

Received: 2009.12.28
Accepted: 2010.05.31
Published: 2010.07.27

Rola proteasomu w terapii chorób nieuleczalnych

The role of the proteasome for therapy of incurable diseases

Irena Bubko, Beata M. Gruber, Elżbieta L. Anuszewska

Narodowy Instytut Leków w Warszawie, Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków

Streszczenie

Białka są podstawowym elementem budulcowym organizmu człowieka. Słowo białko (proteina) pochodzi od greckiego słowa *proteo*, tzn. najważniejszy. Białka, bez których życie w postaci obserwowanej na Ziemi nie byłoby możliwe, mają ograniczony czas życia w komórce i organizmie. Ich tak zwany „okres półtrwania” jest zróżnicowany i wynosi od kilku minut do kilku dni. Białka regulatorowe pojawiają się w komórce na określony czas, są krótko żyjące. Białka zaangażowane w podstawy funkcjonowania komórki są stabilne i długo żyjące. Po spełnieniu swoich funkcji lub w przypadku nadmiaru, czy uszkodzenia, białka są eliminowane z komórki, w procesach określanych jako degradacja białek. Procesy przemian białek są ściśle kontrolowane. Istnieje też ścisła korelacja między metabolizmem białek a energetycznym stanem komórki.

Główne systemy proteolityczne w komórce to lizosomalny i proteasomalny. Pierwszy, lizosomy – organelle komórkowe, funkcjonują w sposób prosty i przejrzysty. Drugi, proteasomy, to system wysoce zorganizowany, który za pomocą ubikwityny dostarcza „etykiety molekularną” i kieruje oznakowane białko w proces degradacji.

Sprawną degradację białek komórkowych przez szlak UPS (ubikwityna-proteasom) jest istotna dla transdukcji sygnału, regulacji transkrypcji, odpowiedzi na stres oraz kontroli czynności receptorów.

Dysfunkcja szlaku UPS odgrywa rolę w rozwoju wielu chorób: nowotworowych, neurodegeneracyjnych, o podłożu immunologicznym i infekcyjnych. Wyzwaniem zatem staje się opracowanie metod farmakologicznej interwencji w funkcjonowanie tego układu, polegających m.in. na zastosowaniu swoistych, niskocząsteczkowych inhibitorów proteasomu i enzymów katalizujących ubikwitynację.

W pracy omówiono aktualną wiedzę, poczynając od odkrycia lizosomów – szlaku degradacji białek niezależnego od ubikwityny, następnie proteasomów – szlaku zależnego od ubikwityny i zjawiska agregacji białek oraz podsumowanie dotyczące stosowanych terapii, wykorzystujących jako podstawę procesy degradacji białek.

Słowa kluczowe:

degradacja białka • lizosom • proteasom • UPS • nowotwory • choroba Huntingtona

Summary

Proteins constitute the basic building elements of living organisms. Proteins have a limited lifetime in a cell. The so called “half-life period” of proteins is diverse and lasts from several minutes to several days. Regulatory proteins appear in a cell for a definite time and are short-lived. The proteins responsible for basic cell functions are stable and long-lived. Once their functions are fulfilled or because of their surfeit or damage, proteins are eliminated by degradation. Transformation processes of proteins are precisely controlled. There is also a strict association

between protein metabolism and the energetic state of a cell. The main proteolytic cell systems are lysosomal and proteasome ones. The first (lysosomes) function in a simple and transparent way. The second system (proteasomes) is highly organized; by using ubiquitin it delivers “molecular label” and sends a marked protein for degradation. Efficient degradation of cellular proteins by the UPS route (ubiquitin – proteasome system) is essential for signal transduction, transcription adjustment, response to stress and control of receptors’ activity. The dysfunction of the UPS route is crucial in the development of tumors, neurodegenerative diseases and diseases of immunological and infectious origin. Therefore, it is a challenge to elaborate methods of pharmacological intervention within this system involving, for example, the use of specific, low molecular-weight proteasome inhibitors and enzymes catalyzing the ubiquitination process. The article presents a review of advances in the field, including description of the lysosomal protein degradation route, proteasome model, and the phenomenon of protein aggregation. The summary of the experience on applied therapies, which use the processes of protein degradation as a basis, were also presented.

Key words: degradation of protein • lysosome • proteasome • UPS • cancers • Huntington’s disease

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=915316>

Word count: 5970

Tables: –

Figures: 3

References: 49

Adres autorki: dr n. biol. Irena Bubko, Narodowy Instytut Leków, Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa; e-mail: ibub@il.waw.pl

WSTĘP

Nieraz zadawano sobie pytanie, jakie procesy muszą zachodzić w naszej komórce, gdzie codziennie usuwanych jest 3–5% białek w organizmie zdrowym, nie wspominając o stanach patologicznych, w których ta liczba proporcjonalnie wzrasta [8].

Długotrwałe poszukiwania, prowadzone na całym świecie przyniosły w dużej części wyjaśnienie mechanizmów degradacji białek w komórce. Chrystian de Duve opisał mechanizm usuwania zbędnych w komórce białek za pomocą lizosomów, inna grupa badaczy odkryła, że w komórce istnieje również szlak pozalizosomalny związany z ubikwityną [7,8]. Odkrycie mechanizmu ubikwitynacji białek zapoczątkowało nową erę w zrozumieniu cyklu komórkowego, podziału komórek, roli regulacyjnej czynników transkrypcyjnych oraz mechanizmu kontroli wszystkich procesów zachodzących w komórce. Patogeneza wielu chorób, takich jak nowotwory, czy choroby neurodegeneracyjne, jest związana z utratą kontroli i wynikającymi z niej trudnościami w utrzymaniu homeostazy między biosyntezą a degradacją poszczególnych elementów komórki. Opisanie szlaku ubikwityno-proteasomalnego (UPS) jako precyzyjnego kompleksu o złożonej strukturze i nie mniej skomplikowanym mechanizmie działania, pozwoliło zaprezentować go jako zintegrowaną platformę, która staje się celem terapeutycznym ostatnich lat w walce z licznymi chorobami.

LIZOSOMY

W 1955 r. Chrystian de Duve odkrył lizosomy – wewnątrzkomórkowe organelle – struktury w postaci pęcherzyków zawierających proteazy. Wówczas przedstawiono dwa typy

proteolizy – endocytozę i pinocytozę, zachodzące w komórce. Później wykazano, że tych typów jest więcej [8,48].

W świetle ostatnich danych literaturowych, lizosomy usuwają białka zewnętrzne za pośrednictwem endocytozy, pinocytozy i fagocytozy, zaś trawienie wewnątrzkomórkowych białek odbywa się w wyniku autofagii [7]. W obrębie autofagii wyróżnia się makroautofagię, mikroautofagię, autofagię swoistą i autofagię zależną od chaperonów [36].

W procesie makroautofagii tworzy się autofagosom, który za pomocą błony zwanej fagofor oddziela zdrową część komórki od części eliminowanej. Proces ten jest zależny od aktywności GTP-az (enzymów rozkładających guanozynotrifosforan). Fuzja autofagosomu i lizosomu prowadzi do powstania autolizosomu. Mikroautofagia to podobny proces, ale odbywający się w komórce na mniejszą skalę. Autofagia swoista (peksografia) – to proces zachodzący w peroksysomach [36]. Natomiast autofagii zależnej od chaperonów podlegają tylko wybrane białka komórkowe, które są rozpoznawane przez białka szoku cieplnego (heat shock proteins – HSP), należące do grupy tzw. białek opiekuńczych (chaperonów). Po związaniu się kompleksu HSP i nieprawidłowego białka z receptorem błonowym lizosomu, kompleks ten jest przemieszczany do światła lizosomu, gdzie następnie ulega rozkładowi przez znajdujące się tam enzymy. Degradacja białek w wyniku autofagii stanowi jeden z mechanizmów eliminacji, m.in. alfa-synukleiny [11].

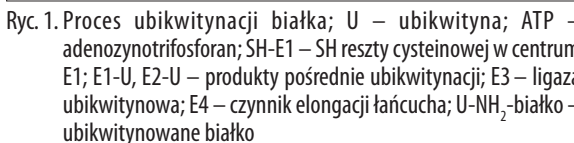
Wyodrębniono kilka postaci lizosomów: początkowe lizosomy, w których nie zachodzi jeszcze proces trawienia; wczesne autofagalne pęcherzyki, które zawierają wewnątrzkomórkowe białka; późne (pośrednie) endosomy i fagocyty, zawierające elementy białkowe i wreszcie – struktury

Za potwierdzeniem istnienia szlaku pozalizosomalnego przemawiają wyniki doświadczeń z zastosowaniem inhibitorów lizosomów, w których obserwowano zahamowanie degradacji długo żyjących białek, jednak pozostawało to bez większego wpływu na degradację krótko żyjących i zmutowanych białek [8]. Jak podaje Wilkinson [47] na początku lat osiemdziesiątych ub.w. I. Rose, A. Herszko i A. Ciechanover opublikowali dwa artykuły w PNAS, donoszące o energozależnej proteolizie białek, zachodzącej po procesie ubikwitinacji z udziałem proteasomów.

W końcu lat siedemdziesiątych i początku osiemdziesiątych ub.w., wykazano, że w lisatach z retikulocytów zachodzi zależna od ATP proteoliza białek, w której uczestniczy termostabilne białko nazwane początkowo APF-1 (ATP-dependent proteolytic factor 1), które następnie okazało się identyczne z odkrytą kilka lat wcześniej ubikwitiną [17].

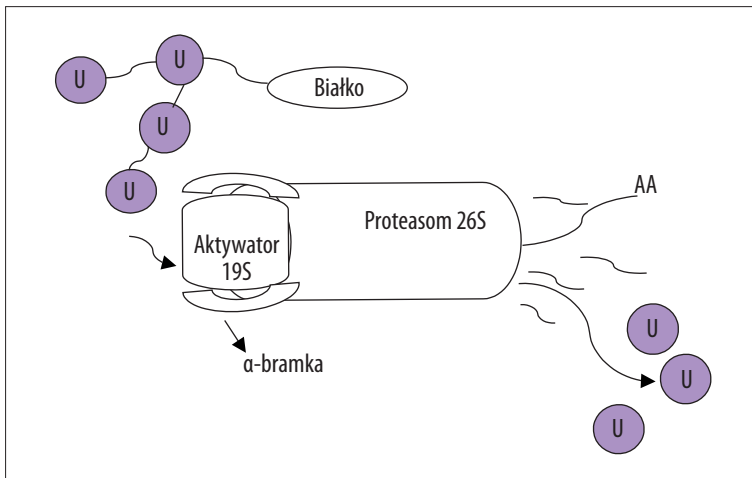
Proces ubikwitynacji u Eukaryota jest uniwersalnym systemem „oznakowania” białek przeznaczonych do degradacji. „Oznakowanie” białka ukierunkowuje je na proces proteolizy. Ubikwitynowane białka szybko ulegają degradacji przez proteazy pozalizosomalne w strukturach cytoplazmatycznych proteasomami. W ten sposób degradowane są w cytoplazmie białka nieprawidłowo zszytyzowane, źle rozmieszczone w strukturach subkomórkowych lub starzejące się [39]. Proces ubikwitynacji jest procesem wieloetapowym, wymagającym aktywności wielu enzymów i energii pochodzącej z ATP. Białko naznaczone ubikwityną nie ma szans na przeżycie, musi zostać zdegradowane.

W pierwszym etapie działa enzym E1, tzw. enzym aktywujący ubikwitynę (ubiquitin activating enzyme, E1 – UBA).



Wówczas przy współudziale ATP w reakcji transestryfikacji zostaje utworzone wysokoenergetyczne wiązanie między glicyną na C-końcu ubikwityny a grupą –SH reszty cysteiny w centrum E1 i powstaje produkt pośredni E1-U.

Działanie ligazy ubikwitinowej doprowadza do powstania wiązania izopeptydowego między aktywowanym C-końcem ubikwityny i $\epsilon\text{-NH}_2$ jednej z reszt białynowych obecnych w białku. Proces powtarza się aż białko zostanie naznaczone połączonymi w łańcuchach cząsteczkami ubikwityny.



Ryc. 2. Proces degradacji białka w proteasomie;
U – ubiquityna; AA – aminokwasy

Jeśli ubiquitynacja następuje przez Lys-48, a także niekiedy Lys-29, to pociąga za sobą skierowanie białek do proteasomu 26S. Wiadomo, że łańcuch przeznaczony do degradacji proteasomalnej musi się składać z co najmniej 4 reszt ubiquityny [5]. Pewne substraty wymagają do swej poliubikwitynacji współdziałania także czynnika elongacji łańcucha (E4).

Monoubikwitynacja białek lub modyfikacja przez białka ubikwitynopodobne skierowuje je do różnych kompartmentów komórkowych, w tym także do lizosomów, w których mogą być degradowane [17,32].

Proces ubiquitynacji jest regulowany przez enzymy deubikwitynujące (DUB). Enzymy te mają zdolność hydrolizy łańcuchów ubiquityny tworzonych przez kaskadę enzymatyczną E1-E2-E3 zarówno uwolnionych z substratów rozłożonych przez proteasomy, jak i związanych z niezdegradowanymi białkami. W tym drugim przypadku, DUB mogą chronić substrat przed hydrolizą proteasomalną, mogą też skracać łańcuchy poliubikwitynowe połączone z częściami substratu [5]. Ubikwityna kierowana jest w ten sposób do wtórnego obiegu znakowania następnego białka [39].

Ubikwityna pełni w komórce także inne funkcje, niezwiązane ze szlakiem proteasomalnym, np. odgrywa rolę w regulacji procesów transkrypcyjnych, kierowaniu białek z błony komórkowej do kompartmentu endosomalnego, przemieszczaniu białek z endosomów do ciałek wielopęcherzykowych [5,34].

Pośredni udział ubiquityny w regulacji transkrypcji wydaje się oczywisty, jeśli uwzględnimy jej wpływ na stabilność białek biorących udział w tym złożonym procesie. Transkrypcja genów zachodzi w obrębie aktywnej euchromatyny, na stan której mają wpływ histony. Histon 2A był pierwszym opisanym ubikwitynowanym białkiem. Obecnie wiadomo, że także histony H2B, H1 podlegają ubiquitynacji i obecne są w aktywnych transkrypcyjnie regionach chromatyny. Ubikwitynacja może zmieniać strukturę histonów i ich wzajemne oddziaływanie, a także oddziaływanie z DNA i jest niezbędna do powstawania „rozluźnionej” struktury chromatyny, koniecznej do odsłonięcia rejonów promotorowych genów. Może także ułatwiać następczą metylację histonów i wpływać na wyciszenie genów [17,34].

Docenianie ubiquityny, jako jednego z istotnych regulatorów coraz większej liczby procesów komórkowych, rozpoczęło się ponad 20 lat temu. Okres ten przyniósł wiele odkryć, pozwalających na docenienie znaczenia procesu ubiquitynacji, chociaż wiele zagadnień z tym związanych wymaga dalszych badań. Zbyt mało też jeszcze wiadomo o procesach deubikwitynacji białek, czy też o działaniu białek pokrewnych ubiquitynie. Niemniej jednak wydaje się już niemal pewne, że ubiquitynacja stanowi równie ważną modyfikację białek, tak jak ich fosforylacja, czy metylacja [17].

PROTEASOM

W 2004 roku doceniono wieloletnie badania i uhonorowano Nagrodą Nobla z dziedziny chemii trzech badaczy Avrama Herszko i Aarona Ciechanovera z Izraela oraz Irwina Rose z USA – za odkrycie ubiquityno-proteasomalnej degradacji białek, procesu ściśle regulowanego i swoistego w stosunku do białkowego substratu, jego lokalizacji komórkowej i momentu, w którym ma nastąpić degradacja [5,17].

Proteasomy oczyszczono po raz pierwszy w 1980 roku z wołowych przysadek mózgowych. Są to złożone kompleksy białkowe o stałej sedymentacji. Ze względu na to, iż proteasomy w obrębie jednego kompleksu wykazują różne aktywności enzymatyczne, początkowo nazwano je wielokatalicznymi kompleksami proteaz MPC (multicatalytic proteinase complex). Nazwę proteasom zaproponowano w 1988 roku [5].

Proteasomy eukariotyczne występują w 2 podstawowych postaciach: 20S i 26S. Proteasom 20S nie jest zdolny do proteolizy ubikwitynowanych białek komórkowych i nie wykazuje aktywności ATP-azowej. Proteasom 26S ma zdolność hydrolizy białek połączonych z łańcuchami ubiquityny [5], a centrum aktywności ATP-azowej znajduje się w podstawie aktywatora kompleksu.

Proteasom 26S (1500–2000 kDa) składa się z rdzeniowego kompleksu katalicznego 20S około 700 kDa (core particle – CP) i kompleksu regulatorowego 19S (regulatory particle – RP, activator PA700) [5,24].

Proteasom 20S jest zbudowany z 4 pierścieni, które tworzą strukturę cylindryczną. Każdy pierścień składa się z 7

różnych podjednostek, których masa cząsteczkowa waha się między 20 i 35 kDa. Zewnętrzne pierścienie są zbudowane z 7 podjednostek α ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) każdy, a dwa pierścienie wewnętrzne – z 7 różnych podjednostek β ($\beta 1$ - $\beta 7$). Rolę w utrzymaniu połączenia między pierścieniami β odgrywa podjednostka $\beta 7$. U drożdży oddziaływanie między COOH-końcowym fragmentem tej podjednostki a podjednostkami $\beta 1$ i $\beta 2$ z przeciwległego pierścienia β wpływa na stabilizację proteasomu. NH_2 -końcowe fragmenty łańcuchów podjednostek α zamykają kanał wiodący do wnętrza proteasomu (α -bramka). Do otwarcia kanału i aktywacji proteasomu może dojść wskutek połączenia z aktywatorem lub chemicznie, np. pod wpływem SDS [5,24,46].

Proteasom 20S konformacyjnie jest strukturą elastyczną. Aktywne miejsca katalityczne są umiejscowione na wewnętrznej powierzchni cylindra, do której są wiązane substraty białkowe. Wszystkie podjednostki α i większość β są nieaktywne enzymatycznie, oprócz podjednostek $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 5$, które mają centra aktywne. Różnią się one między sobą wrażliwością na inhibitory i pH optymalnym dla swej aktywności. W komórcie większość wśród proteasomów stanowi postać 20S.

W badaniach *in vitro* wyróżniono 3 podstawowe aktywności proteasomu 20S: chymotrypsynopodobną ($\beta 5$), trypsynopodobną ($\beta 2$) i kaspazopodobną ($\beta 1$).

Proteasom nie jest zgrupowaniem niezależnych od siebie podjednostek, tylko funkcjonalną całością, w której na podjednostki katalityczne oddziałują podjednostki sąsiadujące. U drożdży COOH-końcowy fragment podjednostki $\beta 7$, tworzący kilka wiązań wodorowych z podjednostką $\beta 1$, poprzez stabilizację centrum aktywnego podjednostki $\beta 1$, jest konieczny dla aktywności kaspazopodobnej. Jedynie podjednostka $\beta 5$ proteasomu może występować jako wolna [5].

Proteasom 26S powstaje przez połączenie proteasomu 20S z kompleksem aktywatora PA700 (19S) (ryc. 2). Białka znakowane ubikwityną są rozpoznawane przez kompleks regulatorowy 19S, w związku z czym pełni on dwójaką rolę – rozpoznaje ubikwitynowane białko, ale także otwiera kanał do cylindra proteasomu 20S. Takie działanie wymaga energii ATP-azy o aktywności chaperonopodobnej u podstawy regulatora, ponieważ powinno nastąpić rozwinięcie substratu białkowego i wprowadzenie go do wewnętrznych przedziałów cylindra. Kanał wejściowy jest strzeżony przez bramkę molekularną, tj. N-końcowy fragment łańcucha podjednostki $\alpha 3$. Białka wchodzące do komory wewnętrznej ulegają hydrolizie w aktywnych miejscach proteolitycznych, w podjednostkach β na małe polipeptydy o długości 3–22 aminokwasów [24].

Aktywator PA700 (19S) składa się z podstawy (base) i wieczka (lid). W skład podstawy aktywatora wchodzi pierścień 6 ATP-az nazywanych Rpt (Rpt1-Rpt6) i 3 podjednostki niemające aktywności ATP-az (Rpn1, Rpn2, Rpn10). Podstawa ma aktywność ATP-azową, a wieczko wykazuje się jej brakiem i składa się z podjednostek: Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12, UCH37. Białko enzymatyczne UCH37 – hydrolaza C-końca ubikwityny (ubiquitin C-terminal hydrolase) – tworzy kompleks z podjednostką Rpn12. UCH37 jest integralnym składnikiem PA700 u ssaków i *Drosophila*, natomiast nie stwierdza się tej podjednostki u drożdży [5].

Podjednostki podstawy pełnią różnorodne funkcje. Podjednostki Rpt biorą udział w wiązaniu i rozwijaniu substratów białkowych. Rpn10 wiąże ubikwitynowany substrat poprzez domenę UIM (ubiquitin-interacting motif). Rpt 2 bierze udział w otwarciu kanału proteasomu 20S zamkniętego NH_2 -końcem łańcuchów podjednostek α . Podjednostka Rpt 2 uczestniczy w procesie przemieszczania substratu do cylindra proteasomu i uwalnianiu z niego produktów. Rpn4 i Rpn6 są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania proteasomu 26S [5].

W literaturze spotyka się doniesienia o istnieniu immunoproteasomów.

Interferon γ (IFN- γ) indukuje w komórkach syntezę podjednostek proteasomalnych oraz podjednostek aktywatora PA28 (11S) o składzie podjednostek $\alpha 3\beta 4$. Aktywator ten pełni podobną aktywującą rolę, z tym że aktywuje hydrolizę peptydów, a nie białek [5].

ZNACZENIE SZLAKU UBIKWITYNO-PROTEASOMALNEGO

Sprawną degradacja białek komórkowych przez szlak ubikwityna-proteasom jest istotna dla transdukcji sygnału, regulacji transkrypcji, odpowiedzi na stres oraz kontroli czynności receptorów. Szlak ten kontroluje aktywację czynnika jądrowego NF- κ B przez degradację jego inhibitora. Proteasom odgrywa również ważną rolę w prezentacji antygenów. Zaburzenia funkcjonalne układu UPS naruszają równowagę między białkami regulatorowymi, co wywołuje zablokowanie cyklu komórkowego w fazie G1-S i G2-M oraz apoptozę [24].

W większości białek, które są degradowane na szlaku UPS charakteryzują się obecnością na N-końcu cząsteczki tzw. degnonów, czyli określonych sekwencji aminokwasowych pełniących funkcje destabilizujące i zawierających reszty lizynowe, do których jest dołączany łańcuch poliubikwitynowy (ryc. 2) [7].

Do precyzyjnego rozpoznawania białkowych substratów przez enzymy ubikwitynowe przyczyniają się też liczne modyfikacje potranslacyjne, z których najczęściej opisywane są fosforylacja i hydroksylacja określonych reszt aminokwasowych. Ułatwiają one lub często są wręcz niezbędne do rozpoznawania białek przez odpowiednie ligazy [7].

Degradacji przez szlak UPS ulegają zarówno białka regulatorowe, jak i supresory nowotworowe [24].

Deregulacja układu UPS prowadzi do wielu schorzeń. Warto podkreślić, że dysfunkcja proteasomu może mieć dwie postaci: następuje drastyczny wzrost aktywności lub jej zmniejszenie. Lista chorób związana z utratą prawidłowego funkcjonowania proteasomu zawiera różne choroby, niektóre z nich są dziedziczne, a inne nabyte. W poszczególnych przypadkach są związane bezpośrednio lub pośrednio z zaburzeniami układu UPS. Dotyczy to głównie schorzeń nowotworowych, w których obserwuje się wzrost aktywności proteasomu, takich jak: rak płuc, okrężnicy, jajnika, nerki, czy białaczka mieloblastyczna [40].

Wśród chorób neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniami układu UPS, wymienia się choroby Alzheimer'a,

Parkinsona, Huntingtona, prionowe, a także ataksje rdzeniowo-mózdzkowe. Osłabienie funkcjonalności UPS obserwuje się również w zakażeniach wirusami HIV, HBV, a także chorobie Wilsona, anemii Fanconiego i innych [40].

Zaburzenia szlaku UPS odgrywają ważną rolę w rozwoju nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych, o podłożu immunologicznym i infekcyjnym. Wyzwaniem zatem staje się opracowanie metod farmakologicznej interwencji w funkcjonowanie tego układu, m.in. polegających na zastosowaniu swoistych, niskocząsteczkowych inhibitorów proteasomu i enzymów katalizujących ubikwitinację. Myśli się również o precyzyjnym kierowaniu wybranych białek na drogę proteolizy z użyciem syntetycznych chimerycznych białek adaptorowych [7,24].

UPS A AGREGACJA BIAŁEK

Zaburzenia homeostazy białek komórkowych, prowadzące do ich agregacji, stanowią wspólne ogniwo w patomechanizmie wielu chorób neurodegeneracyjnych. Główną przyczyną tego zjawiska są liczne mutacje w genach lub nieprawidłowości występujące w potranslacyjnych modyfikacjach białek. Zaburzenia struktury przestrzennej białka mogą też wystąpić pod wpływem różnych czynników uszkadzających komórkę, takich jak np. stany niedokrwienia oraz stany zapalne i urazy [11].

Agregacja nieprawidłowo pofałdowanych lub uszkodzonych białek jest istotnym zjawiskiem odgrywającym rolę w mechanizmach neurodegeneracyjnych. Sama akumulacja patologicznych białek w komórce nie wyjaśnia jeszcze mechanizmu ich agregacji. Białka o nieprawidłowej strukturze przestrzennej charakteryzują się obecnością dużej liczby struktur typu β o silnie hydrofobowych właściwościach. Częstotki o takiej budowie przestrzennej mają tendencję do autoagregacji. Powstanie nierozpuszczalnych makromolekuł białkowych zachodzi w sposób uporządkowany w wyniku zarodkowania (nukleacji), której przebieg jest podobny do procesu krystalizacji. Czynnik wyzwalający zarodkowanie nie został jeszcze poznany. Zarodkowanie rozpoczyna się od wytworzenia jądra agregacji zbudowanego z oligomerów białkowych, wokół którego agregują monomery peptydowe. W ten sposób tworzą się początkowo małe struktury włóknkowe, tzw. protowłóknka (protofilamenty), a potem większe filamenty. Zarodkowanie i agregacja są procesami energochłonnymi, niekorzystnymi z punktu widzenia kinetyki komórki. Dlatego zachodzą one bardzo powoli, co może wyjaśniać pojawienie się objawów niektórych chorób dopiero w średnim i starszym wieku [11,37].

W ciągu ostatnich lat pojawiło się wiele prac, w których wykazano, że za zwyrodnienie komórek nie są odpowiedzialne same złoże, lecz pośrednie formy strukturalne powstające podczas stopniowo przebiegającego procesu agregacji białek. Duże złoże białkowe są prawdopodobnie nieaktywne lub odgrywają rolę cytoprotekcyjną, zapobiegając poprzez izolację nieprawidłowych białek ich interakcji z innymi składnikami komórki. Neurotoksyczny wpływ na komórkę mogą natomiast wywierać protowłóknka i rozpuszczalne oligomery białkowe. Mogą one wpływać na funkcje kanałów jonowych i powodować wzrost przepuszczalności błon komórkowych, jak to prawdopodobnie się dzieje w chorobie Parkinsona i Huntingtona lub też oddziaływać na inne

struktury komórki i wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, zaburzając przepływ informacji. Przykładem tego ostatniego zaburzenia jest zahamowanie aktywności transkrypcji przez zmutowaną huntingtinę [11,37].

Zbyt mała wydajność ubikwitynozależnych mechanizmów eliminujących może odgrywać istotną rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, w których stwierdza się odkładanie agregatów białkowych. Prowadzi to do akumulacji patologicznych białek, dysfunkcji komórki, a następnie jej śmierci. Ze względu na to, że zarówno do ubikwitinacji białka, jak i do jego degradacji w proteasomach potrzebna jest energia magazynowana w ATP, istnieje potencjalna możliwość, że odkładanie się agregatów białkowych może być spowodowane spadkiem syntezy ATP na skutek defektu mitochondrialnych łańcuchów oddechowych [11,44].

MODULACJA FUNKCJI PROTEASOMU

Czynniki regulatorowe zaangażowane w modulację aktywności proteasomu sklasyfikowano w poszczególne grupy, przede wszystkim są to aktywatory i inhibitory. Huang i Chen [20] donoszą o 3 typach komórkowych aktywatorów: PA 28, PA 200, PA 700. Autorzy wspominają również o kwasach: linolenowym, linolowym, betulinowym. W obrębie inhibitorów rozróżnia się 2 grupy: niskocząsteczkowe związki pochodzące z syntezy chemicznej oraz inhibitory pochodzenia naturalnego, takie jak tyropeptin A, TMC-86, TMC-89, TMC-95A, PR-171 [20].

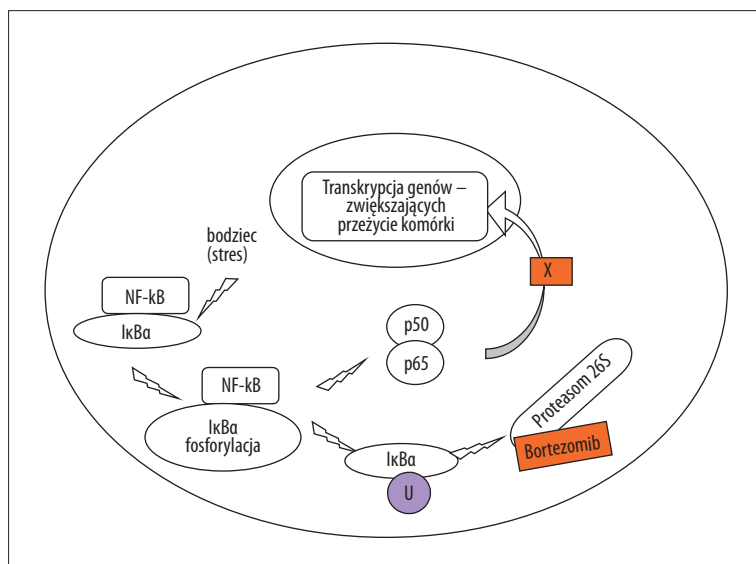
W celu opracowania kontrolowanego zahamowania aktywności proteasomu, podjęto wiele prób syntezy związków chemicznych o spodziewanym działaniu w tym kierunku.

Najczęściej stosowane *in vitro* grupy inhibitorów to aldehydowe formy peptydów (np. PSI, MG132, MG115, CEP-1612), epoksyketony (np. epoksomycyna, eponemycyna) oraz laktacystyna i jej pochodne (np. PS-519). Inhibitory te w komórkach wielu linii nowotworowych powodują zahamowanie cyklu komórkowego i apoptozę [40].

Jak podaje Jurczyszyn i wsp. [24] laktacystyna (nieodwracalny inhibitor podjednostki β) indukuje apoptozę w ludzkich komórkach monoblastycznych U937, natomiast Shinohara i wsp. odnotowali, że benzylooksykarbonylo-(Z)-Leu-Leu-leucynal – tripeptydo-aldehyd – inhibitor proteasomu, indukuje w komórkach białaczkowych apoptozę zależną od białka p53. Podobne badania dostarczyły dowodów na to, że proteasom jest ważnym celem w terapii przeciwnowotworowej, jednak dostępnym inhibitorem brakuje swoistości.

Zaprojektowano i stworzono kilka związków będących pochodnymi kwasu boronowego. Większość z tych inhibitorów proteasomu wykazała aktywność w obrębie panelu 60 nowotworowych linii komórkowych zgromadzonych w Narodowym Instytucie Raka (NCI) w USA. Na podstawie swoistości działania oraz efektu cytotoksycznego wybrano bortezomib jako najlepszy związek do dalszych badań klinicznych [5,24].

Bortezomib (kwas N-pyrazynokarbonylo-L-fenylalanino-L-leucyno-boronowy; inne nazwy PS-341, MLN-341, dipeptyd kwasu boronowego), jest unikatowym i swoistym



Ryc. 3. Regulacja proteasomu przez inhibitor bortezomib; NF-κB – czynnik transkrypcyjny; IκBα – inhibitor NF-κB; p50/p65 – heterodimer czynnika transkrypcyjnego NF-κB; U – ubikwityna

inhibitorem szlaku UPS. Hamuje proteasom szybko i w sposób odwracalny przez bezpośrednie wiązanie do kompleksu 26S i blokowanie aktywności enzymatycznej. Jest pierwszym inhibitorem proteasomu, stosowanym w praktyce klinicznej. Aktywność bortezomibu wykazano w wielu typach nowotworów, co podnosi jego wartość terapeutyczną. Dlatego też lek z tą substancją czynną został zarejestrowany w ciągu zaledwie kilku miesięcy, w 2003 r. jednocześnie we wszystkich krajach UE, ze wskazaniami do leczenia opornego szpiczaka mnogiego (MM).

Bortezomib w terapii przeciwnowotworowej działa poprzez indukcję apoptozy, będącej następstwem zahamowania proteasomu (ryc. 3). Leżące u podłoża wywołanej apoptozy mechanizmy, obejmują inhibicję NF-κB wiążącą się ze zwiększeniem aktywności szlaków apoptotycznych oraz oddziaływaniem na mikrośrodowisko nowotworu. Oprócz indukcji apoptozy bortezomib zmniejsza ekspresję insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 i receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu 1. Hamuje również indukowaną przez IL-6 aktywację szlaku Ras/Raf/MAPK, co prowadzi do zahamowania wzrostu komórek szpiczaka mnogiego [24,41].

Rodzina białek Rel/NF-κB to indukowalne dimeryczne czynniki transkrypcyjne rozpoznające i wiążące wspólny motyw sekwencji w jądrowym DNA. NF-κB – główny czynnik transkrypcyjny z tej rodziny, jest heterodimerem p50/RelA (p50/p65) obecnym w cytoplazmie prawie wszystkich komórek. Sekwencja κB znajduje się w obrębie genów, wśród których można wyróżnić następujące kategorie:

- 1) geny istotne dla procesów odpowiedzi immunologicznej i procesów zapalnych;
- 2) geny istotne dla procesów apoptozy i proliferacji komórek;
- 3) geny regulujące aktywność NF-κB, aktywowane za pośrednictwem sprzężenia zwrotnego [16].

W cytoplazmie NF-κB jest połączony z podjednostką inhibitorową IκBα i stanowi postać nieaktywną. W wyniku działania bodźca stresującego, aktywacji ulegają kaskady sygnałowe prowadzące do aktywacji kinaz IKK i następuje

fosforylacja IκBα [24]. Fosforylacji ulegają dwie reszty serynowe IκBα w N-końcowej domenie – Ser-32 i Ser-36. Ufosforylowane miejsca w IκBα są następnie rozpoznawane przez ligazę ubikwityny SCF, co prowadzi do ubikwitynacji, a następnie degradacji inhibitora z udziałem proteasomu 26S i uwolnienia podjednostek p50 i p65 czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Odłączenie IκBα powoduje odsłonięcie sekwencji NLS i translokację podjednostek do jądra komórkowego, gdzie wiążą się ze swoistym miejscem w cząsteczce DNA o wielkości 10 par zasad, regulując transkrypcję genów [24,41].

Bortezomib hamuje aktywność NF-κB w komórkach przez blokowanie degradacji IκBα. Inhibicja aktywności transkrypcyjnej NF-κB odgrywa korzystną rolę w etiologii nowotworów przez zmniejszenie ekspresji różnych czynników wzrostu, przeżycia i angiogenezy. Następuje uwalnianie cytochromu c, aktywacja kaspazy 9 i apoptoza [24].

Bezpieczeństwo i skuteczność bortezomibu w leczeniu opornego szpiczaka mnogiego (MM) oceniano na podstawie badań klinicznych II fazy: badania CREST i badania SUMMIT. Wyniki osiągnięte w obu badaniach były porównywalne. Badanie SUMMIT przeprowadzono w grupie 202 pacjentów z 14 ośrodków USA, uczestniczących wcześniej w co najmniej 2 programach leczenia oraz w grupie chorych, u których mimo leczenia obserwowano postęp choroby. Chorem podawano bortezomib w dawce 1,3 mg/m² powierzchni ciała, 2 razy w tygodniu przez 2 tygodnie. Leczenie powtarzano po tygodniowej przerwie, łącznie do 8 cykli. Odpowiedź na leczenie polegająca na cofaniu się objawów choroby wynosiła 35%, przy czym u 10% chorych osiągnięto pełną remisję. Całkowita odpowiedź na leczenie (remisje kliniczne + stabilizacja procesu nowotworowego) wynosiła 59%. Mediana czasu do wystąpienia odpowiedzi na leczenie wynosiła 38 dni. Mediana czasu trwania odpowiedzi na bortezomib wyniosła 12 miesięcy [15].

Podjęto również próby terapii skojarzonej. We wstępnych doniesieniach dotyczących połączenia bortezomibu z melfalanem w MM obserwowano synergizm działania obu leków przy jednoczesnym korzystnym zmniejszeniu dawki każdego z nich.

Wstępne wyniki sugerują, że połączenie bortezomibu z pegylowaną doksorubicyną również zasługuje na dalsze badania ze względu na obserwowane współdziałanie obu związków [24].

Obecnie trwają badania kliniczne fazy II bortezomibu w połączeniu, m.in. z gemcytabiną, docetakselem i irynotekaniem [24]. Subhankar Paul [40] wykazał, że połączenie bortezomibu z epoksomycyną wpłynęło na nasilenie apoptozy w komórkach białaczkowych AML (acute myeloid leukemia).

Osiągnięcia w zwalczaniu szpiczaka mnogiego za pomocą bortezomibu są niewątpliwie punktem odniesienia do opracowania nowych terapii przeciwnowotworowych. Kilkuletnie badania naukowe pozwoliły wyselekcjonować związek, który wykazał skuteczność. Współczesne poszukiwania synergizmu działania trwają i są skierowane w stronę innowacji, które pozwoliłyby stworzyć bardziej swoisty i bezpieczny lek. To, że mechanizm inhibicji proteasomalnej jest rzetelnie opisany, pomaga w sposób przejrzysty obserwować rozwój badań naukowych. Bortezomib daje dużą nadzieję na pokonanie lekooporności, występującej przy stosowaniu konwencjonalnej chemioterapii i zapewne może stanowić punkt wyjścia do rozwoju bardziej skutecznych strategii terapeutycznych.

Chociaż sukces kliniczny bortezomibu sprzyja stosowaniu go w praktyce, jednak towarzysząca mu toksyczność (bolesna neuropatia obwodowa, trombocytopenia) skłania do dalszych poszukiwań.

Jak dotąd, doniesienia naukowe sugerowały, że pierwszorzędną rolę w przebiegu degradacji białka odgrywa aktywność chymotrypsynopodobna proteasomu 26S. Kisselev i wsp. [25] zdecydowali się przebadать wszystkie trzy aktywności proteasomu 26S, mianowicie chymotrypsynopodobną (Ch), kaspazopodobną (K) i trypsynopodobną (T). W eksperymencie zastosowano kilka inhibitorów: bortezomib, epoksomycynę, β -lakton klasto-laktacystyny oraz związki NLVS i MG-262. Jako substratu użyto długo żyjących białek, których hydroliza przebiega liniowo, tj.: kazeiny, owoalbuminy, histonów, kalmoduliny.

Okazało się, że inaktywacja Ch aktywności hamuje degradację protein o 11–50%, inaktywacja K aktywności o 12–22%, a inaktywacja T aktywności o 3–35%.

Na podstawie wyników badacze stwierdzili, że wszystkie trzy aktywności biorą udział w degradacji białka. Eksperyment pozwolił też określić swoistość oddziaływania inhibitorów.

Stosowany już bortezomib w 70% hamuje Ch, w 20% aktywność K i w 10% hamuje T aktywność. Interesujące wyniki uzyskano w przypadku epoksomycyny, która redukowała o 85% Ch aktywność i o 28% hamowała T aktywność. Opracowany modyfikowany peptyd epoksomycyny oznaczony pierwotnie symbolem PR-171, a następnie określony jako karfilzomib stanowił przedmiot dalszych badań [10,29].

Skomplikowany mechanizm działania PR-171 opisali Demo i wsp. [10]. Inhibitor w swojej budowie zawiera epoksydowy keton, który stereoselektywnie reaguje z katalityczną

resztą treoniny, obecną w cząsteczce proteasomu i nieodwracalnie go blokuje. Badania krystalograficzne pokazują, że epoksomycyna tworzy podwójne kowalencyjne wiązanie między adduktem morfolinowym a proteasomem, co wymaga zbliżenia grup hydroksylowej i α -aminowej reszty treoniny. Ten unikatowy mechanizm zapewnia dużą swoistość inhibitora.

PR-171 aktualnie znajduje się w I fazie badań klinicznych jako potencjalny lek stosowany w terapii szpiczaka mnogiego (multiple myeloma, MM) i NHL (non-Hodgkin lymphoma).

Jak wykazały badania, po 2–5 dniach podawania karfilzomibu następowało obniżenie aktywności proteasomu o ponad 80%. Nie zanotowano, jak dotąd efektów wskazujących na toksyczność ostrą. Takie cechy, jak tolerancja, skuteczność i elastyczność dawki zdecydowały o skierowaniu tego inhibitora do badań klinicznych.

Autorzy przebadali proapoptotyczny wpływ karfilzomibu, stosując różne stężenia inhibitora i badając efekt apoptogenny w ludzkich komórkach szpiczaka mnogiego ANBL-6. Okazało się, że następował wzrost enzymów finalnej fazy apoptozy kaspaz 8, 9 i 3. Obserwowano też obniżenie transmembranowego potencjału mitochondrialnego i uwolnienie proapoptotycznych białek, takich jak cytochrom c i Smac/DIABLO. Oprócz tego nastąpiła aktywacja kinazy JNK. Jak wynika z przeprowadzonych badań, karfilzomib wykazuje synergiczne działanie z deksametazonem (dexamethasone, Dex).

Na uwagę zasługuje również inny inhibitor – salinosporamid A, zwany również marizomibem lub NPI-0052. Związek ten jest izolowany z bakterii *Salinispora tropica* i stanowi modyfikowaną pochodną laktacystyny [6,10]. Inhibitor ten hamuje nieodwracalnie aktywność proteasomu w ludzkich komórkach szpiczaka mnogiego (MM) *in vitro* i *in vivo*, jednak według innego mechanizmu niż bortezomib.

Fenomenem inhibitora jest to, że NPI-0052 indukuje apoptozę w komórkach MM wrażliwych i opornych na bortezomib. Badania sugerują, że NPI-0052 efektywniej niż bortezomib hamuje NF- κ B.

Mechanizm działania NPI-0052 jest związany z udziałem TNF w szlaku sygnałowym NF- κ B [1,42]. Wiadomo, że NPI-0052 blokuje TNF-zależną I κ B degradację, wstrzymuje translokację p65 do jądra i tym samym hamuje ekspresję genów zależnych od NF- κ B, w tym genów antyapoptotycznych. Zahamowanie aktywacji NF- κ B za pomocą NPI-0052 prowadzi do nagromadzenia ufosforylowanej postaci I κ B, jej ubikwitynacji i w konsekwencji do inhibicji aktywności proteasomu. Ostatnie badania sugerują, że aktywacja apoptozy za pośrednictwem NPI-0052 następuje przede wszystkim przez uwolnienie FADD-kaspazy 8.

Wykazano, że NPI-0052 hamuje też ekspresję białek, takich jak: cyklina D1, COX-2, c-myc, MMP-9, ICAM-1, VEGF.

Według ostatnich doniesień NPI-0052 wykazuje synergiczny efekt z talidomidem (thalidomide) i bortezomibem, co może być obiecujące w przyszłości w terapii szpiczaka mnogiego.

Niewątpliwie badania nad inhibitorami proteasomu, prowadzone z coraz większym zaangażowaniem zaowocują

nowymi odkryciami. Jest to płaszczyzna dla nowych wyzwań stawianych naukowcom. Dotychczasowe wyniki dobrze rokują w walce z nowotworami. Modułacja aktywności proteasomu stanowi cel strategiczny nowoczesnych terapii przeciwnowotworowych.

CHOROBA HUNTINGTONA

Choroba Huntingtona (Huntington's disease – HD) jest postępującą zwyrodnieniową chorobą OUN, której towarzyszą zaburzenia ruchowe, otępienie oraz zaburzenia psychiczne. Choroba jest rozpoznawana na podstawie testów genetycznych, badań neuroobrazowych oraz badań neuropsychiatrycznych.

Chorobę po raz pierwszy opisał w 1872 roku amerykański lekarz George Huntington. Jako cechę charakterystyczną wyróżnił występowanie ruchów płaśawiczych, które początkowo obejmują tylko ograniczone grupy mięśni, z czasem nasilają się i ogarniają wszystkie mięśnie szkieletowe. Chód staje się upośledzony, niezgrabny, mowa niewyraźna, pojawiają się problemy z połykaniem. W wariantcie młodzieńczym zaburzenia ruchowe występują w postaci sztywności z kinezą, a klasyczne ruchy płaśawicze są rzadkie. Szybko u tych pacjentów dochodzi do zespołu otępienia, występują także drgawki. W zaawansowanych stadiach choroby dochodzi do znacznego wyniszczenia organizmu, chorey traci zdolność słownego komunikowania się z otoczeniem, nie rozpoznaje członków rodziny, jest zubożona, niezdolna do samodzielnego funkcjonowania [12,28].

HD dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący, jest chorobą spowodowaną mutacją genu *HTT* umiejscowionego na krótkim ramieniu chromosomu 4 (4p. 16.3). Prawidłowy gen koduje białko huntingtynę (HTT). Defekt polega na patologicznym zwiększeniu liczby trójków aminokwasów – CAG powyżej 36 reszt (polyQ). Zwiększenie powtórzeń trójków CAG, umiejscowionych w eksonie 1 genu zmienia konformację huntingtyny przez wydłużenie poliglutaminowego segmentu blisko zakończenia NH_2 . Zmutowane białko zaburza wiele procesów komórkowych na poziomie molekularnym i biochemicznym, szczególnie określonych obszarów OUN, następuje obumieranie komórek nerwowych i w ich następstwie upośledzenie przekazywania sygnałów do komórek mięśniowych [27]. Częstość występowania HD w populacji ogólnej szacuje się 2–10/100000 przypadków [35].

Badania obrazowe struktur mózgu w HD ujawniają u większości pacjentów zmniejszoną wielkość jądra ogoniastego. Wzgórze oraz przyśrodkowe struktury skroniowe zmniejszają się, dochodzi również do wyraźnego zwyrodnienia istoty białej. Badania z użyciem znakowanej glukozy metodą PET wykazują zmniejszoną aktywność metaboliczną w jądrze ogoniastym. Zarówno korowy, jak i podkorowy spadek metabolizmu oraz zmniejszona perfuzja są uważane za objaw postępującej choroby [28]. W HD występuje około 30% zmniejszenie masy mózgu [2].

Mimo postępów w rozumieniu etiopatogenezy choroby, jak dotąd nie opracowano skutecznego przyczynowego leczenia. Istnieje sporo danych na temat objawowego leczenia zaburzeń występujących w przebiegu HD. Diagnostyka tego schorzenia opiera się na analizie genetycznej DNA, tj. wykrywaniu mutacji w genie *HTT*, co w rodzinach

chorych stwarza szansę na wczesną interwencję terapeutyczną. Mimo licznych wysiłków badaczy nie zanotowano jednak takich postępów w tej dziedzinie, które można by przełożyć na praktykę kliniczną [35].

Naukowcy, jak dotąd, opracowali dwie robocze hipotezy zdarzeń, powodujących neurodegenerację tkanki mózgowej w chorobie HD. Pierwsza hipoteza zakłada, że patologiczna huntingtyna w pewien sposób prowadzi do upośledzenia wytwarzania energii w niektórych komórkach, co powoduje ich większą podatność na toksyczne skutki chemicznych substancji przekąźnikowych w mózgu. Druga hipoteza zaś zakłada, że zmutowana HTT dostaje się do jądra komórkowego, co prowadzi do śmierci komórki nerwowej [22]. Ostatnie doniesienia wskazują, że patogenezą HD jest związana z dysfunkcją transkrypcji i upośledzeniem metabolizmu energetycznego. Przypuszcza się, że przyczyną objawów choroby są zaburzenia procesów transkrypcyjnych, wynikające z oddziaływania na neurony podwyższonego w HD poziomu glutaminy oraz utratą prawidłowych funkcji mózgu i agregacją HTT [9,13,14,33].

BIAŁKO HUNTINGTyna

Rola prawidłowej, jak i zmutowanej huntingtyny, jak dotąd wciąż pozostają do końca niewyjaśnione. HTT jest dużym białkiem, złożonym z 3141 aminokwasów (350 kDa), rozpuszczalnym w cytoplazmie. Białko to jest związane z cytoszkieletem komórki oraz pęcherzykami synaptycznymi, pełniąc ważną rolę w transporcie pęcherzykowym i aksonalnym oraz transporcie cytoplazmatycznym. Za pomocą technik biochemicznych i fluorescencyjnych białko jest widoczne w retikulum endoplazmatycznym (ER), w jądrze lub może się przemieszczać między cytoplazmą i jądrem. W badaniach proteomicznych wykazano obecność HTT we frakcji membranowej mózgu. Badania z użyciem monoklonalnych przeciwciał wskazują, że większość HTT jest umiejscowiona w cytoplazmie i ER w strefie przyjądrowej [1]. HTT ma konserwatywny region – 18 aminokwasów od N-końca, stanowiący amfipatyczną α -helisę z potencjalnymi miejscami włączenia się do interakcji membranowej. Wiadomo, że huntingtyna wiąże się z wieloma białkami związanymi z transmisją sygnałów nerwowych i apoptozą, m.in. z HAP-1, HIP 1, GAPDH, kalmoduliną. Przypuszcza się, że huntingtyna też pełni istotne funkcje w procesie embriogenezy [2].

Prawidłowe białko HTT nie jest toksyczne, dopiero poprzez mutacje nabywa toksycznej aktywności względem komórki. Uważa się, że toksyczny efekt zmutowanej huntingtyny może być spowodowany nasiloną aktywnością tego białka lub pojawieniem się jego nowych właściwości, prowadzących do zmian konformacyjnych w cząsteczce huntingtyny oraz do zmian jej oddziaływania z innymi białkami. HTT staje się bardziej podatna na działanie enzymów proteolitycznych, m.in. kaspazy 3. Uwolniony proteolitycznie N-końiec HTT ulega translokacji do jądra komórkowego, stanowiąc rdzeń, wokół którego tworzą się nierozpuszczalne kompleksy, powodujące degenerację neuronów [19]. W wyniku zwiększenia liczby reszt poliglutaminowych dochodzi do hiperagregacji huntingtyny i formowania nierozpuszczalnych wtętw międzyi śródkomórkowych (w tym – w obrębie jądra komórkowego), w wyniku czego następuje śmierć komórki. Agregaty

zmutowanego białka mogą zakłócać procesy wewnątrzkomórkowe, takie jak transkrypcja, translacja, transport cytoplazmatyczny i aksonalny oraz wzajemne oddziaływanie białek komórkowych. [33,35].

Eksperymentalnie potwierdzono, że aktywność N-końca jest ważna tak w powstaniu agregatów polyQ, jak i w modulacji toksyczności. W badaniach z użyciem zmutowanego białka HTT obserwowano wzrost ilości HTT w jądrze wraz z bardzo zwiększoną toksycznością, chociaż bez powstawania agregatów. W eksperymencie tym dodatkowo wprowadzono punktową mutację na odcinku 1–18 aminokwasowym. Stwierdzono, że obecność N-końca w białku, jest niezbędna do połączenia z ER [2,21].

Potwierdzeniem zachodzącego procesu agregacji w komórce o różnych stopniach toksyczności są wyniki dostarczone przez Bhutani i wsp. [4]. Agregaty powstałe z niewielkich fragmentów polyQ charakteryzują się większą toksycznością niż większe agregaty; potwierdzają to wyniki badań próbek, pobranych z mózgów pacjentów z HD *post mortem*. Najprawdopodobniej krótkie polyQ, tworząc toksyczne postaci HTT, mogą łatwiej się łączyć z innymi białkami, upośledzając funkcje komórki. Agregaty także upośledzają transport pęcherzykowy wzdłuż aksonu komórki nerwowej, co prowadzi do zaburzeń neuroprzekaznictwa [4].

DEGRADACJE BIAŁKA A CHOROBA HUNTINGTONA

Hipoteza o udziale szlaku UPS w patologii chorób neurodegeneracyjnych powstała w 1989 r., kiedy zajmowano się badaniami immunohistochemicznymi ubikwityny [18,19,23,26,27]. Dowody na udział UPS w chorobach neurodegeneracyjnych pojawiły się dopiero w ostatnich latach. Uważa się, że dysfunkcja ubikwityny jest jedną z przyczyn patogenezy choroby HD. Wykazano, że aktywność układu UPS w chorobie Huntingtona jest osłabiona [3,12,22,43,45]. Bennett i wsp. [3] zastosowali spektroskopię masową w celu określenia ilościowego i jakościowego składu łańcuchów poliglutaminowych u pacjentów z HD i na modelach zwierzęcych. Najważniejszym okazało się stwierdzenie, że w chorobie Huntingtona następuje atypowe łączenie ubikwityny do proteasomu. W doświadczeniach przeprowadzonych zarówno na transgenicznym myszku R6/2 z mutacją w genie IT15, kodującym HTT, jak i z udziałem pacjentów z HD ustalono, że dysfunkcja UPS, to wspólna cecha w chorobie Huntingtona. W lisatach komórkowych za pomocą białka fluorocencyjnego GFP, mierzono ilość HTT zawierającej 16 reszt glutaminowych (typ zdrowy: HTTQ16GFP) lub 150 reszt glutaminowych (typ patologiczny: HTTQ150GFP), jak również ilość izopeptydów U-Lys11 i U-Lys63 oraz U-Lys48, traktowanych inhibitorem MG132. Zaobserwowano, że w patologicznych modelach HTTQ150GFP wzrasta liczba atypowych wiązań w proteasomie – U-Lys11 i U-Lys63, w stosunku do powszechnie występującego wiązania białka przez U-Lys48 [3].

Gil i wsp. [13] stosując, spektroskopię masową dostarczyli dowodów, zarówno na modelach mysich, jak i u pacjentów HD *post mortem*, że we wczesnym okresie choroby występuje akumulacja łańcuchów poliubikwitynowych tworzonych z udziałem Lys48. Autorzy wysunęli sugestię, że w początkowym stadium choroby szlak UPS jeszcze

funkcjonuje, a później zwiększone agregaty zmutowanego białka blokują tę drogę degradacji.

Dysfunkcja UPS i jej następstwa dla homeostazy komórki są krótkotrwałe, uruchamiają kaskadę zdarzeń, prowadzących do dysfunkcji neuronalnej, co jest charakterystyczne dla obrazu choroby HD. Właściwe funkcjonowanie tego układu jest istotne z powodu pojawiających się w komórce, w stanach patologicznych, białek o krótkim okresie półtrwania, nieprawidłowo pofałdowanych i zmutowanych. Mimo iż deregulacja szlaku UPS jest tylko jednym z wielu czynników w etiopatogenezie HD, jednak ze względu na rolę, jaką odgrywa w komórce, UPS staje się ważnym celem terapeutycznym [44].

Seo i wsp. [4,20,44,49] stworzyli myszy model HD z 105 CAG, w którym obserwowano zmniejszoną aktywność proteasomalną. Badania prowadzono porównując typ prawidłowy 26 CAG. Wykazano, że aktywator proteasomu PA28γ, stosowany w badaniach, zwiększał aktywność proteasomu i przeżywalność komórek. Autorzy sugerują, że zmutowane białko w cytosolu jest toksyczne i powinno być usunięte poprzez UPS lub lizosomy, w przeciwnym razie, kiedy liczba mutanta osiągnie pewien graniczny poziom, zaczynają się tworzyć jądrowe agregaty.

Imarisio i wsp. [21] donoszą, że w modulacji aktywności proteasomu zastosowali chemiczne związki: trehalozę i czerwień Kongo, które w efekcie spowodowały większą dostępność proteasomu dla zmutowanej huntingtyny.

W regulacji lizosomalnej degradacji białka Bhutani i wsp. [4] zwracają uwagę na szlak lizosomalnej autofagii agregatów polyQ. Doświadczenia wskazują, że o ile UPS degraduje prawidłowe białko huntingtynę, to agregaty polyQ są kierowane na szlak lizosomalny. Wykazano, że zmniejszenie procesu autofagii w OUN powoduje akumulację agregatów białkowych i zjawisko neurodegeneracji u myszy. Proteasomy Eukaryota trawią w najlepszym razie polyQ powoli lub wcale, uwalniając fragmenty do dalszej degradacji przez inne peptydazy. Sugeruje się, że fragmenty ulegającego rozpadowi białka mogą powodować uszkodzenie funkcji proteasomu. Potwierdzeniem tego są badania Gila i wsp. [13], które wykazały obecność w agregatach białkowych resztek podjednostek proteasomu zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

Jak wiadomo, peptydy uwolnione przez proteasom są trawione przez komórkowe endopeptydazy, oligopeptydazy i aminopeptydazy do aminokwasów. Wskazanie, które peptydazy biorą udział w trawieniu sekwencji polyQ stało się bardzo ważne. Podjęto próbę identyfikacji peptydaz *in vitro*. W początkowym etapie produkty proteasomalne są degradowane przez dwie główne endopeptydazy – TPPII i TOP. TPPII – proteolityczny kompleks 5-9 MDa, odgrywa *in vivo* istotną rolę w proteolizie peptydów większych niż 15 reszt, zaś TOP peptydów o długości 9–15 reszt aminokwasowych (około 25% produktów proteasomalnych). Wymienione wyżej i inne endopeptydazy – IDE, ACE, POP – nie mają większego znaczenia dla produktów proteasomalnych. Za końcowy etap trawienia odpowiadają aminopeptydazy. Przebadano główne 3 aminopeptydazy: BH, LAP, PSA. Przedstawione biochemiczne badania ujawniły unikalną zdolność PSA do trawienia fragmentów polyQ,

co może odgrywać ogromną rolę w protekcji neuronów w schorzeniach poliglutaminowych również *in vivo*. PSA jest enzymem wszechobecnym śródkomórkowo, znajduje się w cytosolu, jądrze, jest związany z membranami, a podczas mitozy występuje też w mikrotubulach. Jest to metalopeptydaza związana z jonami Zn^{2+} – białko o masie 100 kDa, obecne w dużym stężeniu w mózgu ssaków [4].

Imarisio i wsp. donoszą, że do modulacji lizosomalnej degradacji zmutowanej huntingtyny zastosowali również takie związki jak rapamycynę, karbamazepinę, walpronian sodu. W eksperymentach z użyciem mysich modeli HD zaobserwowano nasilenie zjawiska autofagii [21].

Interesujące są wyniki uzyskane w badaniach z użyciem modeli zwierzęcych i hodowli komórkowych, w których wykazano, że nadekspresja chaperonów HSP 70,40,104 oraz TRiC (tail-less complex polypeptide 1 ring complex) zmniejsza agregację i śmierć neuronów w HD [21].

Etiopatogeneza choroby Huntingtona stanowi bardzo złożony problem. Jednak coraz to nowocześniejsze techniki

identyfikacji genów oraz stosunkowo łatwy dostęp do zsekwencjonowanego genomu ludzkiego, być może już w niedalekiej przyszłości pozwolą na uzyskanie pełniejszej informacji o etiologii tej choroby układu nerwowego, możliwych terapiach i neuroprotekcji.

PODSUMOWANIE

W świetle doniesień literaturowych, przedstawionych w niniejszym artykule, UPS okazuje się jednym z punktów docelowych w poszukiwaniu celów terapeutycznych. Prawdopodobne funkcjonowanie szlaku UPS umożliwia zachowanie homeostazy procesów wewnątrzkomórkowych i usunięcie uszkodzonych białek. Przyroda wyposażała komórki w wyspecjalizowane systemy przeznaczone do konkretnych celów, w związku z tym szlak UPS nie może być zamieniony, lecz jedynie naprawiony. Stworzenie innowacyjnego projektu mającego na celu opracowanie strategii naprawczych funkcji UPS będzie wyzwaniem dla wielu naukowców przez najbliższe lata. Dotychczasowe wyniki badań dowodzą, że proteasom jest potencjalnym kluczem do opracowania skutecznych terapii.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ahn K.S., Sethi G., Chao T.H., Neuteboom S.T., Chaturvedi M.M., Palladino M.A., Younes A., Aggarwal B.B.: Salinosporamide A (NPI-0052) potentiates apoptosis, suppresses osteoclastogenesis, and inhibits invasion through down-modulation of NF- κ B-regulated gene products. *Blood*, 2007; 110: 2286–2295
- [2] Atwal R.S., Xia J., Pinchev D., Taylor J., Epand R.M., Truant R.: Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Hum. Mol. Genet.*, 2007; 16: 2600–2615
- [3] Bennett E.J., Shaler T.A., Woodman B., Ryu K.Y., Zaitseva T.S., Becker C.H., Bates G.P., Schulman H., Kopito R.R.: Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature*, 2007; 448: 704–708
- [4] Bhutani N., Venkatraman P., Goldberg A.L.: Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasomes during protein degradation. *EMBO J.*, 2007; 26: 1385–1396
- [5] Bury M., Niemierko A.: Proteasomalna degradacja białek komórkowych. *Postepy Biol. Kom.*, 2005; 32: 435–448
- [6] Chauhan D., Hideshima T., Anderson K.C.: A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy. *Br. J. Cancer*, 2006; 95: 961–965
- [7] Ciechanover A.: Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Hematology*, 2006; 1-12: 505–506
- [8] Ciechanover A.: The ubiquitin proteolytic system: from an idea to the patient bed. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2006; 3: 21–31
- [9] Cui L., Jeong H., Borovecki F., Parkhurst C.N., Tanese N., Krainc D.: Transcriptional repression of PGC-1 α by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*, 2006; 127: 59–69
- [10] Demo S.D., Kirk C.J., Auja M.A., Buchholz T.J., Dajee M., Ho M.N., Jiang J., Laidig G.J., Lewis E.R., Parlati F., Shenk K.D., Smyth M.S., Sun C.M., Vallone M.K., Woo T.M., Molineaux C.J., Bennett M.K.: Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res.*, 2007; 67: 6383–6391
- [11] Dziewulska D., Rafałowska J.: Rola zaburzeń przestrzennej budowy białek w patomechanizmie chorób układu pozapiramidowego. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 2005; 39: 397–404
- [12] Finkbeiner S., Mitra S.: The ubiquitin-proteasome pathway in Huntington's disease. *Sci. World J.*, 2008; 8: 421–433
- [13] Gil J.M., Rego A.C.: Mechanisms of neurodegeneration on Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.*, 2008; 27: 2803–2820
- [14] Gil J.M., Rego A.C.: The R6 lines of transgenic mice: a model for screening new therapies for Huntington's disease. *Brain Res. Rev.*, 2009; 59: 410–431
- [15] Goh A.M., Walters K.J., Elsasser S., Verma R., Deshaies R.J., Finley D., Howley P.M.: Components of the ubiquitin-proteasome pathway compete for surfaces on Rad23 family proteins. *BMC Biochem.*, 2008; 9: 1471–1481
- [16] Gruber B.M.: Udział czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w zjawisku oporności wielolekowej w wybranych komórkach ludzkich nowotworów wrażliwych i opornych na działanie cytostatyków. Rozprawa habilitacyjna 2008; WUM, Warszawa
- [17] Grzelakowska-Sztabert B.: Nagroda Nobla z chemii za 2004 rok – docenienie kontrolowanej, zależnej od ubikwityny, proteolitycznej degradacji białek. *Postepy Biol. Kom.*, 2005; 32: 3–12
- [18] Hol E.M., Fischer D.F., Ovaa H., Scheper W.: Ubiquitin proteasome system as a pharmacological target in neurodegeneration. *Expert Rev. Neurother.*, 2006; 6: 1337–1347
- [19] Huang D.T., Hunt H.W., Zhuang M., Ohi M.D., Holton J.M., Schulman B.A.: Basis for a ubiquitin-like protein thioester switch toggling E1-E2 affinity. *Nature*, 2007; 445: 394–398
- [20] Huang L., Chen C.H.: Proteasome regulators: activators and inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 2009; 16: 931–939
- [21] Imarisio S., Carmichael J., Korolchuk V., Chen C.W., Saiki S., Rose C., Krishna G., Davies J.E., Tofei E., Underwood B.R., Rubinstein D.C.: Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. *Biochem. J.*, 2008; 412: 191–209
- [22] Jana N.R., Zemskov E.A., Wang G., Nukina N.: Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum. Mol. Genet.*, 2001; 10: 1049–1059
- [23] Jung J., Bonini N.: CREB-binding protein modulates repeat instability in a Drosophila model for polyQ disease. *Science*, 2007; 315: 1857–1859
- [24] Jurczynski A., Skotnicki A.B.: Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in neoplastic diseases. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2006; 15: 309–320
- [25] Kisselev A.F., Callard A., Goldberg A.L.: Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 8582–8590
- [26] Kolas N.K., Chapman J.R., Nakada S., Ylanko J., Chahwan R., Sweeney F.D., Panier S., Mendez M., Wildenhain J., Thomson T.M., Pelletier L., Jackson S.P., Durocher D.: Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*, 2007; 318: 1637–1640
- [27] Kovtun I.V., Liu Y., Bjoras M., Klungland A., Wilson S.H., McMurray C.T.: OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature*, 2007; 447: 447–452

- [28] Krzemieniecki K.: Bortezomib – w świetle Nagrody Nobla 2004. Nowe perspektywy leczenia szpiczaka mnogiego. *Współcz. Onkologia*, 2005; 9: 54–60
- [29] Kuhn D.J., Chen Q., Voorhees P.M., Strader J.S., Shenk K.D., Sun C.M., Demo S.D., Bennett M.K., van Leeuwen F.W., Chanan-Khan A.A., Orlowski R.Z.: Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*, 2007; 110: 3281–3290
- [30] Li W., Tu D., Brunger A.T., Ye Y.: A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate. *Nature*, 2007; 446: 333–337
- [31] Lukashchuk N., Vousden K.H.: Ubiquitination and degradation of mutant p53. *Mol. Cell. Biol.*, 2007; 27: 8284–8295
- [32] Mazzucotelli E., Belloni S., Marone D., De Leonardi A., Guerra D., Di Fonzo N., Cattivelli L., Mastrangelo A.: The E3 ubiquitin ligase gene family in plants: regulation by degradation. *Curr. Genomics*, 2006; 7: 509–522
- [33] Mochel F., Charles P., Seguin F., Barritault J., Coussieu C., Perin L., Le Bouc Y., Gervais C., Carcelain G., Vassault A., Feingold J., Rabier D., Durr A.: Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. *PLoS One*, 2007; 2: e647
- [34] Mukhopadhyay D., Riezman H.: Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, 2007; 315: 201–205
- [35] Nicewicz B., Pełka-Wysiecka J.: Neuropsychiatryczne aspekty choroby Huntingtona – opis przypadku. *Postepy Psych. Neurol.*, 2008; 17: 89–92
- [36] Niedźwiedzka-Rystwej P., Deptuła W.: Autofagia – ważne zjawisko odpornościowe. *Postepy Biol. Kom.*, 2009; 36: 455–464
- [37] Nukina N.: Pathomechanism of polyglutamine diseases and strategic design for their therapies. *Rinsho Shinkeigaku*, 2008; 48: 913–914
- [38] Ohtake F., Baba A., Takada I., Okada M., Iwasaki K., Miki H., Takahashi S., Kouzmenko A., Nohara K., Chiba T., Fujii-Kuriyama Y., Kato S.: Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*, 2007; 446: 562–566
- [39] Pandey U.B., Nie Z., Batlevi Y., McCray B.A., Ritson G.P., Nedelsky N.B., Schwartz S.L., DiProspero N.A., Knight M.A., Schuldiner O., Padmanabhan R., Hild M., Berry D.L., Garza D., Hubbert C.C., Yao T.P., Baehrecke E.H., Taylor J.P.: HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, 2007; 447: 859–863
- [40] Paul S.: Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches. *Bioessays*, 2008; 30: 1172–1184
- [41] Piotrowska A., Iżykowska I., Podhorska-Okołów M., Zabel M., Dzięgieł P.: Budowa białek z rodziny NF- κ B i ich rola w procesie apoptozy. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2008; 62: 64–74
- [42] Potts B.C., Lam K.S.: Generating a generation of proteasome inhibitors: from microbial fermentation to total synthesis of salinosporamide A (Marizomib) and other salinosporamides. *Mar. Drugs*, 2010; 8: 835–880
- [43] Qin Z.H., Wang Y., Sapp E., Cuiffo B., Wanker E., Hayden M.R., Kegel K.B., Aronin N., DiFiglia M.: Huntingtin bodies sequester vesicle-associated proteins by a polyproline-dependent interaction. *J. Neurosci.*, 2004; 24: 269–281
- [44] Seo H., Sonntag K.C., Kim W., Cattaneo E., Isacson O.: Proteasome activator enhances survival of Huntington's disease neuronal model cells. *PLoS One*, 2007; 2: e238
- [45] Sobów T., Sławek J.: Farmakoterapia zaburzeń ruchowych i objawów neuropsychiatrycznych w chorobie Huntingtona: systematyczny przegląd piśmiennictwa. *Aktualn. Neurol.*, 2007; 7: 10–18
- [46] Sprangers R., Kay L.E.: Quantitative dynamics and binding studies of the 20S proteasome by NMR. *Nature*, 2007; 445: 618–622
- [47] Wilkinson K.D.: The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 15280–15282
- [48] Williams A., Jahreiss L., Sarkar S., Saiki S., Menzies F.M., Ravikumar B., Rubinsztein D.C.: Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 2006; 76: 89–101
- [49] Zhang Z., Zhang R.: Proteasome activator PA28 γ regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation. *EMBO J.*, 2008; 27: 852–864

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.