

Degradace buněčných proteinů

- vedle ovlivňování účinnosti tvorby - hlavní způsob regulace hladiny proteinů v buňce
- komplexní a přísně regulovaný proces, který významně ovlivňuje řadu buněčných procesů
- zajištěna kaskádou enzymatických reakcí (substrátová specifita)

Význam degradace proteinů

Regulace mnoha životně důležitých procesů:

- buněčný cyklus a růst
- diferenciaci a vývoj
- odpověď na stresové a mimobuněčné faktory
- povrchových receptorů, iontových kanálků
- DNA reparace
- imunitní a zánětlivé reakce
- biogeneze organel
- apoptóza

Poruchy degradace se projevují vážnými dědičnými i získanými chorobami

Buněčná proteolýza probíhá ve dvou kompartmentech

1) lysozomální proteolýza:

- 10 % celkové proteolytické aktivity buňky
- substráty jsou většinou membránové nebo extracelulární proteiny přijaté endocytózou
- hlavním degradačním prvkem jsou kyselé proteázy (katepsiny)

2) cytozolická proteolýza

- substráty jsou zejména cytozolické regulační proteiny (cykliny, nádorové supresory, nově potvrzeno též pro membránové a extracelulární proteiny, které jsou dopraveny do cytozolu)
- hlavními degradačními prvky jsou kalpainsy, Ca-dependentní proteázy a hlavně proteazom
- proteazom je konečným článkem ubiquitinační dráhy

Pathways of protein breakdown in mammalian cells

Cytosolic proteins

Abnormal proteins

Short-lived proteins

ER-associated proteins

Long-lived proteins

Endocytosed proteins

Membrane proteins

Extracellular proteins

Ubiquitin-proteasome pathway

(-)

MG132
lactacystin, etc.

Class I
Antigen
presentation

Amino acids

Lysosomal pathway

(-)

E64C
weak bases

Class II
Antigen
presentation

SHORT-LIVED REGULATORY PROTEINS DEGRADED BY THE PROTEASOME

Transcriptional regulators

NK- κ B (p105)

I κ B

YY1

ATF2 (activating transcription factor 2)

HIF1 (hypoxia-inducible factor 1)

ICER (Inducible cAMP early repressor)

Cell-cycle proteins

Cyclins (mitotic cyclins, G1 cyclins, etc.)

Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors (p27, etc.)

Oncogenic products and tumour suppressors

c-Jun

c-Fos

c-Mos

E2A proteins

p53

Enzymes

Receptor-associated protein kinases

DNA topoisomerase

Ornithine decarboxylase

Významné cíle proteazomové degradace

- regulátory buněčného cyklu a růstu
- složky buněčných signálních kaskád
- enzymy, které napomáhají udržovat životní funkce buňky („house-keeping genes“)
- enzymy zapojené do metabolických reakcí
- varianty proteinů vytvořené v důsledku mutace nebo defektní proteosyntézy
- antigeny hlavního histokompatibilního komplexu třídy I

Ubiquitin

- 76 aminokyselinových zbytků
- evoluční konzervativnost
- vyskytuje se ve všech tkáních všech eukaryotických organismů
- v buňce buď volná molekula nebo kovalentně připojená k jiným proteinům

Ubiquitin

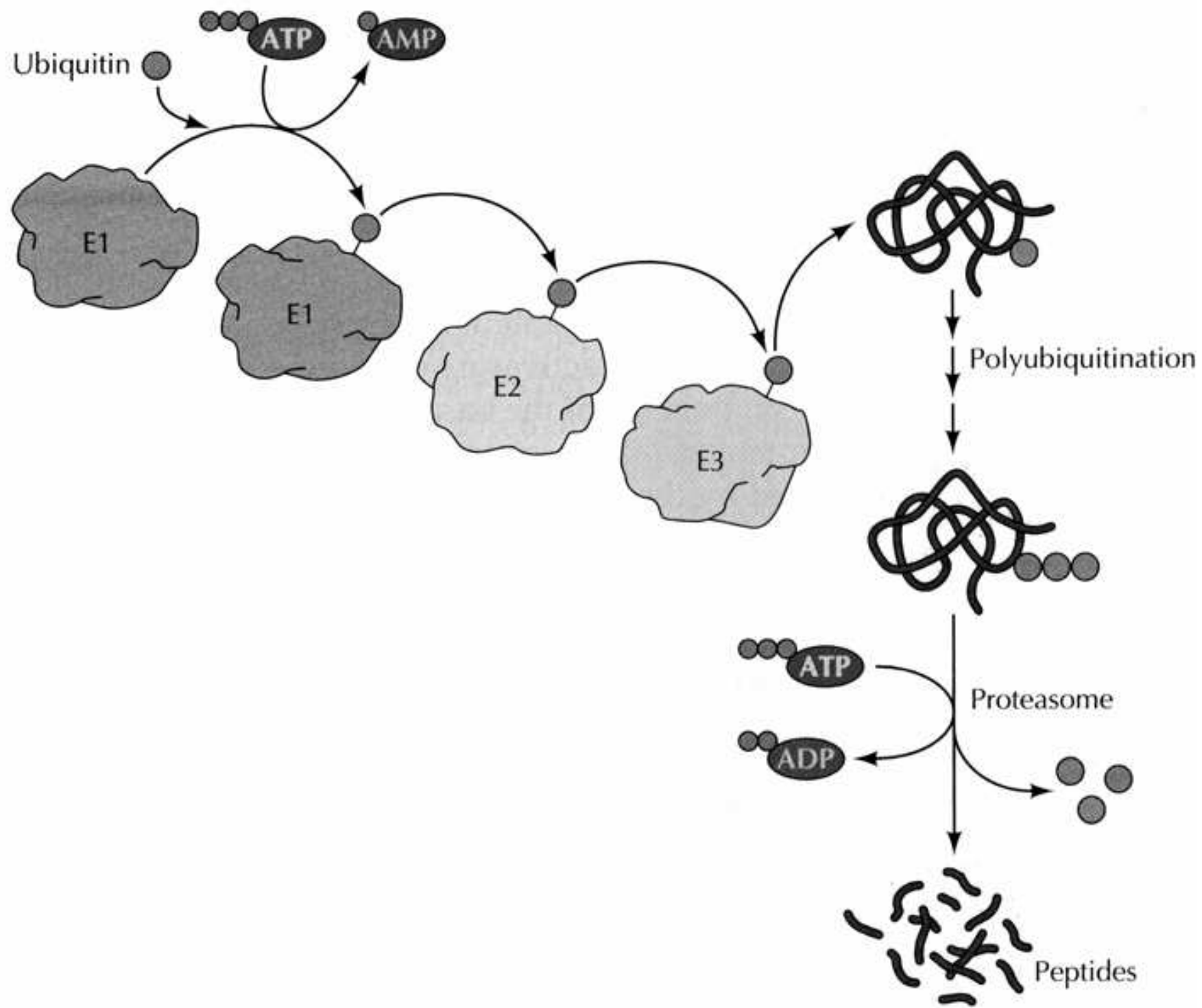
- má funkci markeru, který označuje cytosolické nebo jaderné proteiny určené k rychlé proteolýze
- váže se k aminoskupině lyzinu cílového proteinu
- vazbou dalších molekul ubiquitinu vzniká polyubiquitinový řetězec
- proteiny označené polyubiquitinem jsou rozeznány a degradovány proteazomem

Ubiquitin má široké spektrum cílových molekul

- poškozené a chybně složené proteiny
- transkripční faktory
- regulátory růstu
- přenašeče signálů
- regulátory buněčného cyklu
- nádorové supresory a onkoproteiny
- enzymy
- virové proteiny
- membránové receptory

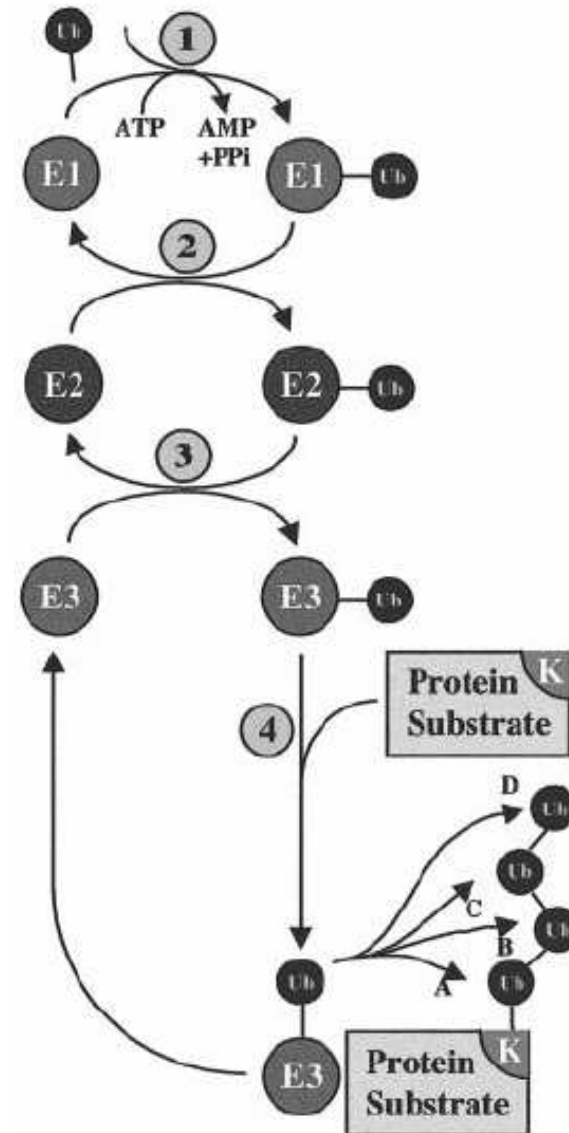
Ubiquitinační dráha - princip

- specifické vyhledání proteinu v závislosti na buněčném cyklu, diferenciacním stadiu buňky, atd.
- označení tohoto substrátu kovalentním připojením několika molekul ubiquitinu
- degradace tohoto substrátu proteazomem 26S
- uvolnění ubiquitinu a jeho využití při dalším degradačním cyklu



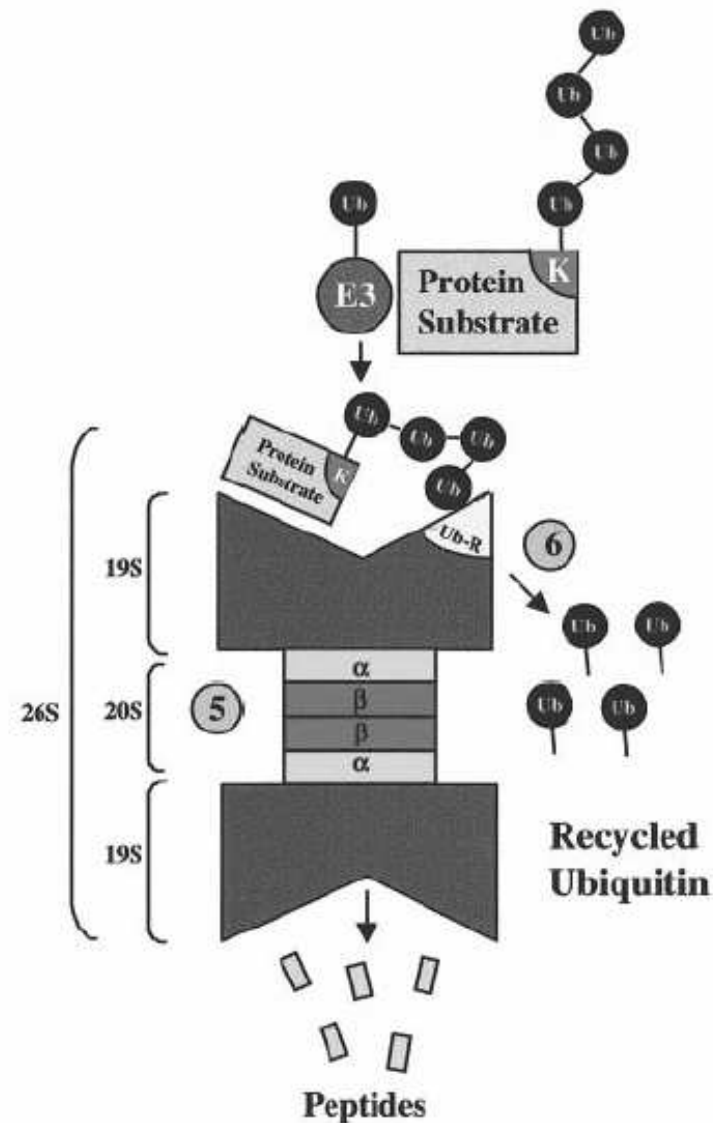
Připojení ubiquitinu k cílové molekule probíhá ve třech krocích

- aktivace Ub připojením ubiquitin aktivujícího enzymu E1
- přenos Ub z E1 na ubiquitinovou protein ligázu E3 prostřednictvím některého z přenašečů (Ub-konjugujících enzymů) E2
- k E3 se specificky váže substrátový protein
- E3 katalyzuje kovalentní připojení Ub k substrátu (obvykle ke zbytku lysinu izopeptidovou vazbou)
- v dalších reakcích se k modifikovanému substrátu ve stejném místě vážou další molekuly Ub: vzniká polyubiquitinový řetězec



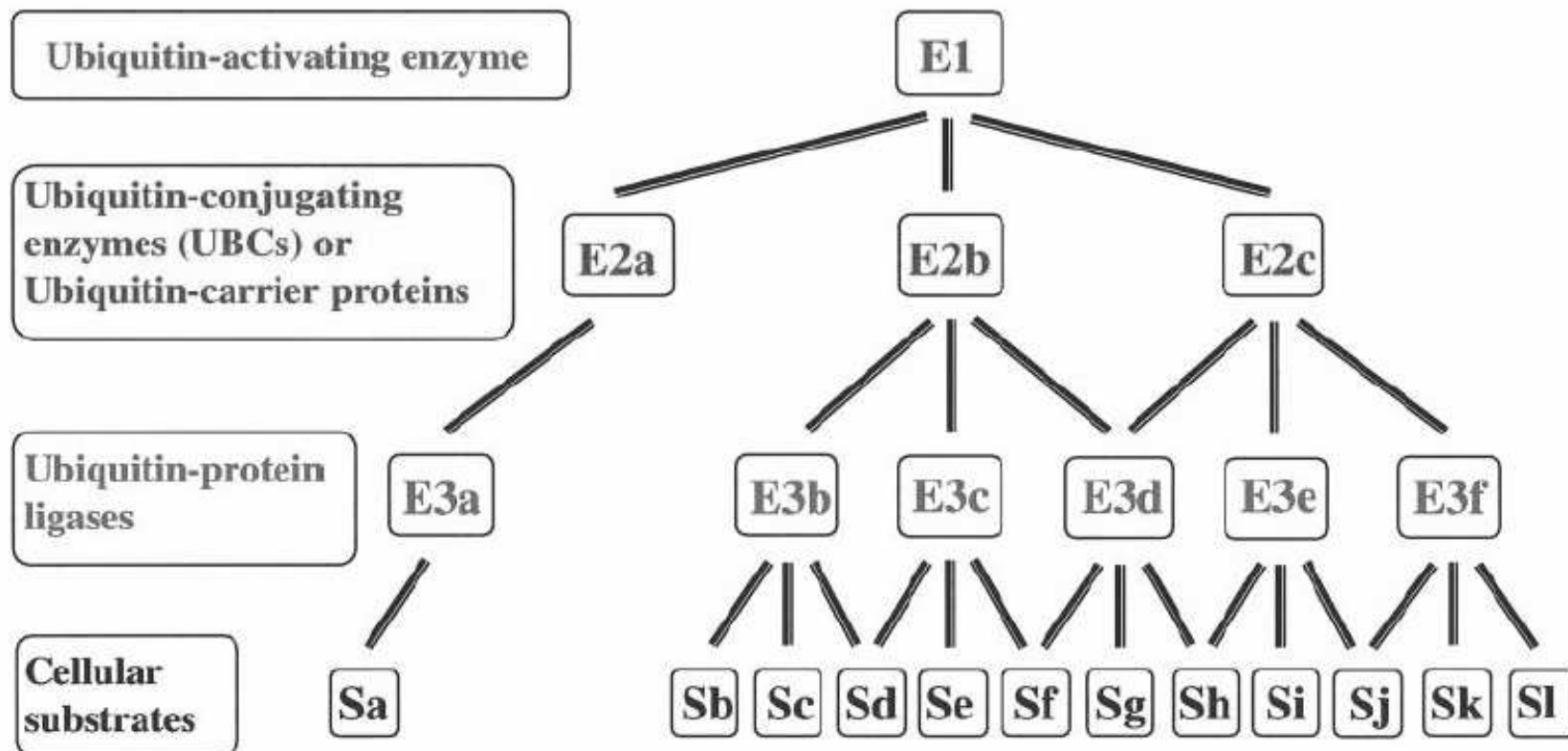
Proteiny s navázaným Ub podléhají degradaci na proteazomu

- vazba poly-Ub substrátu k Ub-receptorové podjednotce proteazomu a degradace substrátu
- recyklování Ub prostřednictvím izopeptidáz



Kaskádový mechanismus značení substrátů

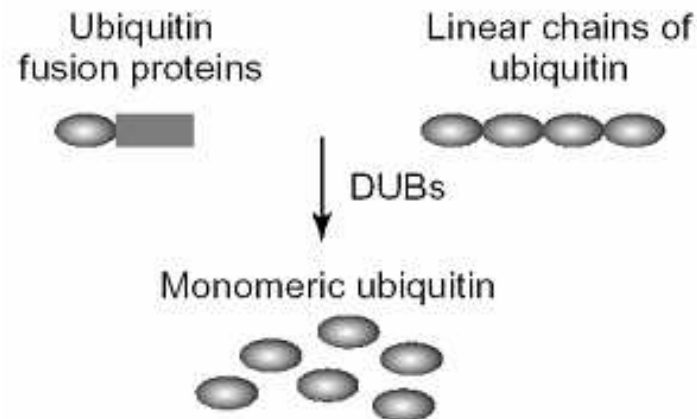
- jediná molekula ubiquitin-aktivujícího enzymu přenáší Ub na několik molekul E2
- E2 většinou přenáší Ub na několik E3
- E3 mohou být substrátově specifické nebo mohou rozeznat několik substrátů s podobnými, ale neidentickými strukturálními motivy



Ubiquitinové prekurzory se syntetizují dvěma způsoby

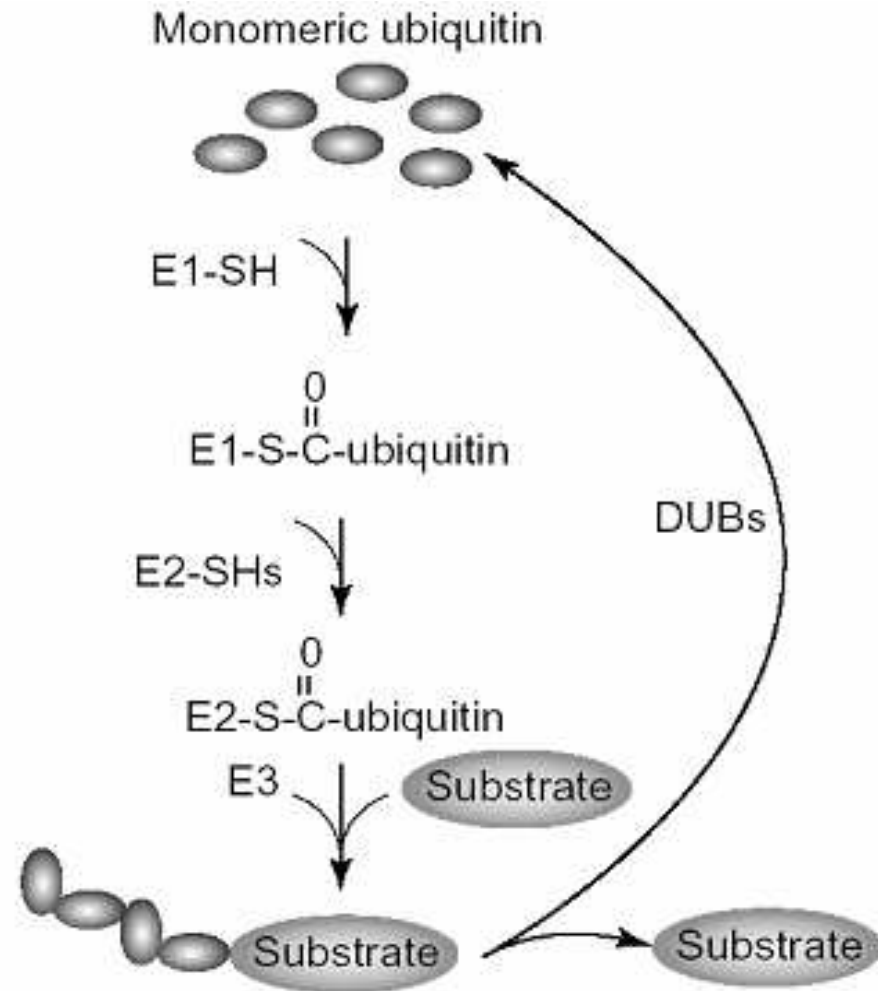
- tvorba polymeru ubiquitinu v uspořádání „head-to-tail“
- tvorba jediné molekuly Ub spojené s jiným proteinem (obvykle s některým z ribozomálních proteinů – pravděpodobná účast na sestavování ribozomu jako chaperon)

- oba typy Ub jsou přeměněny do monomerní formy působením deubiquinačních enzymů (DUB)



Ubiquitinace „step-by-step“

1. Tvorba thioesterové vazby mezi C-koncovým glycinem Ub a cysteinem v aktivním místě enzymu E1
2. Přímý přenos Ub na E2
3. Přenos Ub na epsilon-aminoskupinu lysinu substrátu
4. DUBs jsou cysteinové proteázy, které specificky štěpí konjugáty Ub – antagonizují E3

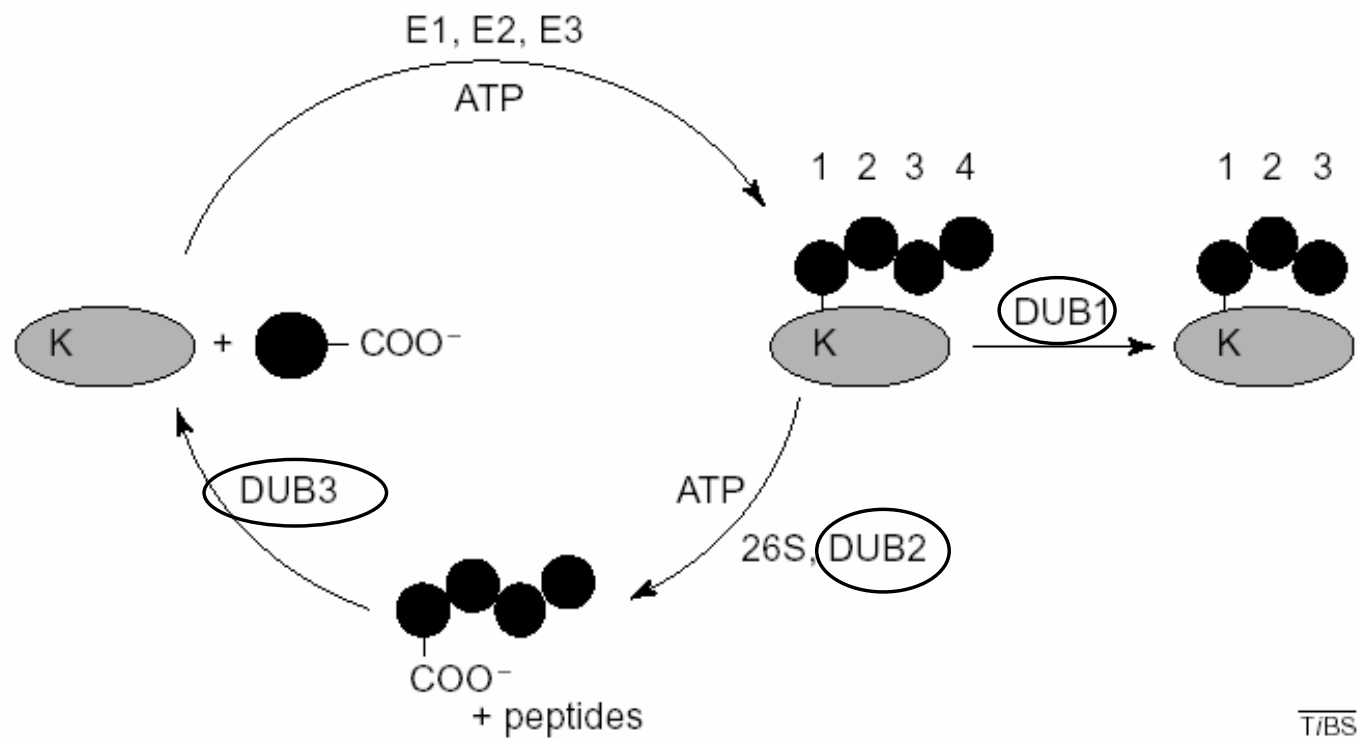


Deubiquitinační enzymy DUBs

DUB1: postupně odstraňuje molekuly Ub od vzdáleného konce řetězce

DUB2: odštěpuje Ub od substrátu

DUB3: destabilizuje neukotvené řetězce Ub



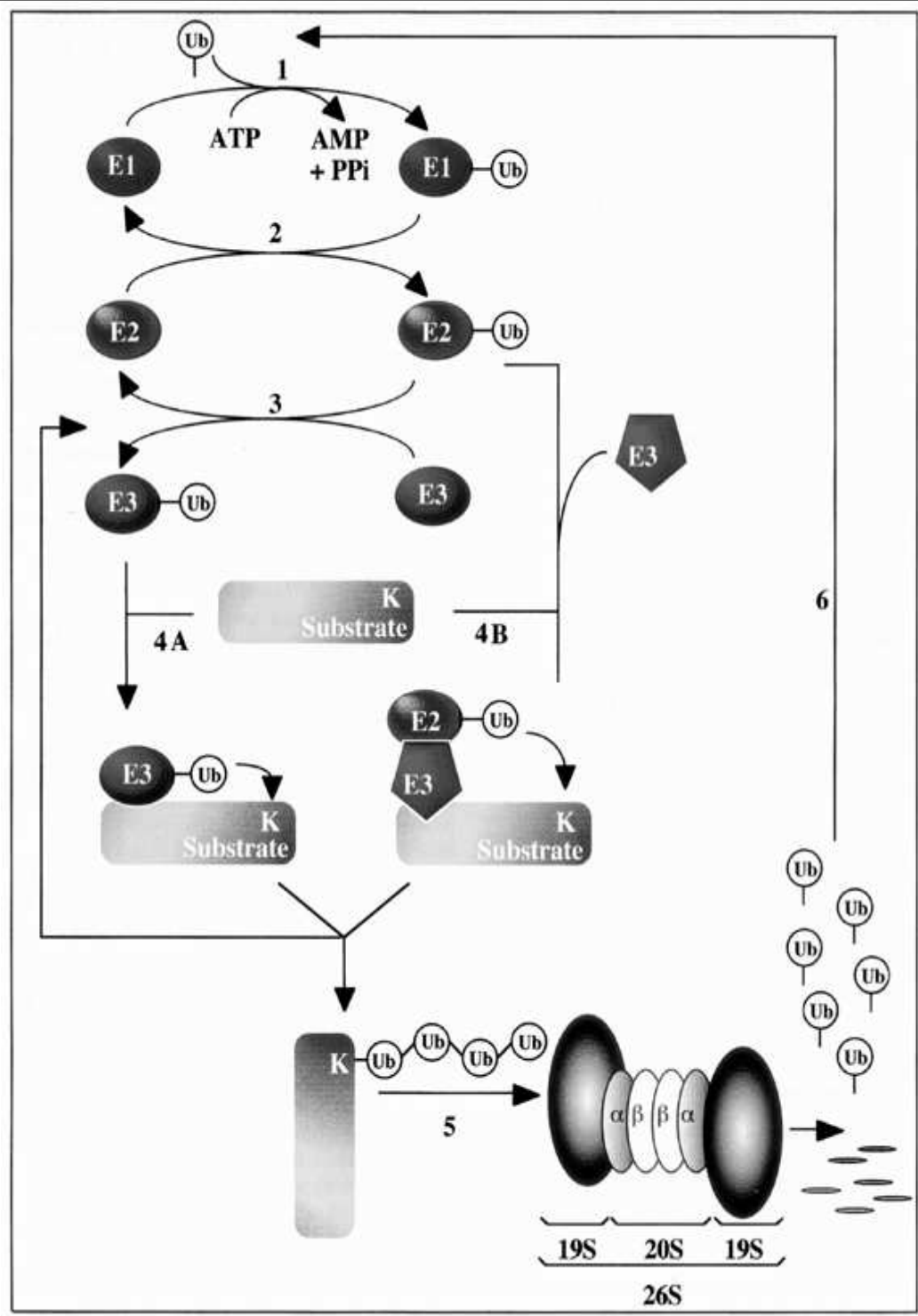
Degradační dráha

1. Aktivace Ub enzymem E1
2. Přenos aktivovaného Ub na Ub-konjugující enzym E2
3. a 4. Přenos aktivovaného Ub buď přímo nebo nepřímo z E2 na lysin proteinového substrátu prostřednictvím ubiquitin protein ligázy E3.

Opakovaná konjugace Ub k již ubiquitinovaným zbytkům lysinu vede k tvorbě Ub řetězců

5. Vazba poly-Ub substrátu k Ub-receptorové podjednotce proteazomu a degradace substrátu

6. Recyklování Ub prostřednictvím izopeptidáz



Podstata vysoké přesnosti degradace

- substráty jsou rozeznávány různými E3
- substráty musí být určitým způsobem modifikovány, aby mohly být rozeznány E3 (fosforylace, spojení s jinými proteiny, např. chaperony)

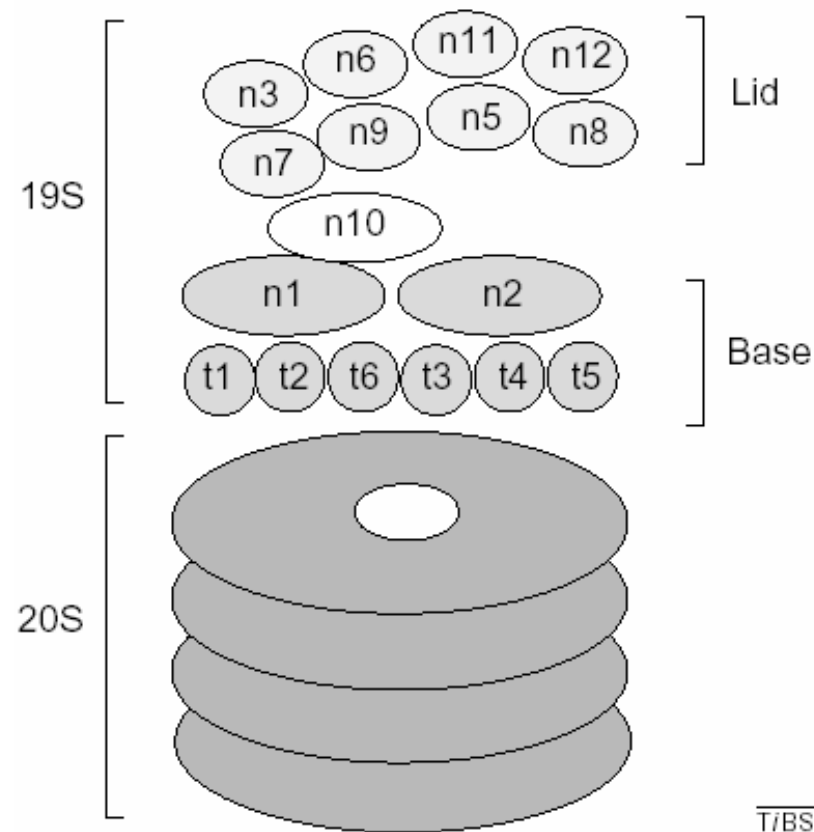
Proteazom 26S

- ATP-dependentní komplex proteáz
- katalyzuje rozvolnění a proteolýzu svých substrátů
- složen z katalytického komplexu 20S, který je obklopen dvěma regulačními komplexy 19S

Struktura proteazomu

Podjednotka 20S: válec složený ze čtyř kruhů

- vnitřní komora je přístupná pouze úzkými póry na obou koncích
- otvírání pórů je řízeno
- nese aktivní místa pro proteolýzu



Kompartmentalizace je důležitá pro správnou funkci proteazomu

- vysoká koncentrace aktivních míst zajišťuje velmi účinnou degradaci proteinů
- degradace probíhá jen ve vymezeném prostoru

Cena za tento luxus:

- substráty musí být rozvolněny a translokovány, aby se dostaly k aktivním místům proteazomu (energetické nároky, zajištěno podjednotkami 19S)

3 typy aktivních míst v podjednotce 20S proteazomu

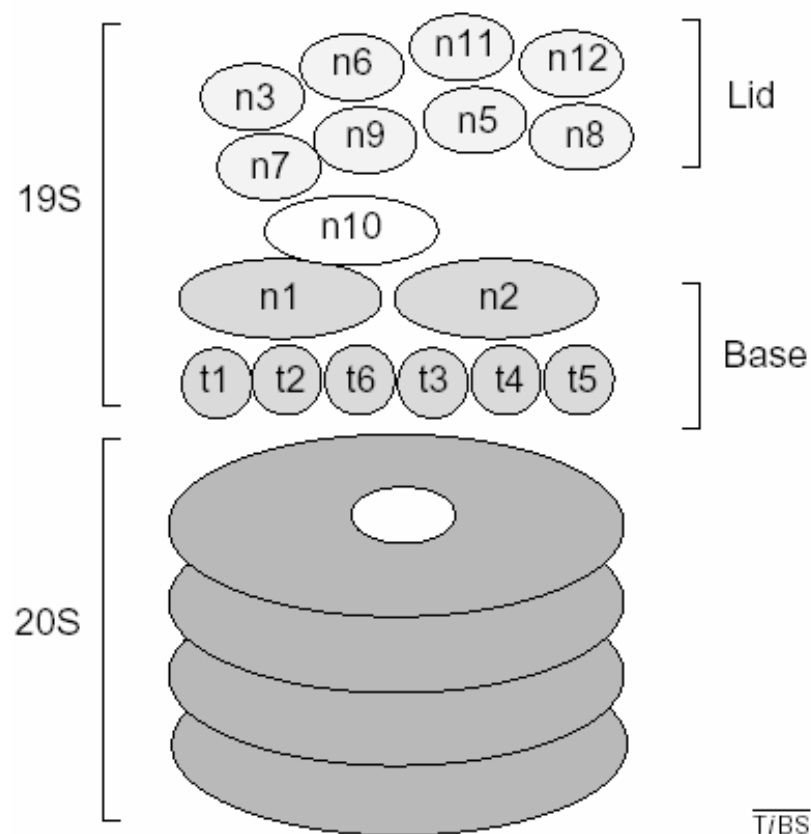
- trypsinová
- chymotrypsinová
- post-glutamyl peptidyl hydrolytická

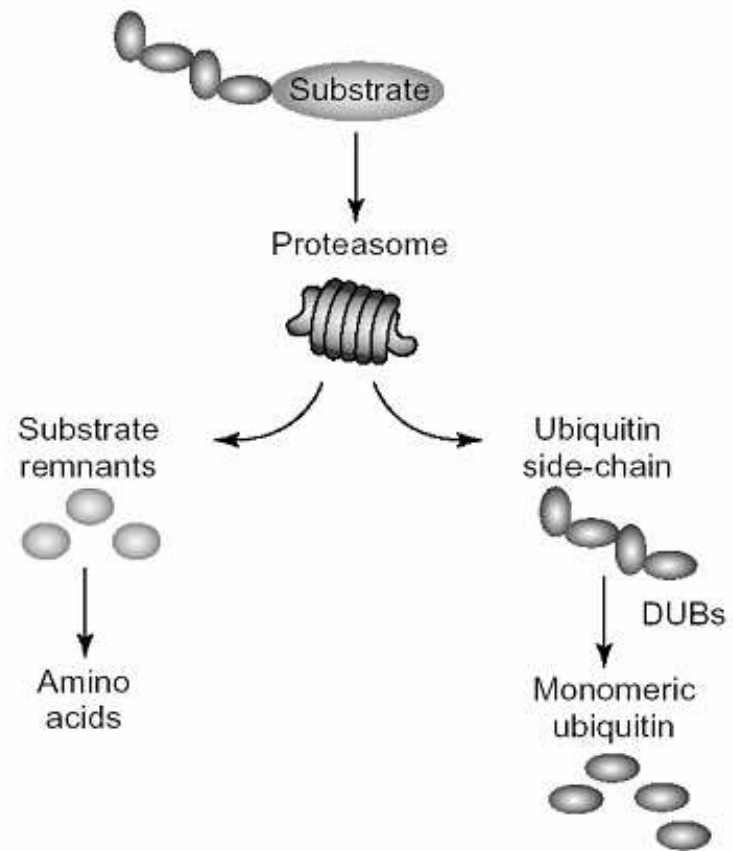
Podjednotky 19S proteazomu

- regulační funkce: rozeznávají a rozplétají ubiquitinované proteiny

Složeny z 15-20 jednotek:

- ATPázy (t1-t6) tvoří základnu
- Jednotky bez ATPázové aktivity (n1-n12) tvoří poklop





Deubiquitinační enzymy

- cysteinové proteázy
- odstranění Ub z proteinů

Patří do jedné ze dvou rodin:

- UCH (ubiquitin C-terminal hydrolase)
- UBP (ubiquitin processing protease)

Význam:

- tvorba volného Ub z polyUb řetězců (recyklace)
- odstranění Ub z cílových proteinů
- čištění proteazomu od zbytků peptidů

SUMO-1 (sentrin)

- protein podobný ubiquitinu (small ubiquitin-related modifier-1)
- kovalentně připojen k cílovým proteinům
- základní rysy ubiquitinové dráhy platí i pro SUMO-1:
 - aktivován ATP-dependentním enzymem
 - aktivovaná varianta SUMO-1 se přenáší na Ubc9 (ekvivalent E2)
 - SUMO-1-Ubc9 rozeznává substrát: přenos SUMO-1 na lysinový zbytek cílového proteinu

Význam modifikace proteinů „sumoylací“

ochrana proteinů před ubiquitinací a následnou degradací
(např. stabilizace I κ B)

NFκB/IκB

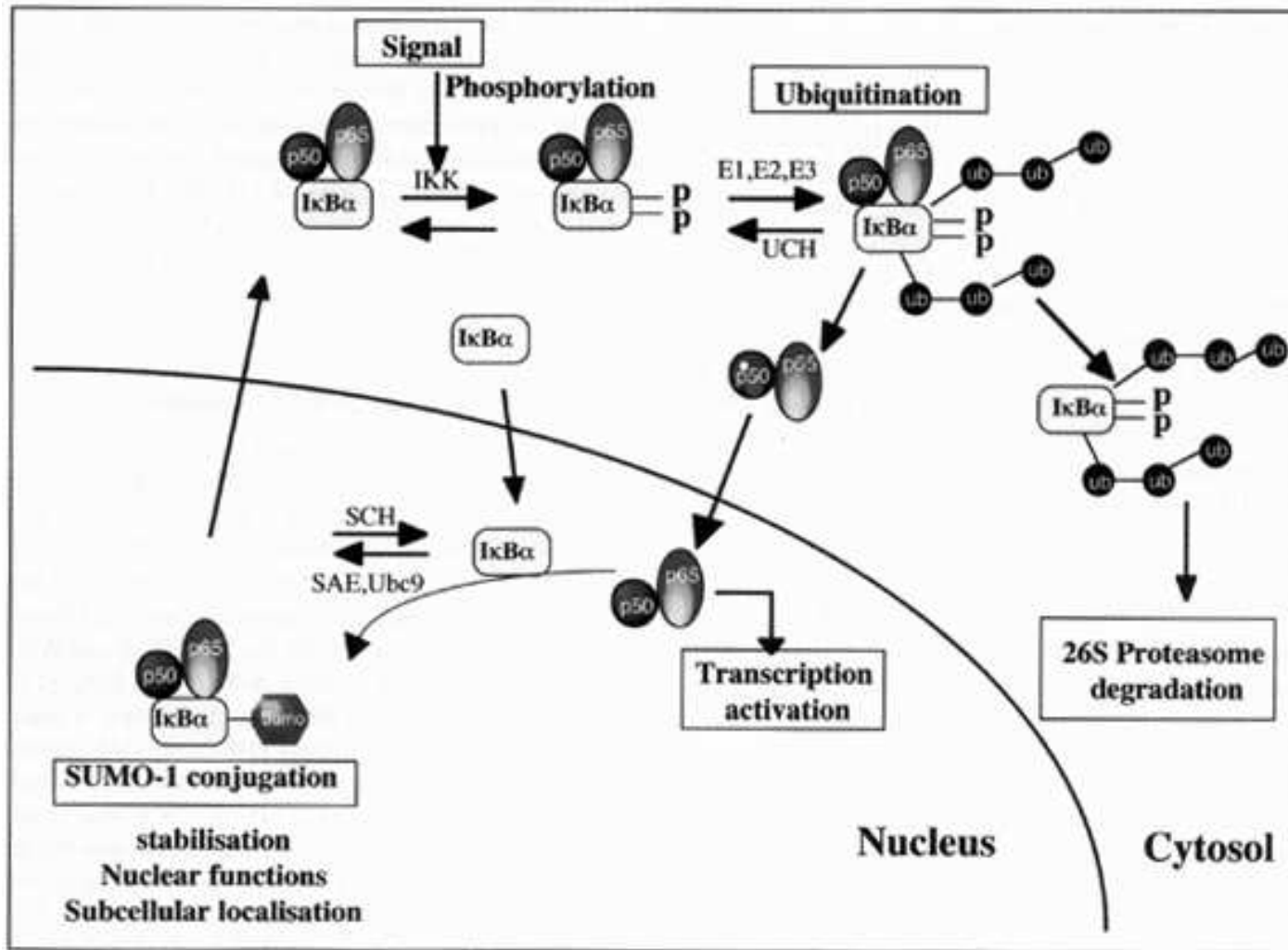
- NFκB je důležitý transkripční faktor
- aktivace NFκB je podmíněna degradací svého inhibitoru IκB
- autoregulace: - NFκB indukuje transkripci genu IκB
 - protein IκB se přechodně hromadí v jádře a tlumí NFκB-dependentní transkripci

Funkce IκB: transport komplexu NFκB/ IκB do cytoplazmy
(transkripčně aktivační funkce NFκB se v cytoplazmě neuplatní)

Hladina IκB v buňce je určena mírou jeho degradace.

Aktivace NF κ B

- signál zachycen na buněčném povrchu - aktivace I κ B kináz IKK
- fosforylace I κ B (Ser 32 a Ser 36)
- fosforylovaná molekula I κ B je substrátem pro ubiquitinaci
- molekula I κ B s navázaným polyubiquitinovým řetězcem je degradována proteazomem
- molekula NF κ B zbavená I κ B se translokuje do jádra a indukuje transkripci svých cílových genů
- molekula I κ B opatřená SUMO-1 nepodléhá modifikaci ubiquitinem a nemůže být proto degradována
 - transkripce řízená NF κ B zastavena



p53

- ochrana genomu před poškozením
- transkripční faktor, který ovlivňuje buněčnou proliferaci a apoptózu
- hladina p53 je řízena ubiquitinovou degradační drahou
- v normálních buňkách je p53 konstitutivně ubiquitinován Mdm2 ubiquitin ligázou
- stresové signály aktivují p53 tím, že inhibují jeho degradaci

AP-1 („activator protein 1“)

- transkripční faktor složen z dvojice členů proteinových rodin Fos a Jun
- zprostředkovává reakce na vnější signály zajištěním indukce genů zapojených do řízení buněčného cyklu, diferenciaci, transformace a apoptózy
- hladiny proteinů Fos a Jun v buňce jsou určeny mírou degradace ubiquitinovou drahou
- existují onkoproteiny v-Jun a v-Fos, které postrádají domény podléhající modifikaci ubiquitinem - proteiny jsou mnohem stabilnější

E2F

- transkripční faktor, který hraje klíčovou roli v řízení buněčné proliferace
- kontrola exprese genů řídících postup z fáze G1 do S
- aktivita E2F je řízena interakcí s dalšími molekulami:
cyklinem A, histonovými deacetylázami HADC1, HADC2 a nádorovými supresory p53 a Rb
- vazba E2F k Rb vede k inhibici transkripční potence E2F
- vazba E2F k ubiquitin ligáze zajišťuje degradaci E2F

Ubiquitinace není vždy spojena s degradací proteinů

Monoubiquitinované proteiny se degradují v lysozomech:
EGFR a jiné membránové proteiny mohou být označeny mono-Ub:

- internalizace
- transport do endozomů
- transport do lysozomů

Neurodegenerativní choroby potenciálně spojené s dysfunkcí ubiquitin-proteazomového systému (UPS)

Selhání UPS:

- akumulace chybně složených nebo poškozených proteinů
- agregáty poškozených proteinů mohou vážně narušit

buněčné pochody – mechanické/fyzikální důvody
- vychytání a inhibice funkce jiných složek buňky

Neobvyklé agregáty různých proteinů byly nalezeny v mozku pacientů postižených neurodegenerativními chorobami

Alzheimerova choroba

Parkinsonova choroba

Huntingtonova choroba

Amyotrofni laterální skleróza

- agregáty obvykle obsahují protein, který je spojen se vznikem dané choroby a další složky UPS a chaperony, které mají chybně spojené proteiny skládat
- agregáty proteinů inhibují funkci UPS (ucpání proteazomu?)

Neurodegenerativní choroby potenciálně spojené s dysfunkcí ubiquitin-proteazomového systému (UPS)

Typ choroby	UPS dysfunkce
Alzheimerova choroba	Zablokování funkce proteazomu abnormálními formami Ub
Huntingtonova choroba	Zablokování funkce proteazomu proteiny, které obsahují expandované oblasti polyglutaminu
Familiální Parkinsonova choroba	<ol style="list-style-type: none">1. Mutace vedoucí k ztrátě funkce ubiquitin ligázy E32. Mutace vedoucí k ztrátě funkce ubiquitin C-koncové hydrolázy

ALZHEIMEROVA CHOROBA

- v mozku pacientů byla zaznamenána exprese mutantní formy ubiquitinu UB1 (pozměněný C-konec)
- absence glycinu znemožňuje normální připojení UB1 k substrátu prostřednictvím E3
- UB1 může být podroben normální ubiquitinaci proteinem Ub wt: vznikají formy UB1 nesoucí polyUb, které nepředstavují optimální substráty pro deubiquitinační enzymy: inhibice proteazomu 26S, akumulace UB1 v mozku pacientů

HUNTINGTONOVA CHOROBA

- důsledek expanze CAG (kodón kódující glutamin)
- proteiny obsahující abnormálně dlouhý polyglutaminový úsek jsou náchylné k agregacím
- Např. expanze CAG v genu kódujícím ataxin-1:
 - tvorba agregátů ataxinu 1 – i když mohou být normálně označeny UB, jejich degradace proteazomem je významně snížena - usmrcení neuronů

PARKINSONOVA CHOROBA

- neurony v mozku pacientů často obsahují inkluzní – tzv. Lewyho tělíska
- Lewyho tělíska obsahují agregáty proteinu α -synuclein
- α -synuclein má zřejmě nějakou funkci v synaptických vezikulech
- příčinou akumulace α -synucleinu je zřejmě mutace v genu kódujícím E3 ubiquitin ligázu (tzv. Parkin), která zodpovídá za ubiquitinaci α -synuclein

Cystická fibróza (CF)

- gen CF kóduje transmembránový regulátor CFTR - kanálek pro chloridové ionty
- pouze malá frakce proteinu CFTR zraje a dostává se na buněčný povrch - většina je rozložena ubiquitinovým systémem
- nejčastější mutace genu CF, která doprovází cystickou fibrózu, nemění funkci proteinu CFTR, ale zvyšuje úroveň jeho degradace

Ubiquitinační dráha a buněčný cyklus

