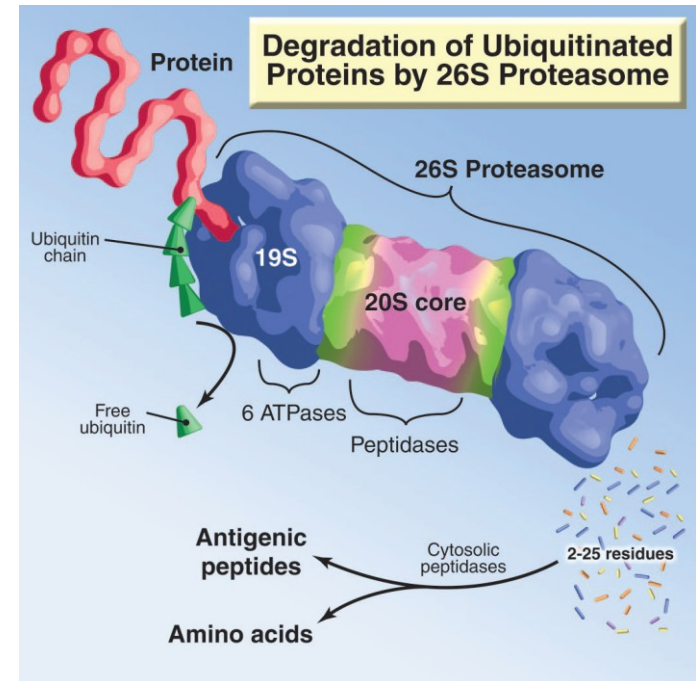


Lander et al, Nature, 2012

Průběh degradace



1. substrát určený k degradaci se naváže na 19S, kde se odštěpí polyubi řetězec a rozpadne se (ubiquitin se recykluje)
2. ATPázy linearizují sbalený protein (esenciální pro vstup do 20S, globulární proteiny jsou příliš velké) a zároveň regulují otvírání vstupního kanálku do 20S
3. po vstupu substrátu do centrální části, je polypeptid štěpen 6 proteolytickými místy (2 štěpí preferenčně za hydrofobními aa, 2 za bazickými aa, 2 za kyselými aa) na krátké peptidy
4. peptidy jsou uvolněny z proteazomu a jsou degradovány cytozolickými endopeptidázami a aminopeptidázami na jednotlivé aa a využity pro syntézu nových proteinů či metabolismus

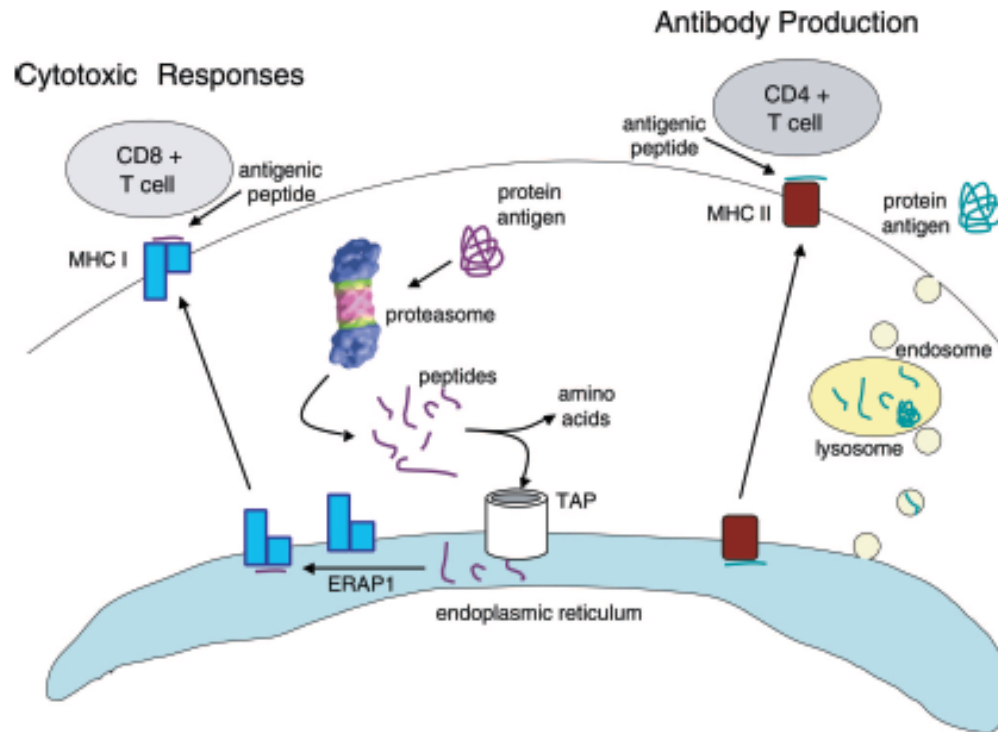


J Am Soc Nephrol 17: 1807-1819 (2006)

Imunoproteazom



- exprimuje se v odpovědi na γ -INF
- hybridní 26S částice: **PA28-20S-19S**
- štěpí odlišně od 26S → tvoří větší frakci peptidů schopných sloužit jako antigenní prekurzory (8-9 zbytků)
- delší peptidy jsou transportovány do ER pomocí TAP (transporter associated with antigen processing), kde se nachází aminopeptidáza ERAP1 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 1) → odštěpuje přebytečné aa z peptidových prekurzorů a zastaví se na 8-9 zbytcích (přesná délka pro vazbu na MHC I molekuly, rozpoznávané cytotoxickými CD8⁺ lymfocyty)



J Am Soc Nephrol 17: 1807-1819 (2006)

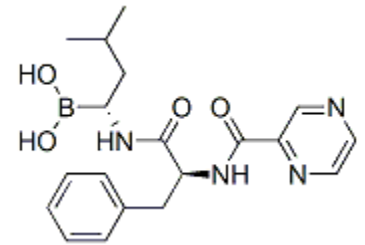
TAP – transporter associated with antigen processing
ERAP1 – endoplasmic reticulum aminopeptidase 1

Inhibitory proteazomu



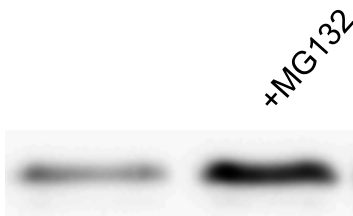
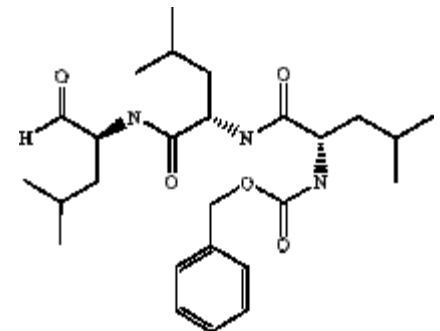
- **BORTEZOMIB**

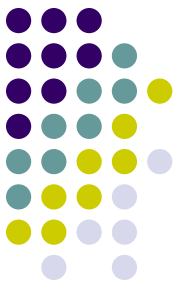
- první lék cílený proti proteazomu schválený pro aplikaci u lidí (mnohočetný myelom)
- atom boru se specificky, s vysokou afinitou váže do katalytického místa 26S proteazomu



- **MG132**

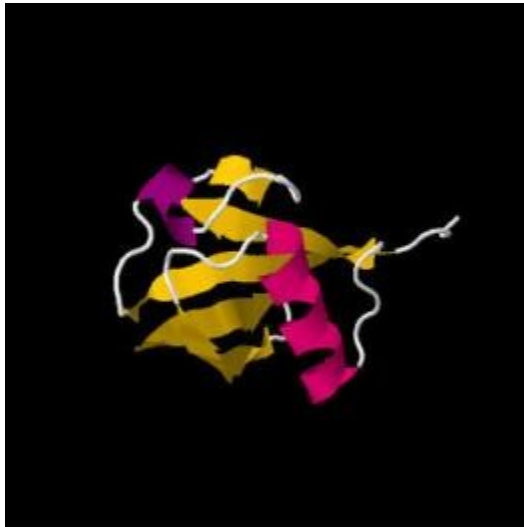
- silný, membránově propustný
- inhibuje specificky proteasomální peptidázy ChT-L (chymotrypsin-like peptidase)
- po delším působení se aktivuje JNK-1 kináza, která iniciuje apoptózu jako odpověď na buněčný stres



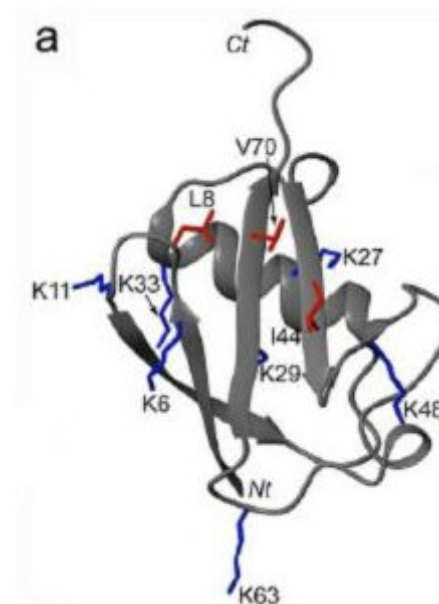


Ubiquitin

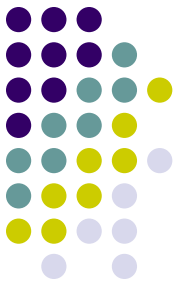
- = APF1 – ATP dependentní proteolytický faktor
- 76 aa velký protein
- kovalentně se pojí k cílovému substrátu
- připojuje se k substrátu přes C-terminální glycin k –NH₂ skupině vnitřního lysinu substrátu
- obsahuje 7 lyz zbytků



<http://www.rcsb.org/pdb/>

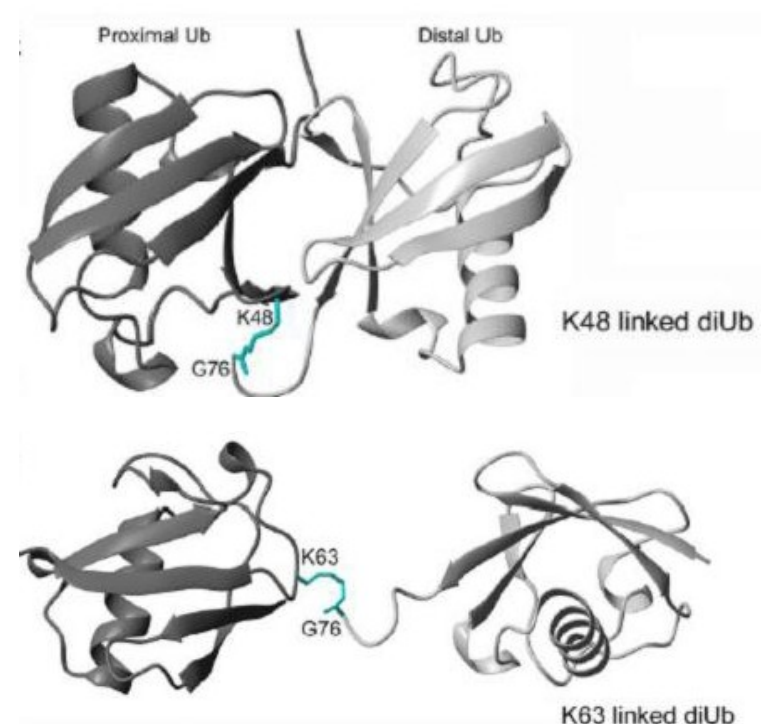
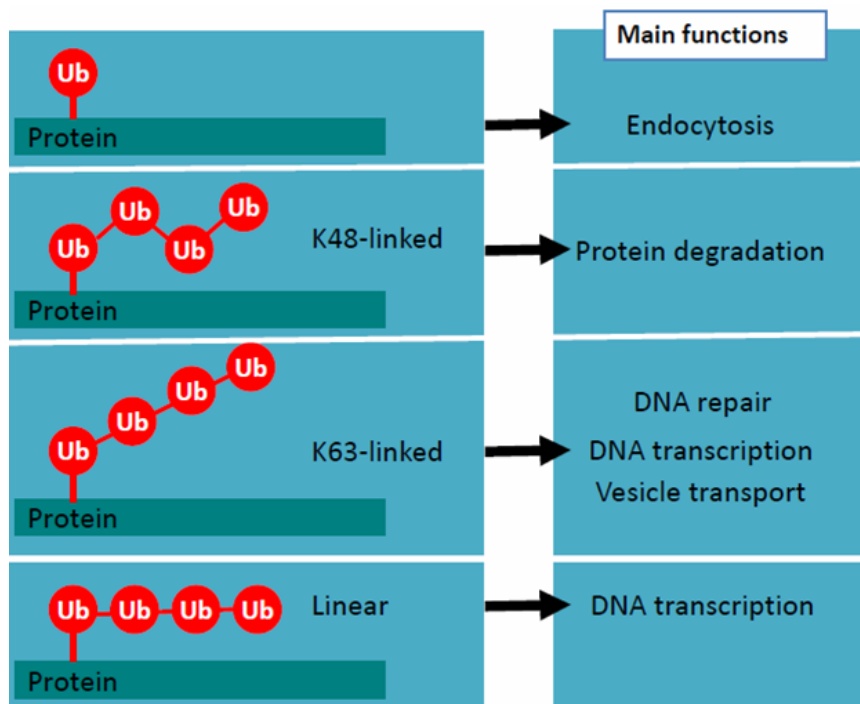


Lange et al., Science, 2008

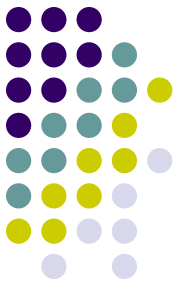


Ubiquitin

- molekula ubiquitinu připojená k substrátu může sloužit jako bod pro připojení dalších molekul ubiquitinu přes tvorbu isopeptidových vazeb mezi C-koncem ubiquitinu s lyzinem další ubiquitinové molekuly

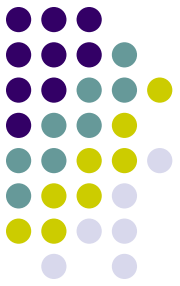


Monoubiquitinace



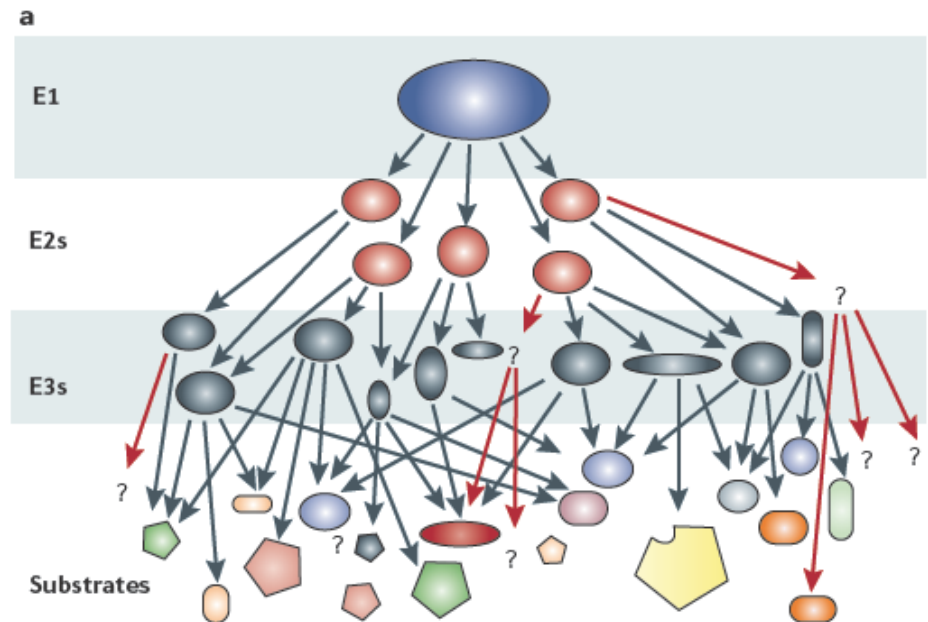
Zapojena nejméně ve 3 odlišných buněčných funkcích:

1. **Regulace histonů** – mutanti kvasinek, kteří nemají ubiquitinační místa na H2B, nesporulují → monoubi na H2B je potřebná pro meiózu
2. **Endocytóza** – mnoho proteinů plazmatické membrány je monoubiquitinací downregulovaných do endocytické dráhy → degradace v lysozomech
3. **Pučení retrovirů z plazmatické membrány** – gag polyprotein běžný u retrovirů, je esenciální pro štěpení membránově vázaných částic během pučení. Uvnitř gag je krátká sekvence – L doména důležitá pro pučení a uvolnění částic. Tato sekvence je bohatá na prolin a může vystupovat jako interakční motif pro E3 ligázu Nedd4. Gag protein je monoubiquitinovaný, což je závislé na L doméně.



Polyubiquitinace

- molekulární polibek smrti ☺ (vedoucí k degradaci proteinů)
- geny ubiquitin proteazomálního systému tvoří přibližně 5% genomu
- dráha vedoucí k ubiquitinaci substrátu je vícezkroková a zahrnuje enzymy:
 - E1...aktivační enzym
 - E2...konjugační enzym
 - E3...specifická ubiquitin ligáza
 - deubiquitinační enzymy
- Je závislá na ATP!



Polyubiquitinace

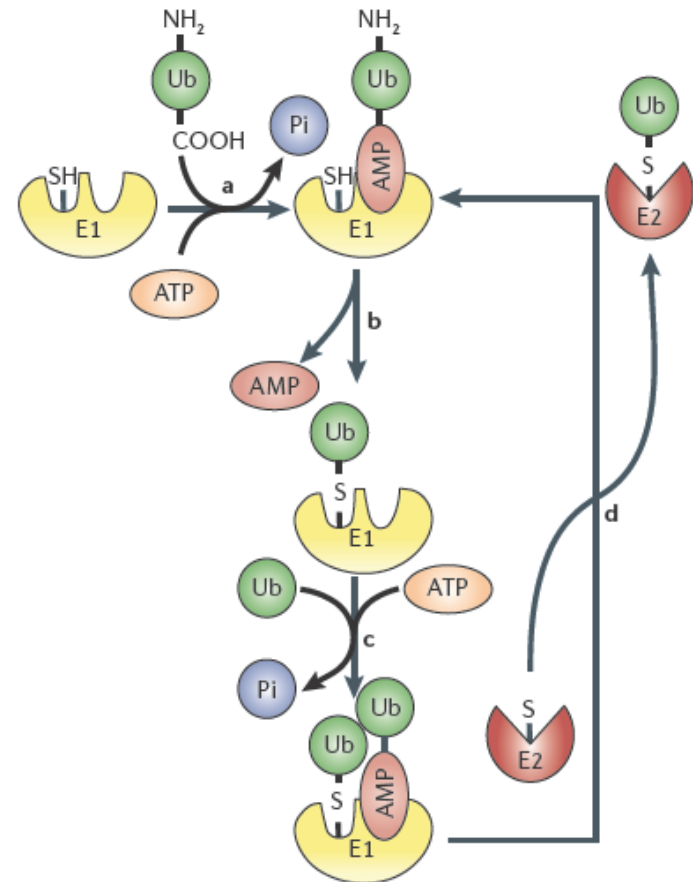


Aktivace ubiquitinu

1. tento krok vyžaduje vazbu ATP do ATP-vazebného místa na E1
2. adenylace C-konce volného ubiquitinu enzymem E1
3. rychlý *cis* transfer ubiquitinu vázaného na E1 z AMP do aktivního místa cysteinu na E1 s následným uvolněním AMP
4. adenylace další molekuly ubiquitinu stejným E1

Vazba E2 konjugačního enzymu

přenos aktivovaného ubiquitinu z aktivního cysteinu E1 na katalytický cystein E2



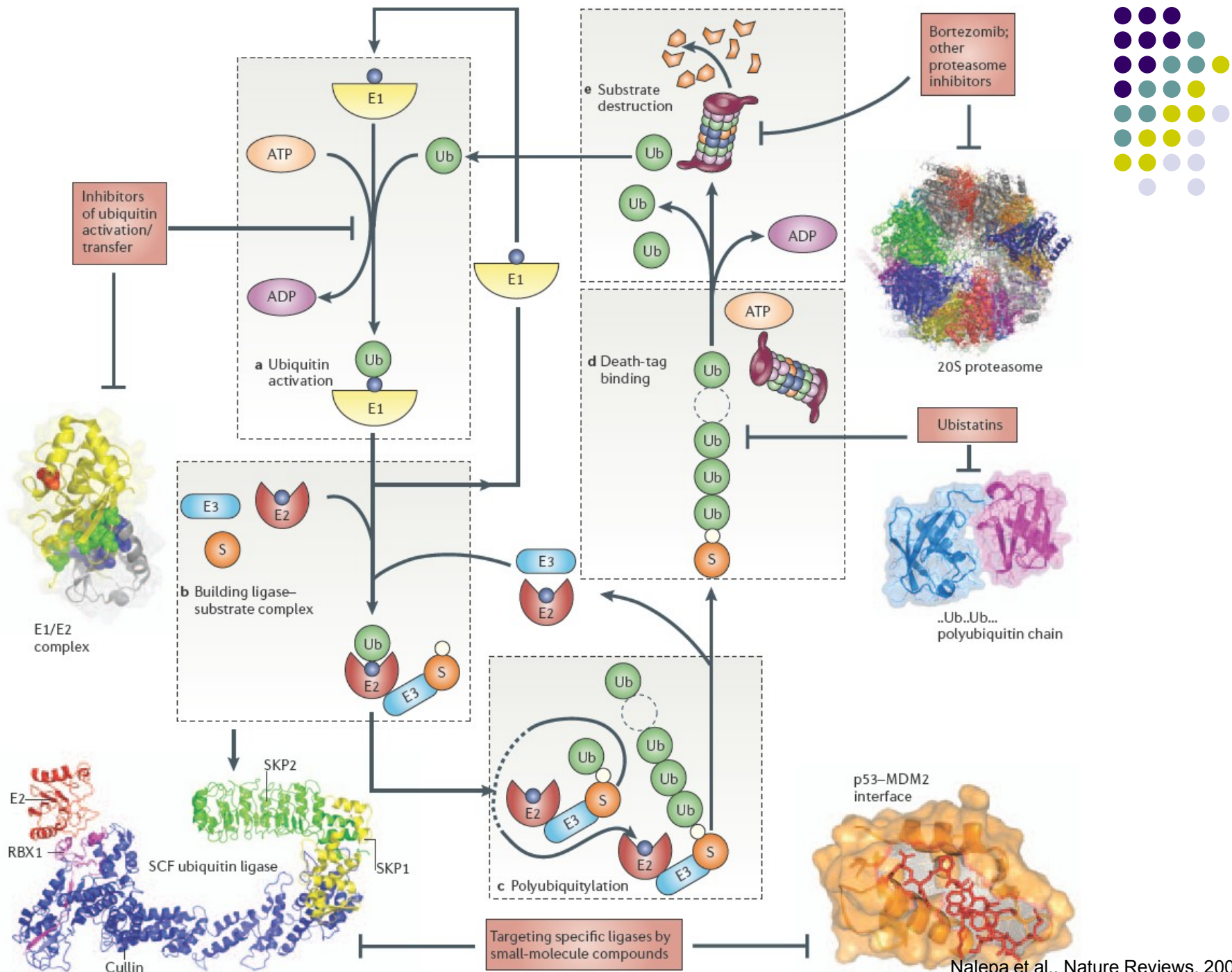


Polyubiquitinace

Polyubiquitinace

E3 (ubiquitin ligáza) rozpozná substrát a zároveň komplex E2-Cys-Ub → dochází k přenosu ubiquitinu na Lys substrátu a polyubiquitinaci → substrát se z E3 uvolní, je rozpoznán proteazomem a následně degradován

<http://www.youtube.com/watch?v=jo8gx61BR-Y>



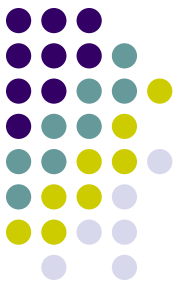


Typy E3 ubiquitin ligáz

- Specificky určují, který substrát bude ubiquitinovaný

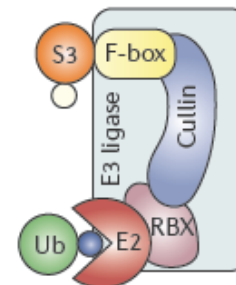
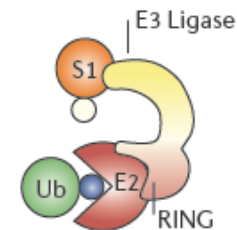
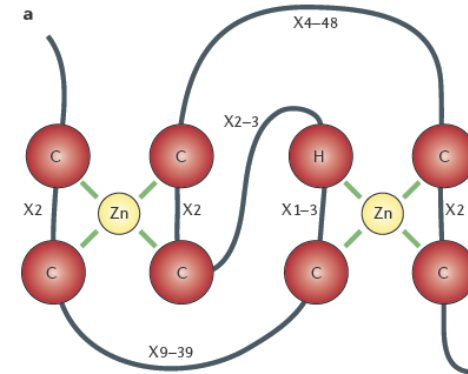
3 hlavní třídy:

- RING (Really interesting new gene)-finger E3
- HECT (homologous to E6-AP COOH terminus)-domains E3
- U-box E3



RING-finger E3 ligázy

- obsahují 7 cysteinů a 1 histidin nebo 6 cysteinů a 2 histidiny, které drží dva atomy zinku v charakteristické konformaci (do kříže)
- **2 velké podtřídy:**
 - jednoduché RING-finger E3 – na stejném polypeptidu obsahují RING finger doménu i doménu pro vazbu substrátu
 - cullin-base RING-finger E3 – využívají RING box protein 1 (RBX1) a RBX2 v komplexu s různými cullin-dependentními substrátovými proteiny



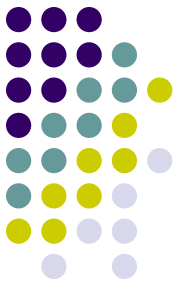
RING-finger E3 ligázy



- **MDM2**

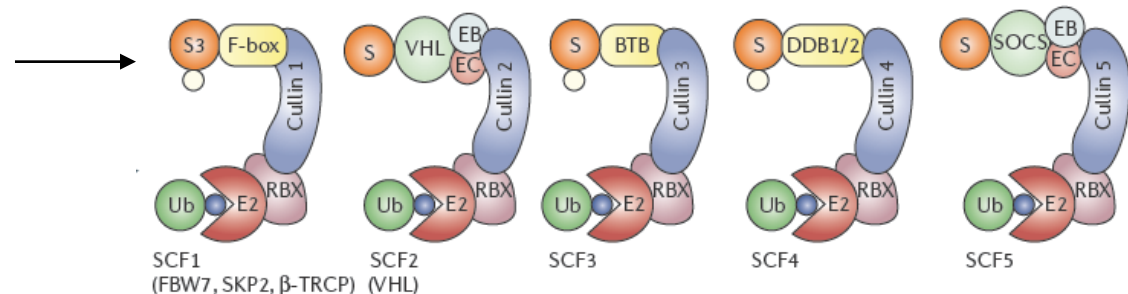
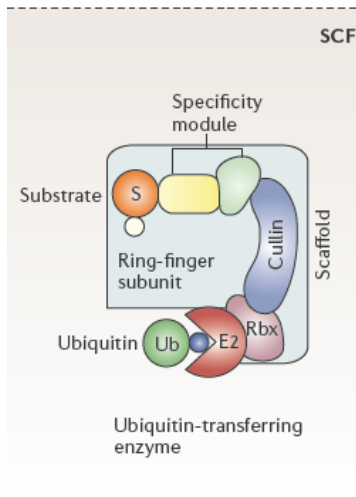
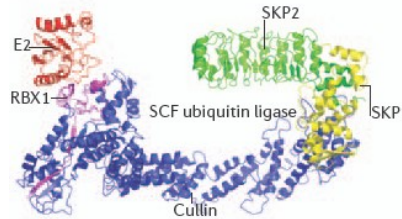
- hlavní ubiquitin ligáza p53 („ochránce genomu,, - zabraňuje mutagenezi a následně karcinogenezi zástavou buněčného cyklu nebo apoptózou, asi 50% všech lidských nádorů obsahuje mutaci v genu *p53*)
- onkogenní RING-finger protein, jehož exprese je transkripčně indukována proteinem p53 → negativní smyčka (MDM2 degraduje p53)
- MDM2 ovlivňuje p53 nejméně 3 mechanismy:
 - fyzicky blokuje N-terminální transaktivační doménu p53
 - podporuje transport p53 z jádra, což ho udržuje daleko od jeho cílových genů
 - ubiquitin – dependentní degradací
- může působit jako ubiquitin ligáza i pro jiné antionkogenní proteiny
- vyskytuje se jako homodimer MDM2/MDM2 nebo jako heterodimer MDM2/MDMX

RING-finger E3 ligázy

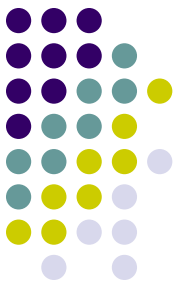


- **SCF ubiquitin ligázy**

- = SKP1-Cullin-F-box
- multipodjednotkový komplex, který využívá specifický faktor (F-box) k rozpoznání substrátu (obvykle fosforylovaný)
- komplex obsahuje:
 - Cullin (CUL) – slouží jako kostra při uspořádávání ubiquitinové mašinerie a substrátu
 - RBX – RING finger protein, interaguje s C-koncem CUL1, interaguje s E2 konjugačním enzymem
 - Substrátově specifický modul – rozpoznává a váže substrát
- lidský genom obsahuje přibližně 68 F-box proteinů a každý cílí substrát pro degradaci

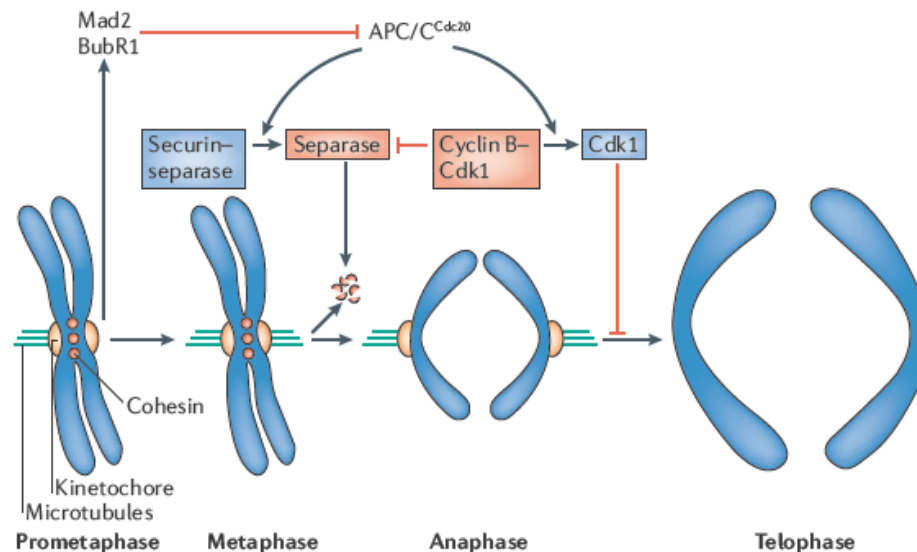


RING-finger E3 ligázy



• APC/cyklozom (Anaphase promoting complex)

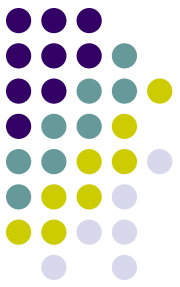
- 1,5MDa komplex (nejméně 13 podjednotek – obsahuje i cullin a RING podjednotku, vzdálený příbuzný SCF ligáz)
- s APC/C přechodně asociují E2 enzymy UBCH5 nebo UBCH10
- aktivita závisí rovněž na koaktivátorech (obsahují typické sekvence: C-box, IR tail – zprostředkují vazbu k APC/C, WD40 doména – rozpoznává substrát pro APC/C) – např. CDC20 (cell division cycle homologue 20), který je aktivní od prometáfyze do telofáze
- v metafázi APC/C^{CDC20} iniciuje ubiquitinaci securinu (malý protein, funguje jako co-chaperon a jako inhibitor separázy) → aktivovaná separáza štěpí Scc1 podjednotku kohezinu (drží sesterské chromatidy pohromadě), což umožňuje rozchod sesterských chromatid



U-box E3 ligázy

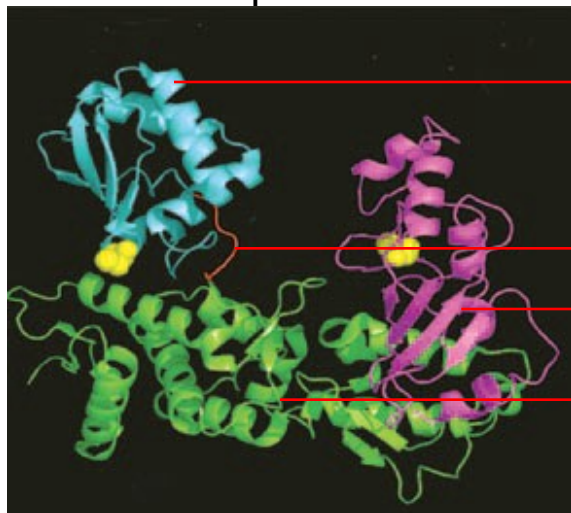


- U-box motif je strukturně podobný RING-finger doméně a váže E2 enzymy
- U-box neváže ionty kovu, prostorovou konformaci určují intramolekulární vodíkové vazby
- CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) – důležitý pro odstraňování abnormálních proteinů jako je špatně sbalený CFTR u cystické fibrózy a tau proteiny (polyglutamin repeat proteiny), které se vyskytují u některých neurodegenerativních chorob
- málo prozkoumané



HECT E3 ligázy

- HECT doména (homologous to E6-AP COOH terminus) byla poprvé objevena u ubiquitin ligázy p53, E6-AP, která asociuje s E6 HPV (human papillomavirus) onkoproteinem a cílí p53 pro degradaci v buňkách exprimujících HPV-E6, ale ne v neinfikovaných (dalším substrátem pro degradaci je např. proto-onkogen c-myc)
- mutace kolem aktivního místa E6-AP – Angelmanův syndrom (Happy puppet, Angel child) – mentální retardace, tuhá, nemototrná chůze, absence řeči, nadměrný smích, záchvaty
- role v HPV indukované rakovině děložního čípku – HPV16 a HPV18 jsou vysoce onkogenní díky degradaci p53 a přispívají maligní transformaci epitelálních buněk děložního čípku



→ N-terminální katalytická doména
(obsahuje aktivní místo cysteinu-žlutě)

→ ohybová doména

→ Ubc7

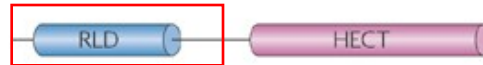
→ Ubc vazebná doména



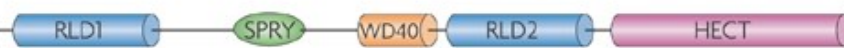
Příklady HECT E3 ligáz

HERC family (six members)

Small HERCs



Large HERCs
(for example,
HERC1)



Nedd4 family (nine members)



Other HECTs

E6AP, HECTD2 and
KIAA0614



TRIP12



G2E3



EDD



HACE1 and HECTD1



UBE3B and UBE3C



KIAA0317

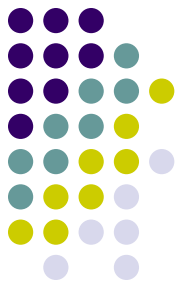


HUWE1

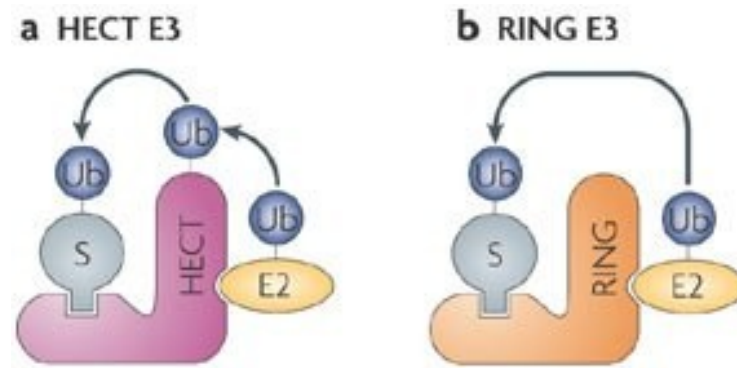


HECTD3





Rozdíl mezi HECT a RING E3 ligázami

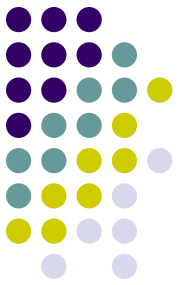


Nature Reviews Molecular Cell Biology 10, 398-409 (June 2009)

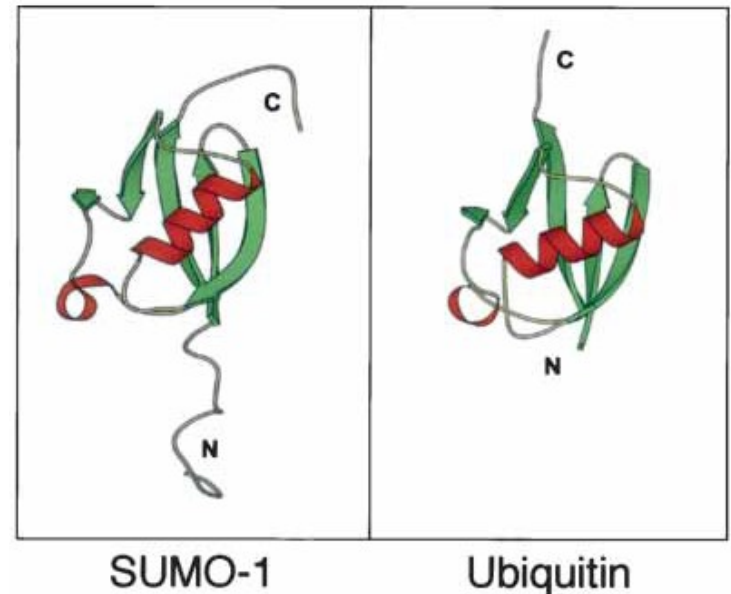
Rozdíl v přenosu ubiquitinu na substrát:

- HECT – obsahují konzervovaný katalytický cystein, který funguje jako akceptor ubiquitinu z E2. Ubiquitin je následně přenesen na specifický lyzin substrátu
- RING – fungují jako „lešení“, které usnadňuje interakci mezi E2 a substrátem

SUMO



- small ubiquitin-related modifier
- ubiquitin-like protein
- zapojen do řady buněčných procesů jako transkripce, struktura chromatinu, opravy DNA
- podobně jako ubiquitin (neproteolytický) reguluje lokalizaci proteinů a aktivitu, ve většině případů reguluje protein-proteinové interakce
- u savců 4 homology (SUMO-1, -2, -3, -4)
- obvykle fungují jako monomery (SUMO-1, -2, -3 tvoří polymery *in vitro*, funkční relevance *in vivo* nebyla pozorována)

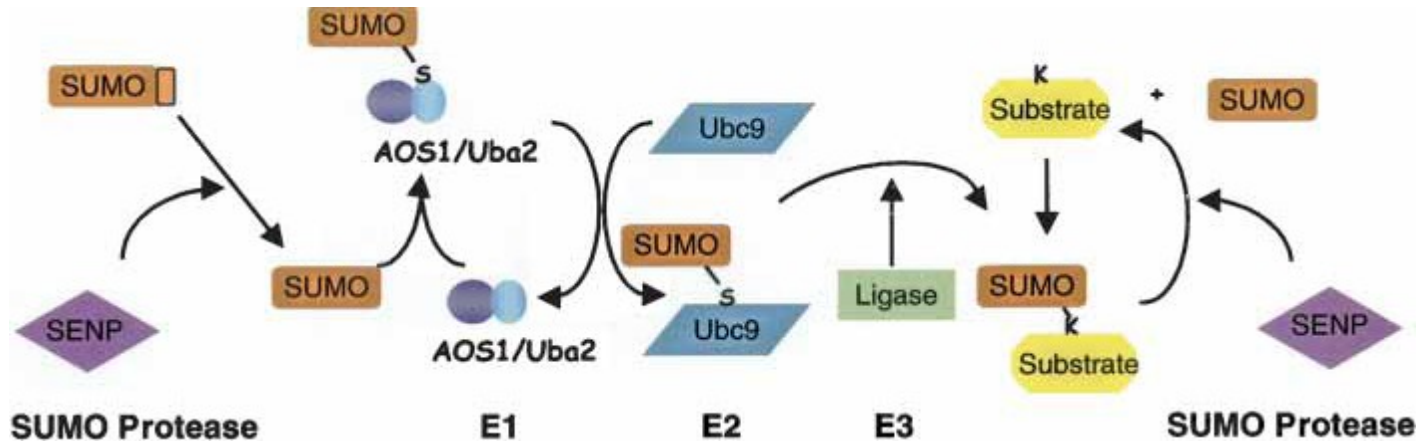


GENES & DEVELOPMENT 18:2046–2059

SUMO

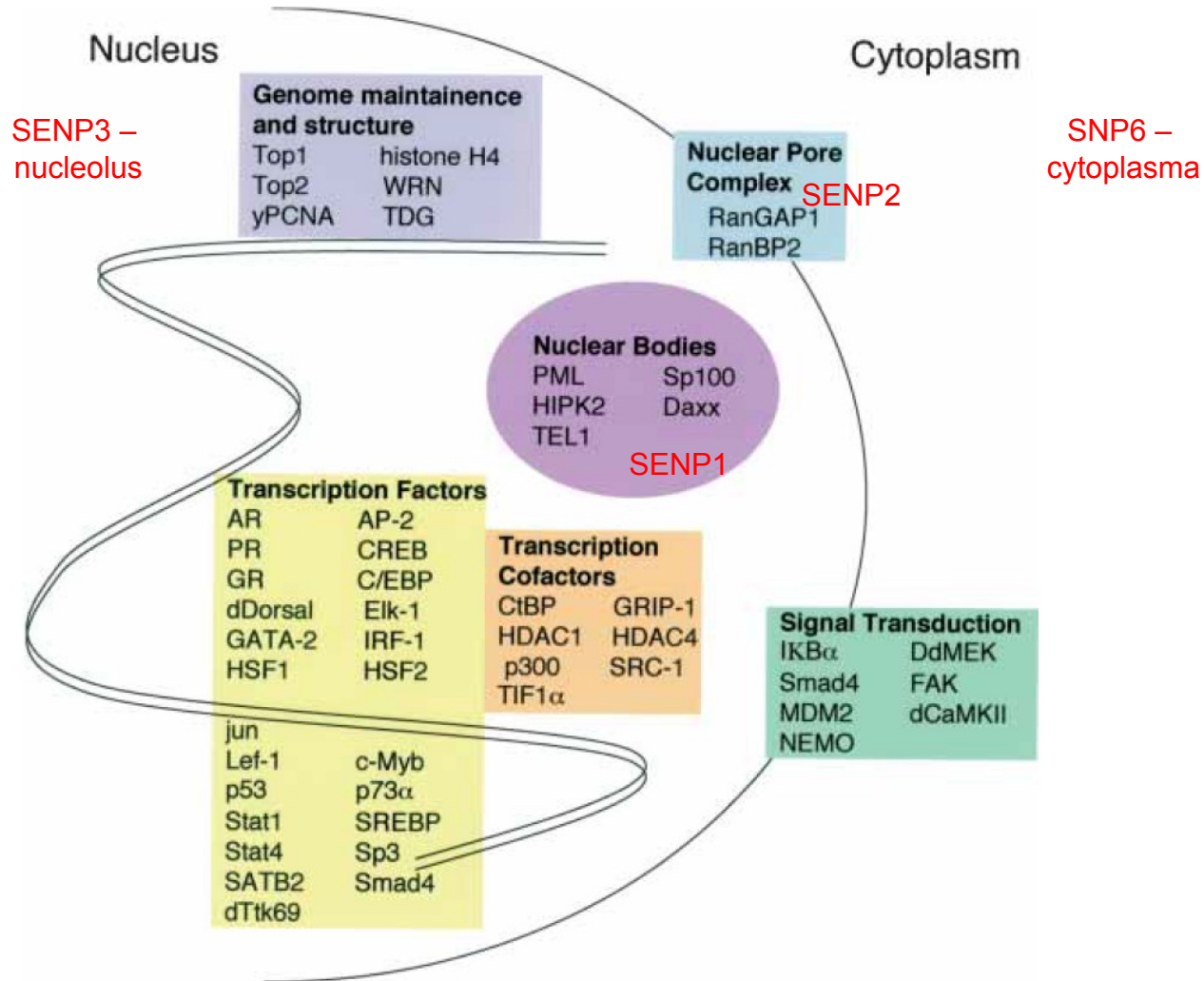


- vazba na substrát jako u ubiquitinu – kovalentní připojení k substrátu přes isopeptidovou vazbu mezi C-koncem glycinu SUMO a lyzinem substrátu
- pouze jeden E2 konjugační enzym – Ubc9
- modifikace proteinů SUMOylací i ubiquitinací je dynamický a reverzibilní proces
- SUMO specifické proteázy – štěpí SUMO prekurzory i odstraňují SUMO ze substrátu (kvasinky: Ulp1 → lidské homology: SENP1, SENP2, SENP3, SENP6)





SUMO



SUMO



- proteiny mohou být modifikovány SUMO nebo UBI, často s odlišnými následky
- v některých případech SUMO kompetuje s UBI nebo acetylací na lyzinovém zbytku

Protein	Function	Role of SUMOylation	Role of ubiquitination	Common lysine? ^a
IKB α	Signal transduction/ Inhibition of NF κ B	Stabilizes IKB α by competition with ubiquitin	Promotes proteasome-mediated degradation	yes
NEMO	Signal transduction/ IKK regulation	Promotes nuclear localization	Required for IKK activation	
γ PCNA	DNA replication and repair	Regulates DNA repair during replication	Monoubiquitination promotes translesion DNA repair; polyubiquitination promotes error-free DNA repair	yes
PML	Tumor suppressor	Regulates subnuclear localization; required for integrity of nuclear bodies	Promotes proteasome-mediated degradation	
p53	Transcription factor/ tumor suppressor	Variable effects observed; reduces transcriptional activation in some contexts	Promotes proteasome-mediated degradation	
Glucocorticoid receptor (GR)	Transcription factor	Reduces transcriptional activation dependent on promoter context	Promotes proteasome-mediated degradation	
c-Myb	Transcription factor	Reduces transcriptional activation	Promotes proteasome-mediated degradation	
HDAC-1	Histone deacetylase/ transcriptional corepressor	Promotes deacetylase activity and transcriptional repression	Promotes proteasome-mediated degradation	

^aIndicates that competition by ubiquitin and SUMO for a common lysine in the substrate protein has been reported to impact activity.

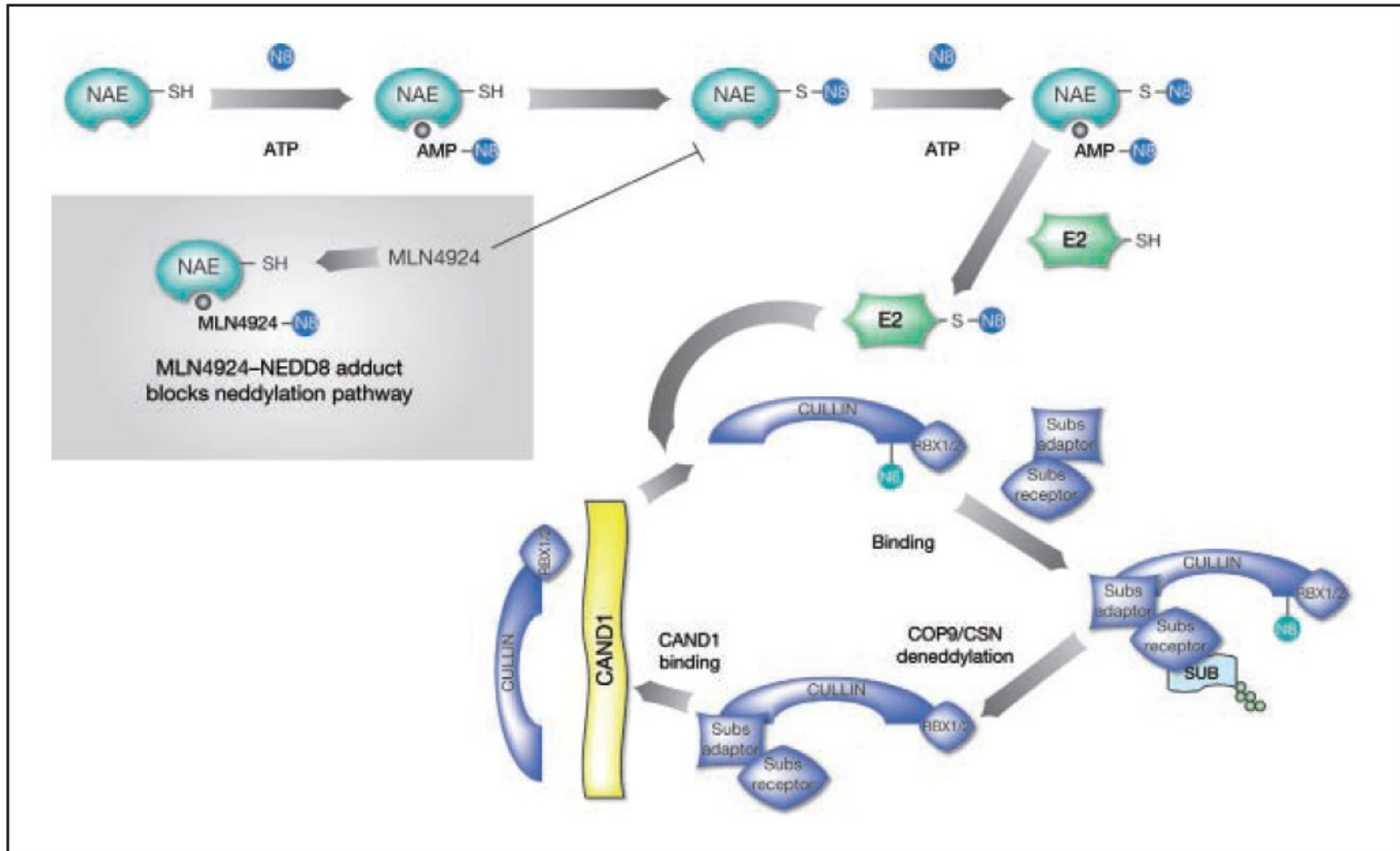
NEDD8



- hraje kritickou roli při aktivaci E3 cullin-RING ligáz – kovaletním připojením NEDD8 k jádru cullinu → nedynylace
- NEDD8 – 9KDa, E1 – NAE (AppBp1/UBA3), E2 – UBC12, UBE2F
- nedynylace cullinů umožňuje správné prostorové uspořádání těchto ligáz pro vazbu E2-E3 komplexu vyžadovaného pro ubiquitinaci substrátu
- prvním krokem nedynylace je aktivace NEDD8 – lidská deneddyláza 1(DEN1)/SENP8 – odstraňují 5aa z C-konce NEDD8 prekurzoru
- denedylace cullin-RING ligáz je zprostředkována přes COP9 signalozom (CSN)
- CAND1 – váže denedylovaný cullin, blokuje vazebné místo pro adaptory a NEDD8 a působí tak jako inhibitor cullinů, balanc mezi nedylací a denedylací může být ovlivněn dostupností adaptorových proteinů a substrátu, např. vyšší hladina Skp2 a p27 substrátu zvyšuje hladinu nedylovaného CUL1 (vyšší hladina Skp2 způsobuje překonání inhibičního efektu CAND1)



NEDD8



NEDD8

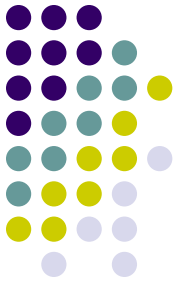
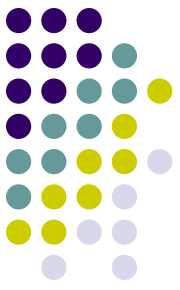


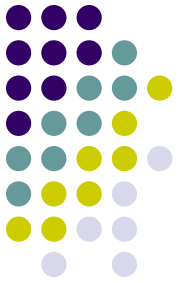
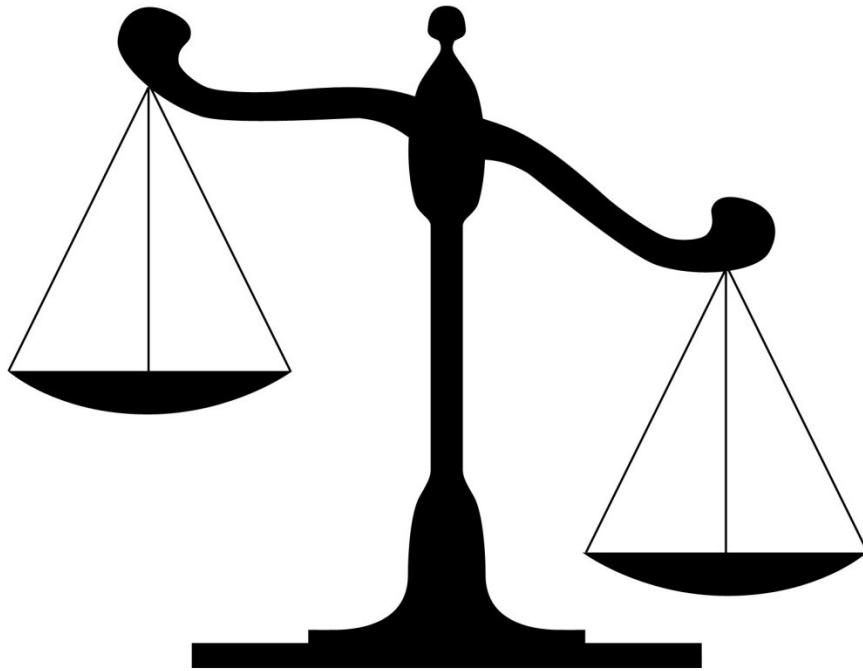
Table 1. Substrate Proteins of the Cullin-RING Ligases (CRLs) and Their Associations with Cancer

Substrate	Role	CRL	Association with Cancer
Cdt-1 ^{76,78,79,110}	DNA replication licensing factor	CRL1 ^{Skp2} /CRL4 ^{cdi2}	Dysregulated expression in human tumors; overexpression linked to genomic instability
p27 ^{48,67,69,81,94}	Cyclin-dependent kinase inhibitor	CRL1 ^{Skp2} /CRL4	Reduced levels due to increased degradation; seen in multiple cancers, associated with poor prognosis
plκBα ^{46,74,75,109}	Inhibitor of NF-κB	CRL1 ^{βTrCP1}	Constitutive IKK activity results in plκBα degradation and constitutive NF-κB activity, demonstrated in human cancers including ABC-DLBCLNF-κB signaling associated with chemoresistance in various tumor types
NRF2 ^{70,111}	Stress-response transcription factor	CRL3 ^{Keap1}	Overexpressed in multiple human cancers; may also be associated with acquired chemoresistance
HIF-1α ^{71-73,87}	Stress (hypoxia)–response transcription factor	CRL2 ^{VHL}	Aberrant expression of VHL tumor suppressor protein results in development of a variety of tumors; HIF-1α important for tumor survival
Cyclin E ^{66,67,112-115}	Cell cycle regulator	CRL1 ^{Fbw7}	Aberrant cyclin E expression associated with tumor development and progression in breast cancer and with various other cancers
c-Jun ¹¹⁶ β-catenin ⁷⁵	AP1 transcription factor Transcription factor	CRL1 ^{Fbw7} CRL1 ^{βTrCP}	c-Jun identified as an oncoprotein Upregulated in various cancers including colon and prostate cancer and melanoma
Cdc25A ¹¹⁷⁻¹¹⁹	Activator of cyclin-dependent kinase complexes CDK2/cyclin A and CDK2/cyclin E	CRL1 ^{βTrCP}	Upregulated in various cancers
Emi1 ^{68,120}	APC ^{Cdc20} inhibitor	CRL1 ^{βTrCP/Slimb}	Possible involvement in development of ovarian clear cell carcinoma
c-Myc ¹²¹ mTOR ^{122,123} BimEL ¹²⁴	Cell proliferation regulator Cell growth and proliferation signaling Tumor suppressor; proapoptotic BH3-only protein	CRL1 ^{Fbw7} CRL1 ^{Fbw7} CRL1 ^{βTrCP}	c-Myc identified as an oncoprotein Dysregulated mTOR signaling in various human tumors Levels decreased in transformed cells through enhanced degradation

Onemocnění spojené s poruchami degradace proteinů



- neurodegenerativní choroby:
 - Huntingtonova choroba – na základě genetické informace se tvoří proteiny, které obsahují opakující se sekvence glutaminů za sebou, které nejsou katalytická místa v proteozomu schopna štěpit – glutaminové sekvence se hromadí jako toxické, intracelulární inkluze
 - Parkinsonova choroba – tvoří se agregáty α -synleucinu (cytozolický presynaptický protein) v neuronech, mohou být selektivně odstraněny v lysozomech (pomocí chaperon-zprostředkované autofagie). U Parkinsona se vyskytuje mutantní forma α -synleucinu, která se váže na lysozomy, ale není do nich přenesena
 - Alzheimerova choroba – selhání makroautofagie, v autofagických vakuolách se hromadí $A\beta$ -amyloidní peptidy (toxické produkty proteolýzy při AD) a ukládají se v mozku
- neschopnost aktivovat makroautofagii je běžnou vlastností některých typů rakoviny prsu a vaječníků (nerovnováha mezi syntézou a degradací proteinů)
- akumulace lipofuscinu v lysozomech (intralysozomální negradovatelný pigment), obvykle je známkou stárnutí, je spojován různými onemocněními sítnice, včetně makulární degenerace
- ve stáří se snižuje proteazomální aktivita v orgánech jako je srdce, plíce, játra, ledviny a CNS, což přispívá k akumulaci poškozených proteinů a chorobám spojeným s touto akumulací



Be balanced...😊