

PROTEOLITYCZNY KOMBINAT I JEGO REGULATORY

THE PROTEOLYTIC MACHINERY AND ITS REGULATORS

Julia Stój, Przemysław Karpowicz

*Katedra Chemii Medycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
ul. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk
e-mail: jstoj@wp.pl, przemek@chem.univ.gda.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Proteasom 20S
2. Kompleksy proteasomu 20S z aktywatorami
3. Mechanizm otwierania bramy proteasomu
4. Mechanizm działania układu ubikwityna – proteasom
 - 4.1. Ubikwitynacja
 - 4.2. Mechanizm proteolizy
 - 4.3. Sygnały do degradacji białek
5. Inhibitory proteasomu
 - 5.1. Małocząsteczkowe inhibitory kompetycyjne
 - 5.1.1. Peptydyloaldehydy
 - 5.1.2. Peptydowe kwasy boronowe
 - 5.1.3. Peptydowe epoksyketony
 - 5.1.4. Peptydowe winylosulfony
 - 5.1.5. TMC-95
 - 5.2. Inhibitory niekompetycyjne
 - 5.2.1. Rytonawir
 - 5.2.2. Peptydy bogate w prolinę i argininę (peptydy PR)
 - 5.2.3. Białko HIV-1 Tat

Piśmiennictwo cytowane

mgr Julia Stój, absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Pracę magisterską pt. „Allosteryczne modulatory aktywności proteasomu oparte o strukturę zasadowej domeny białka Tat” wykonała w Katedrze Chemii Medycznej. Od roku akademickiego 2011/2012 słuchaczka Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemii i Biochemii, podczas których kontynuuje badania nad allosterycznymi modulatorami aktywności proteasomu.

mgr Przemysław Karpowicz, absolwent Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, od 2010 roku doktorant Studium Chemii i Biochemii przy Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Swoją pracę naukową realizuje w Katedrze Chemii Medycznej tejże uczelni oraz od 2011 roku w The University of Texas Health Science Center at San Antonio, Institute of Biotechnology, gdzie przebywa na długoterminowym stażu naukowym. Od kilku lat zajmuje się projektowaniem i syntezą peptydów oraz peptydomimetyków zdolnych do allosterycznej modulacji ludzkiego proteasomu 20S.

Główne zainteresowania naukowe to: synteza peptydów i peptydomimetyków, modulacja proteasomu 20S oraz jego zaangażowanie w patogenezę chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych, wykorzystanie spektroskopii sił atomowych (AFM) w badaniu morfologii białek.

ABSTRACT

One of the proteolytic pathways existing in a cell is ubiquitin- proteasome system (UPS). This highly organized and ATP-dependent system is based on the multifunctional enzyme – the proteasome. Ubiquitin in this pathway plays a role of a tag which marks proteins intended for destruction.

Ubiquitylated proteins are recognized and degraded by the 26S proteasome. It consists of a cylindrical-shaped proteolytic core – the proteasome 20S, and attached to it regulatory particles 19S (Fig. 2). The core is composed of four rings, each of them formed by seven subunits. The inner β -rings harbour active sites (in *Eukaryota* two of each kind: chymotrypsin-like (ChT-L), trypsin-like (T-L) and peptidyl-glutamyl (PGPH)). The outer, α -rings create a gated channel leading to the catalytic chamber [8]. In a latent proteasome the gate is closed by tightly packed *N*-terminal residues of α subunits (Fig. 4). Due to such architecture the active sites of the proteasome are not freely available for the substrates. An opening of the gate in physiological conditions occurs after binding the activators such as 11S, 19S or PA200.

By catalysing degradation of proteins, the UPS is deeply involved in regulation of cellular physiology. It is also involved in removing of misfolded or damaged proteins and supports the immune system by generating antigenic peptides. Defects in functioning of this proteolytic system play a causal role in the development of a number of diseases, including inflammation, neurodegenerative diseases and various cancers [2–6] what is the reason why the proteasome has become an important therapeutic target.

Detailed information about the structure, catalytic activities and mechanisms of functioning of the different proteasome complexes existing in cells is essential to understand their role in organisms as well as to develop new compounds which may find pharmaceutical application.

Keywords: proteasome, ubiquitin-proteasome system, inhibitors, allostery

Słowa kluczowe: proteasom, system ubikwityno-proteasomalny, inhibitory, allosteryczność

WPROWADZENIE

Białka są podstawowym elementem budulcowym organizmu człowieka, a ich rola i właściwości są bardzo różnorodne. Czas życia każdego białka jest ograniczony i dlatego po spełnieniu swoich funkcji lub w przypadku nadmiaru, czy uszkodzenia, są one eliminowane z komórki w procesach określanych jako degradacja białek. W przypadku organizmów zdrowych codziennie usuwanych jest 3–5% białek, a w stanach patologicznych liczba ta proporcjonalnie wzrasta [1]. Z tego powodu przemiany białek muszą być ściśle kontrolowane.

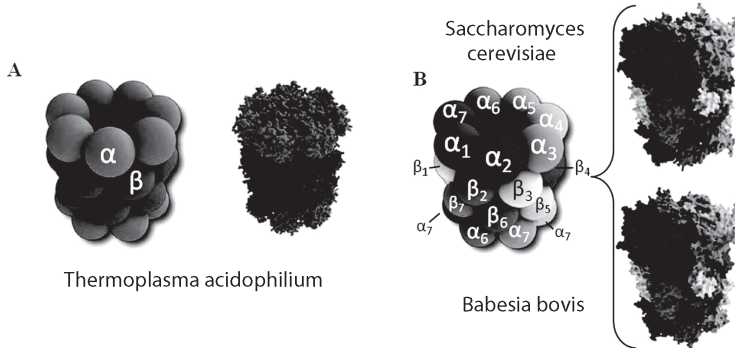
Jednym z systemów proteolitycznych funkcjonujących w komórce jest szlak ubikwityno-proteasomalny (UPS), w którym białka oznakowane przez ubikwitynę kierowane są na ścieżkę degradacji i rozkładane przez wielopodjednostkowe proteazy – proteasomy. W ten sposób degradowane jest ponad 90% białek komórkowych. Proteasomy, poprzez zmianę stężenia i stabilności białek regulatorowych, odgrywają ważną rolę w regulowaniu całego szeregu reakcji biochemicznych, umożliwiając komórce kontrolę takich procesów jak: cykl komórkowy, podział komórek, przewodnictwo komórek nerwowych, supresję nowotworów czy też transkrypcję i replikację DNA [2]. Proteasom pełni także funkcję ochronną usuwając z komórki białka uszkodzone i nieprawidłowo ukształtowane w wyniku mutacji lub pod wpływem czynników zewnętrznych powodujących stres oksydacyjny.

Prawidłowe działanie UPS zapewnia homeostazę między biosyntezą, a degradacją poszczególnych elementów komórki. Zaburzenia w funkcjonowaniu proteasomu mogą powodować nadmierny rozkład białek istotnych dla życia komórki lub hamować degradację uszkodzonych protein, powodując ich kumulację, a tym samym prowadząc do utraty homeostazy. Okazało się, że mechanizm ten jest powiązany z powstawaniem niektórych schorzeń nowotworowych takich jak: rak płuc, okrężnicy, nerki, czy białaczka mieloblastyczna oraz szeregu chorób neurodegeneracyjnych, m.in. choroby Alzheimerera, Parkinsona czy płasawicy Huntingtona [3–6]. Z tego powodu podejmowane są próby otrzymywania inhibitorów proteasomu oraz enzymów katalizujących ubikwitynację, które mogłyby zostać wykorzystane w terapii.

1. PROTEASOM 20S

Proteasom został odkryty we wszystkich typach komórek eukariotycznych, a także u archebakterii i eubakterii. W komórce zlokalizowany jest przede wszystkim w cytozolu, gdzie jego zawartość szacowana jest na około 1% wszystkich białek komórkowych, a w mniejszych ilościach występuje w strukturach jądrowych oraz retikulum endoplazmatycznym [7]. Proteasom 20S kształtem przypomina wąską tubę lub baryłkę. Zarówno u eukariotów jak i większości prokariotów zbudowany jest z czterech heptametrycznych pierścieni, które przylegają do siebie według schematu $\alpha\beta\beta\alpha$. Każdy z pierścieni α w proteasomie euka-

riotypycznym zbudowany jest z 7 różnych podjednostek α , a każdy z pierścieni β – z 7 różnych podjednostek β . Proteasom prokariotyczny ma prostszą budowę i zbudowany jest z jednego typu podjednostek α i jednego rodzaju podjednostek β (Rys. 1) [8].



Rysunek 1. Struktura krystalograficzna proteasomu 20S: A) archeowców (*Thermoplasma acidophilum*): podjednostki β zaznaczono kolorem ciemniejszym, a podjednostki α – jaśniejszym. B) eukariotów (*Saccharomyces cerevisiae* i *Babesia bovis*): 14 różnych podjednostek α i β oznaczono różnymi odcieniami szarości [9]

Figure 1. The crystal structure of 20S proteasome of: A) Archaea (*Thermoplasma acidophilum*): Subunits β are shown in dark and α subunits in bright gray. B) Eukaryote (*Saccharomyces cerevisiae* and *Babesia bovis*): 14 different subunits α and β are shown in different shades of gray [9]

Zewnętrzne pierścienie α pozbawione są aktywności proteolitycznej. Ich rola polega na kontrolowaniu dostępu do ukrytych wewnątrz kanału katalitycznego miejsc aktywnych. Przyłączenie do podjednostek α białek regulatorowych indukuje otwarcie bramy zamykającej wejście do kanału, umożliwiając dostęp substratów do komory katalitycznej i ich degradację [7].

Centra aktywne proteasomu znajdują się na *N*-końcach podjednostek β . Proteasomy prokariotów posiadają wyłącznie jeden typ podjednostek β i dlatego wszystkie wykazują ten sam rodzaj aktywności proteolitycznej – aktywność chymotrypsynopodobną. U eukariotów aktywnością cechują się jedynie trzy podjednostki każdego z pierścieni β – β_1 , β_2 i β_5 , przy czym do każdej z podjednostek przypisany jest inny rodzaj aktywności [10]:

- β_5 wykazuje aktywność chymotrypsynopodobną (ChT-L od ang. *chymotrypsin-like*) hydrolizując wiązania peptydowe występujące po resztach aminokwasowych z rozbudowanym, hydrofobowym łańcuchem bocznym,
- β_2 cechuje się aktywnością trypsynopodobną (T-L od ang. *trypsin-like*): hydroliza wiązania peptydowego następuje po reszcie aminokwasowej z zasadowym łańcuchem bocznym,
- β_1 wykazuje aktywność kaspazopodobną (ang. *caspase-like*), zwaną też pokwasową (ang. *postacidic*) lub peptydylo-glutamylową (ang. *peptidyl-glutamyl peptide hydrolyzing*, PGPH): hydroliza wiązania peptydowego następuje po reszcie aminokwasowej z kwasowym łańcuchem bocznym.

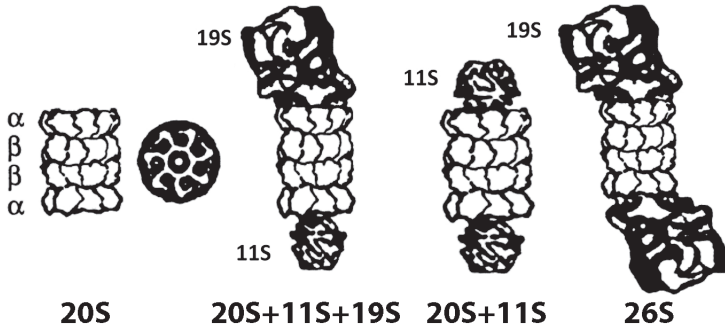
Selektywność podjednostek katalitycznych eukariotycznego proteasomu wynika z budowy kieszeni wiążących. Szczególne znaczenie ma reszta aminokwasowa znajdująca się na dnie kieszeni substratowej S1 – reszta 45 [8]. Preferencja podjednostki $\beta 1$ do cięcia wiązań po resztach kwasowych wynika z zasadowego charakteru kieszeni S1 związanego z obecnością reszty Arg45. W kieszeni S1 podjednostki $\beta 2$ znajduje się glicyna (Gly45), reszta aminokwasowa o niewielkich rozmiarach stwarzających miejsce dla łańcuchów bocznych rozgałęzionych aminokwasów. W podjednostce $\beta 5$ kieszeń S1 ma charakter apolarny wynikający z obecności metioniny (Met45), co tłumaczy aktywność chymotrypsynopodobną tej podjednostki [10]. Coraz częściej, w przypadku ssaków, wyróżnia się także dwie inne peptydazowe aktywności, wiążące się z hydrolizą wiązania peptydowego pomiędzy małymi, obojętnymi resztami aminokwasowymi (ang. *small neutral amino acid-preffering*, SNAAP) lub po resztach aminokwasowych z rozgałęzionymi łańcuchami bocznymi (ang. *branched-chain amino acid-preffering*, BrAAP) [11, 12]. Aktywności te przypisywane są odpowiednio podjednostkom $\beta 1$ i $\beta 5$.

Zróznicowana budowa miejsc aktywnych proteasomu sprawia, że jest on zdolny do zhydrolizowania niemal każdego wiązania w łańcuchu peptydowym. W przeciwieństwie do większości proteaz, które tną polipeptydy na dwa fragmenty, proteasomy hydrolizują białkowe substraty w wielu miejscach, powodując powstawanie oligopeptydów o długości od 3 do 25 reszt aminokwasowych, ze średnią ilością od 8 do 12 reszt w łańcuchu [13].

2. KOMPLEKSY PROTEASOMU

Istnieją trzy klasy ligandów, które wiążą się z zewnętrznymi pierścieniami α proteasomu 20S i aktywują podjednostki katalityczne: regulator 19S (PA700) oraz aktywatory 11S (PA28/REG) i PA200 (Blm10). Do proteasomu 20S może przyłączyć się jedna cząstka regulatorowa 19S lub dwie cząstki, tworząc w ten sposób kompleks o nazwie 26S (około 2500 kDa) [7]. Z częścią rdzeniową może także asocjować białko multimetryczne zwane aktywatorem 11S [14]. W niektórych tkankach i typach komórek kompleks 19S–20S może łączyć się z 11S. Wyniki badań pokazują, że przyłączenie aktywatora 11S wpływa na specyficzność miejsc aktywnych. Pod pojęciem „kompleks proteasomalny” kryją się więc różne struktury; przedstawiono je na Rysunku 2.

Regulator 19S pośredniczy w rozpoznawaniu, rozfałdowywaniu i przenoszeniu ubikwitynowanych białkowych substratów do wnętrza proteasomu w ATP-zależny sposób. Degradacji ubikwitynowanego białka (*in vivo*) dokonywać może proteasom zarówno z jednym, jak i dwoma regulatorami 19S przyłączonymi do rdzenia 20S. U ssaków występują także kompleksy 11S/20S/11S oraz wolne proteasomy 20S. Działają one niezależnie od energii pozyskiwanej z ATP, ale nie są zdolne do rozpoznawania i degradacji ubikwitynowanych substratów. Kompleks 11S/20S/11S (o masie około 1000 kDa) stymuluje produkcję antygenów [15, 16].



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie kompleksów proteasomu. Po lewej – proteasom 20S, widok z boku, ukazujący ułożenie czterech pierścieni ($\alpha\beta\beta\alpha$) oraz widok z góry na siedmiokrotną oś symetrii. W środku – proteasom mieszany powstały przez przyłączenie regulatora 19S i aktywatora 11S do rdzenia 20S oraz proteasom aktywowany przez przyłączenie aktywatora 11S (PA28) z dwóch stron rdzenia 20S. Po prawej – widok z boku na proteasom 26S, powstały przez przyłączenie dwóch regulatorów 19S do rdzenia 20S [7]

Figure 2. Schematic representations of various types of proteasome complexes. Left: 20S proteasome, in side-view visible four rings ($\alpha\beta\beta\alpha$), top view shows seven-fold symmetry. Middle: mixed-type proteasome complex created by attaching 19S and 11S to the 20S core (20S+11S+19S), and the proteasome activated by 11S attached on both ends of the 20S (20S+11S). Right: side-view of the 26S proteasome consisting of the 20S core and two 19S regulatory particles [7]

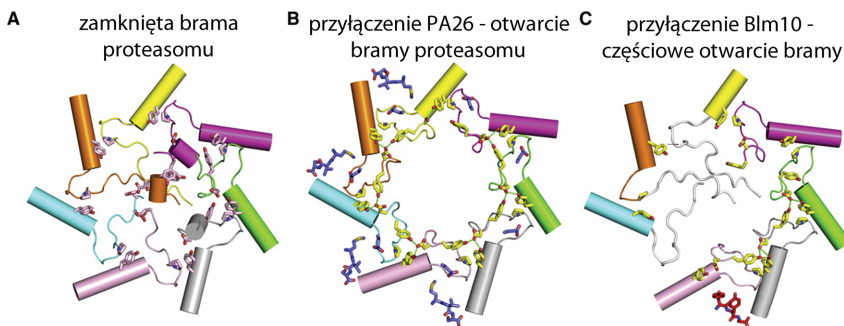
Białko regulatorowe 19S zbudowane jest z dwóch różniących się funkcją części: podstawy oraz wieka. Wieko, w skład którego wchodzi 9 podjednostek, odpowiedzialne jest za rozpoznanie substratu oraz odszczepienie od niego łańcucha poliubikwitynowego. Podstawa zbudowana jest z 10 podjednostek, z czego sześć to homologi ATPaz (ang. *Regulatory particle ATPase*, Rpt) należących do rodziny enzymów zwanej AAA (ang. *ATPase associated with various cellular activities* – ATPazy związane z różnorodnymi aktywnościami w komórce). Białka te charakteryzują się obecnością konserwatywnej domeny wiążącej ATP, zbudowanej z 230 aminokwasów, która występuje w każdej z sześciu podjednostek Rpt. Cztery pozostałe podjednostki białkowe podstawy to Rpn1, Rpn2, Rpn10 i Rpn13 (ang. *Regulatory particle non-ATPase*). Podstawa, która wiąże się z proteasomem, pozwala na bezpośrednie oddziaływanie ATPaz z podjednostkami α rdzenia proteolitycznego 20S. W wyniku hydrolizy ATP następuje rozwijanie łańcucha polipeptydowego substratu, indukcja zmian konformacyjnych proteasomu 20S skutkująca otwarciem kanału w pierścieniu α , oraz przenoszenie substratu do komory katalitycznej [17].

3. PROTEASOM JAKO BIAŁKO REGULOWANE ALLOSTERYCZNIE

Proteasom, ze względu na swoją strukturę wielopodjednostkową jest idealnym przykładem enzymu allosterycznego. Po pierwsze, wszystkie centra aktywne znajdują się wewnątrz proteasomu, w jednej komorze, gdzie współpracują ze sobą bezpośred-

nio oraz pośrednio. Po drugie, wejście do kanału centralnego i komory katalitycznej proteasomu jest zamknięte przez bramę tworzoną przez pierścienie α , której otwarcie następuje pod wpływem sygnałów allosterycznych. Sygnały allosteryczne odpowiadają także za oddziaływania pomiędzy centrami katalitycznymi i aktywatorami: 11S i PA200, centrami katalitycznymi i podjednostkami regulatora 19S, ligandami i bramą [18], a także centrami katalitycznymi i bramą [19]. Wiązanie liganda, substratu lub inhibitora w pobliżu centrum katalitycznego może zarówno hamować jak i pobudzać miejsca aktywne [20].

U eukariotów dostęp substratów do wnętrza proteasomu ograniczony jest przez dwa strukturalne elementy. Jednym z nich jest wąski kanał – α -annulus, o niewielkiej średnicy 13 Å wymuszającej rozwijanie substratów białkowych przed wejściem do komory katalitycznej [21]. Drugim elementem jest wymieniona wcześniej brama formowana przez *N*-końce podjednostek α stanowiąca potencjalny cel działania sygnałów allosterycznych. Delecja w *N*-końcowej sekwencji podjednostki $\alpha 3$, która tworzy najważniejszy fragment bramy, powoduje trwale otwarcie kanału katalitycznego i aktywację proteasomu [22]. W warunkach naturalnych przez większość czasu brama proteasomu jest zamknięta, a jej otwarcie następuje w wyniku przyłączenia aktywatorów 11S i PA200 lub regulatora 19S (Rys. 3).



Rysunek 3. Widok z góry na bramę proteasom *Saccharomyces cerevisiae*. A) Proteasom z zamkniętą bramą. B) Proteasom aktywowany PA26 – konformacja otwarta stabilizowana przez zaznaczone na żółto reszty Tyr8, Asp9, Pro17 i Tyr26. Na niebiesko zaznaczono trzy C-końcowe reszty aminokwasowe znajdujące się w kieszeniach pomiędzy pierścieniami α . C) Proteasom aktywowany Blm10 – częściowo otwarta konformacja. W kieszeni pomiędzy podjednostkami $\alpha 5/\alpha 6$, kolorem czerwonym, oznaczono C-końcowe aminokwasy aktywatora [21]

Figure 3. Top view of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome gate. A) Proteasom gate in the closed conformation. B) The PA26 complex – open conformation stabilized by Tyr8, Asp9, Pro17, and Tyr26 colored yellow. The C-terminal three residues of PA26 (blue) are shown in the proteasome pockets between α subunits. C) The Blm10 complex – partially open conformation. The C-terminal residues of Blm10 (red) bind in the $\alpha 5/\alpha 6$ pocket [21]

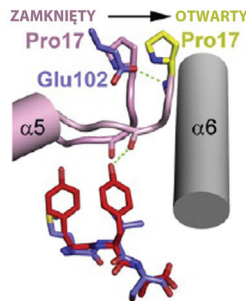
Istnieją dowody pozwalające przypuszczać, że modulatory te wiążąc się z pierścieniem α nie tylko powodują otwarcie bramy, ale także wywołują sygnały allosteryczne indukujące zmiany konformacyjne, które docierają aż do miejsc katalitycznych i wpływają na ich aktywność [19, 20, 23]. Otwarcie bramy może nastąpić także

w wyniku aktywności katalitycznej każdego z miejsc aktywnych, jak i być wywołane poprzez substraty lub przez białka takie jak np. inhibitory cyklino-zależnych kinaz (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitors*, CKI) [20]. Wszystkie te procesy wymagają transdukcji sygnału na duże odległości i stanowią niezwykle przykładowy przykład oddziaływań allosterycznych.

3.1. AKTYWATOR 11S

W strukturze kompleksu białkowego 11S wyróżnia się dwa rejony odpowiadające za jego oddziaływanie z proteasomem 20S: siedmioaminokwasowy fragment C-końcowy oraz sześćoaminokwasową pętlę aktywną (ang. *activation loop*) [24]. Najprawdopodobniej aktywator 11S otwiera bramę proteasomu dzięki oddziaływaniom pętli aktywnej, co jest możliwe dzięki zakotwiczeniu się C-końcowego fragmentu białka między podjednostkami α [25]. Przeprowadzone badania dowiodły, że usunięcie z sekwencji aktywatora C-końcowej reszty tyrozyny uniemożliwia jego wiązanie się do powierzchni proteasomu [21].

Zamknięcie bramy prowadzącej do wnętrza proteasomu stabilizowane jest przez liczne wiązania wodorowe i oddziaływania van der Waalsa. Pętla aktywna aktywatora 11S, zawierająca kwas glutaminowy (Glu102), powoduje przesunięcie Pro17 o około 0,5–3,5 Å w każdej z siedmiu podjednostek α proteasomu (Rys. 4). Ta niewielka zmiana położenia zaburza oddziaływania wodorowe destabilizując zamkniętą konformację pozwalając na otwarcie bramy. Otwarta konformacja stabilizowana jest przez cztery reszty aminokwasowe podjednostek α : Tyr8, Asp9, Pro17 oraz Tyr26 [21].



Rysunek 4. Zmiany w rejonie bramy wywołane wiązaniem PA26 i Blm10 z pierścieniem α . PA26 wpływa na położenie Pro17 we wszystkich siedmiu podjednostkach α poprzez Glu102 z tzw. pętli aktywnej (niebieski). Natomiast w Blm10 (czerwony), którego C-koniec kotwiczy w kieszeni pomiędzy podjednostkami $\alpha 5$ i $\alpha 6$, grupa hydroksylowa przedostatniej w sekwencji reszty Tyr tworzy wiązanie wodorowe z atomem tlenu Gly19 powodując tym samym przesunięcie Pro17, ale tylko w podjednostce $\alpha 5$ [21].

Figure 4. Superposition of the PA26 (11S) and Blm10 (PA200) complexes in the $\alpha 5/\alpha 6$ pocket illustrating the different mechanisms of displacing the Pro17 reverse turn. PA26 displaces Pro17 in all seven subunits by contacting adjacent residues with activation loop residue Glu102 (blue). Blm10 (red) stabilizes the same Pro17 displacement by forming a hydrogen bond between its Tyr side chain and the main-chain oxygen of Gly19 but only in $\alpha 5$ subunit [21]

3.2. AKTYWATORY PA200 (BLM10)

PA200 występuje jedynie w jądrach komórkowych komórek ssaków, jednak w komórkach drożdży znajduje się jego odpowiednik oznaczany jako Blm10. Białko to funkcjonuje, podobnie jak aktywator 11S, w sposób niezależny od energii pozyskiwanej z hydrolizy ATP, ale w przeciwieństwie do pozostałych regulatorów proteasomu – 11S oraz 19S, jest monomerem o masie około 200 kDa [26]. Niewiele jest informacji na temat pełnionych przez nie funkcji. Wiadomo, że odpowiada ono za rozkład peptydów, a nie białek, przy czym preferowane są substraty zawierające reszty kwasowe [8]. Bierze też udział w procesie naprawy uszkodzeń DNA, wywołanych działaniem czynników utleniających lub promieniowania jonizującego, jako kompleks hybrydowy z proteasomem (PA200+20S+19S). Przypuszcza się, że PA200 aktywuje, niezbędną dla przetrwania napromieniowanych komórek, podjednostkę $\beta 1$ proteasomu [9].

PA200 wiąże się z proteasomem 20S oddziałując z podjednostkami $\alpha 1$ – $\alpha 6$, a Blm10 wiąże się do wszystkich siedmiu podjednostek α [26]. Otrzymana w ostatnich latach struktura krystaliczna kompleksu Blm10 z proteasomem 20S [22] ujawniła, że dla oddziaływań z proteasomem najważniejszy jest C-koniec białka, obejmujący trzy ostatnie reszty aminokwasowe Tyr-Tyr-Ala, wnikały w kieszeń pomiędzy podjednostkami $\alpha 5$ i $\alpha 6$ proteasomu. C-końcowe reszty aminokwasowe tworzą wiązania wodorowe z resztami aminokwasowymi podjednostek $\alpha 5$ i $\alpha 6$ oraz mostek solny między grupą karboksylową na C-końcu aktywatora, a grupą aminową łańcucha bocznego lizyny w pozycji 66 ($\alpha 6$ Lys66). O roli tego fragmentu łańcucha świadczy fakt, że białka Blm10 i PA200 wykazujące 8% homologii sekwencyjnej, w rejonie oddziałującym z podjednostkami $\alpha 5$ i $\alpha 6$ mają procent homologii wynoszący 28% [22].

W mechanizmie otwierania bramy proteasomu przez aktywator Blm10 najważniejszą funkcję pełni przedostatnia reszta tyrozyny (w niektórych analogach fenyloalaniny). Struktura krystaliczna kompleksu tego białka z proteasomem 20S wykazała, że grupa hydroksylowa w łańcuchu bocznym reszty Tyr tworzy wiązanie wodorowe z atomem tlenu $\alpha 5$ Gly19, stabilizując przyległą $\alpha 5$ Pro17 w takiej samej konformacji, jaka występuje w kompleksie proteasomu z aktywatorem 11S (Rys. 4). Różnica polega na tym, że stabilizacja ułożenia reszty proliny w przypadku kompleksu z Blm10 występuje tylko w podjednostce $\alpha 5$, a nie we wszystkich podjednostkach, i dlatego brama proteasomu zostaje tylko częściowo otwarta [22].

3.3. REGULATOR 19S

Mechanizm otwierania bramy proteasomu przez regulator 19S jest do tej pory najmniej poznany. Wiadomo jedynie, że podjednostki ATPazowe podstawy (Rpt1–Rpt6) tworzą sześciocłonowy pierścień, który w kontakcie z proteasomem powoduje zmiany konformacyjne w obrębie kanału wejściowego, umożliwiające substra-

tom wnikięcie do komory katalitycznej [27]. Przypuszcza się, że w mechanizmie allosterycznego otwierania bramy przez 19S, podobnie jak w aktywatorze Blm10, kluczową rolę odgrywa przedostatnia C-końcowa reszta tyrozyny [21]. Różnica polega na tym, że Blm10 będący pojedynczym łańcuchem białkowym stabilizuje ułożenie Pro17 wyłącznie w podjednostce $\alpha 5$, powodując tylko częściowe otwarcie bramy, natomiast kompleks białkowy, jakim jest 19S może stabilizować ułożenie Pro17 w każdej z siedmiu podjednostek α , powodując pełne otwarcie kanału katalitycznego. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w degradacji substratów – Blm10 aktywuje proteasom przyspieszając hydrolizę peptydów, a 19S umożliwia hydrolizę białek [21].

4. MECHANIZM BIOLOGICZNEJ AKTYWNOŚCI UKŁADU UBIKWITYNA-PROTEASOM

4.1. UBIKWITYNACJA

Białka ulegają degradacji w proteasomach w sposób nieprzypadkowy. Wieloletnie badania mechanizmów rozkładu białek wykazały istnienie zarówno enzymów wyszukujących białka mające ulec degradacji, jak również enzymów znakujących, które pomagają w rozpoznaniu przez proteasom polipeptydu przeznaczanego do destrukcji. Mechanizm znakowania białek jest związany z przyłączeniem małego białka – ubikwityny (Ub), a proces ten zwany ubikwitynacją, może przebiegać zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym [28].

Przyłączenie ubikwityny katalizowane jest przez kaskadę trzech enzymów: enzymu aktywującego ubikwitynę (E1), enzymu koniugującego (E2) oraz ligazy ubikwitynowo-białkowej (E3). Komórki organizmów eukariotycznych zawierają jeden lub kilka rodzajów enzymu E1, natomiast enzymy E2 i E3 występują w wielu różnych odmianach strukturalnych, przy czym E2 tworzą rodzinę białek spokrewnionych ewolucyjnie, natomiast E3 tworzą kilka rodzin [29]. Wiele z tych enzymów należy do supresorów nowotworowych lub onkogenów, co wiąże proces ubikwitynacji z początkami kancerogenezy [30].

C-koniec ubikwityny (reszta Gly76) pełni aktywną rolę podczas procesu przyłączania białek przeznaczonych do degradacji. Już w pierwszym etapie ubikwitynacji następuje utworzenie wiązania tioestrowego między C-końcową grupą karboksylową ubikwityny, a grupą hydrosulfidową enzymu E1, co wymaga udziału ATP. Następnie ubikwityna zostaje przeniesiona na grupę hydrosulfidową kluczowej reszty cysteiny enzymu E1. Drugim etapem jest przemieszczenie aktywowanej ubikwityny na grupę hydrosulfidową enzymu E2, a ostatnim – przeniesienie ubikwityny z E2, przy pomocy E3, na grupę ϵ -aminową białka przeznaczanego do degradacji lub grupę ϵ -aminową reszty lizyny (najczęściej Lys48) następnej cząsteczki ubikwityny.

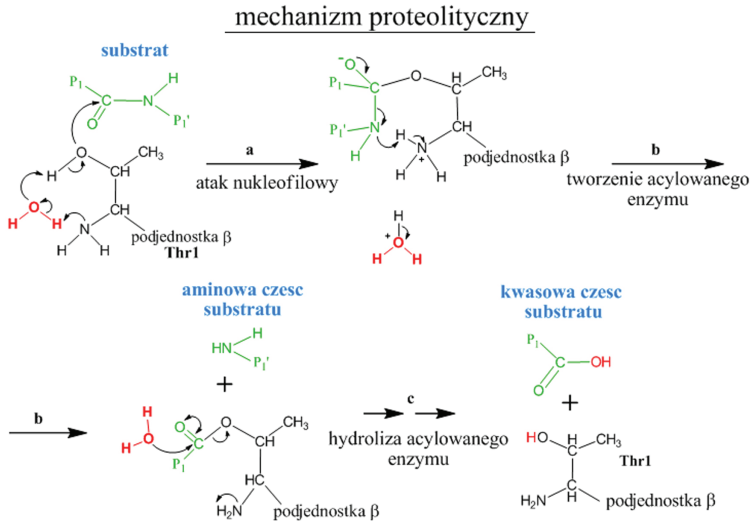
Pomiędzy dwoma białkami, dzięki wykorzystaniu energii pochodzącej z hydrolizy ATP, tworzy się w miarę stabilne wiązanie izopeptydowe [31]. Przyłączenie do docelowego białka tylko jednej cząsteczki ubikwityny stanowi słaby sygnał degradacji, dlatego też proces ubikwitynacji powtarza się aż do momentu, gdy zostanie utworzony odpowiedni łańcuch poliubikwityny zbudowany z czterech lub więcej cząsteczek tego białka [28].

Proteasom 26S rozkłada ubikwitynowane białko, korzystając z energii ATP i nie powodując przy tym degradacji ubikwityny, co umożliwia ponowne jej wykorzystanie.

4.2. MECHANIZM PROTEOLIZY

Jak już wspomniano miejsca aktywne proteasomu u eukariotów zlokalizowane są w podjednostkach β proteasomu 20S. Reszty treoniny w pozycji 1 (Thr1), mające kluczowe znaczenie dla aktywności proteolitycznej, znajdują się w podjednostkach $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 5$. Aktywne podjednostki β proteasomu należą do *N*-końcowych hydrolaz nukleofilowych tzw. Ntn-hydrolaz (ang. *N-terminal nucleophile hydrolase*). Są one syntezowane w postaci nieczynnych prekursorów, które ulegają następnie autokatalizie [8].

Pierwszy etap proteolizy polega na deprotonowaniu grupy hydroksylowej łańcucha bocznego Thr1. Reakcja ta katalizowana jest przez *N*-końcową grupę aminową, która jest akceptorem protonu. Potem następuje nukleofilowy atak anionu alkoholowego aktywowanego proteasomu na węgiel karbonylowy wiązania peptydowego hydrolizowanego łańcucha peptydowego, co prowadzi do powstania tetraedrycznego stanu przejściowego. W kolejnym etapie w wyniku przegrupowania następuje odłączenie aminowej części substratu (z wolną *N*-końcową grupą aminową), a w ostatnim – hydroliza produktu pośredniego z uwolnieniem kwasowej części substratu (z wolną *C*-końcową grupą karboksylową) oraz cząsteczki katalizatora, czyli proteasomu (Rys. 5).



Rysunek 5. Proteolityczny mechanizm hydrolizy wiązania peptydowego przez *N*-końcową Thr aktywnej podjednostki β : a) atak nukleofilowy, b) tworzenie acylowanego enzymu, c) hydroliza acylowanego enzymu [8]

Figure 5. Proteolytic mechanism leading to substrate peptide bond hydrolysis by the *N*-terminal Thr residue of a proteasomal active β subunit: a) nucleophilic attack, b) formation of an acyl-ester intermediate, c) hydrolysis of the acyl-ester bond [8]

4.3. SYGNAŁY DO DEGRADACJI BIAŁEK

Istnieją sygnały wskazujące enzymom biorącym udział w procesie ubikwitynacji, które białko ma zostać przeznaczone do degradacji. Jednym z takich czynników decydujących o okresie półtrwania białek cytoplazmatycznych są reszty aminokwasowe występujące na ich aminowych końcach (Tab. 1). Zależność ta, nazywana regułą *N*-końca, została sformułowana przez Aleksandra Varshavsky'ego w 1986 roku [32]. Białka ulegające degradacji często posiadają na *N*-końcu odpowiednią sekwencję aminokwasową, składającą się z 8–10 aminokwasów, nazywaną sygnałem destrukcji. Motyw ten umożliwia ich rozpoznanie przez enzymy E3 [33]. Przykładowo, okres półtrwania białek drożdżowych zawierających na *N*-końcu metioninę wynosi około 20 godzin, podczas gdy obecność argininy w tej pozycji skraca czas półtrwania tylko do 2 min. Reszty destabilizujące białko, takie jak arginina lub leucyna, silnie stymulują ubikwitynację. Natomiast aminokwasy stabilizujące, np. metionina, działają odwrotnie (Tab. 1) [28].

Tabela 1. Różnice w czasie półtrwania białka ze względu na obecność w jego sekwencji resztę *N*-końcową
 Table 1. Differences in proteins half-life depending on the *N*-terminal amino acid

Reszty silnie stabilizujące ($t_{1/2} > 20$ godz.)		
Ala	Cys	Gly
Pro	Ser	Thr
Val	Met	
Reszty bezpośrednio destabilizujące ($t_{1/2} = 2$ do 30 min.)		
Arg	His	Ile
Lys	Phe	Trp
Reszty destabilizujące po modyfikacji chemicznej ($t_{1/2} = 3$ do 30 min.)		
Asn	Asp	Gln

Innym sygnałem degradacji jest tzw. „kaseta destrukcyjna” (D-box) – sekwencja występująca w niektórych cyklinach i decydująca o degradacji tych białek cyklu komórkowego. Sygnałami degradacji mogą być również szczególne sekwencje aminokwasowe w obrębie polipeptydów, np. bogata w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę sekwencja PEST [28], a także obecna na *N*-końcu, zakodowana w DNA, sekwencja ubikwityny. Takie białka podlegają obligatoryjnej degradacji. Ma ona miejsce np. w przypadku enzymów dokonujących naprawy uszkodzonego DNA, których stabilność mogłaby prowadzić do wystąpienia mutacji [31]. Uważa się, że większość polipeptydów występujących w komórce ma w swojej sekwencji sygnały degradacji. Gdy białka są prawidłowo zwinięte, sygnały kontrolne ukryte są w ich wnętrzu, lecz na skutek denaturacji lub nieprawidłowego sfałdowania mogą one zostać ujawnione, co powoduje skierowanie polipeptydu na ścieżkę degradacji [31].

5. INHIBITORY PROTEASOMU

Czynniki regulatorowe wpływające na aktywność proteasomu dzielą się przede wszystkim na aktywatory i inhibitory. Oprócz modulatorów białkowych Huang i Chen [34] wspominają również o małowcząsteczkowych aktywatorach – oleuropeinie oraz kwasach: linolenowym, linolowym i betulinowym. Mogą one wpływać na wszystkie rodzaje aktywności proteasomu (oleuropeina) lub tylko na jedną z nich (selektywna aktywacja aktywności ChT-L przez kwas betulinowy).

Z kolei inhibitory proteasomu można podzielić na niskocząsteczkowe związki otrzymywane syntetycznie oraz związki pochodzenia naturalnego. Pierwsze inhibitory proteasomu otrzymano pod koniec lat 80. ubiegłego wieku. Stosowano je jako narzędzia laboratoryjne w celu określenia fizjologicznej roli proteasomu w komórce [35]. Pomysł wynalezienia terapii skierowanej na szlak ubikwityno-proteasomowy jeszcze w latach 90. spotykał się z dużym sceptycyzmem, ze względu na rolę, jaką ten szlak pełni w utrzymaniu prawidłowej homeostazy w komórce. Jednak po zatwier-

dzeniu w 2003 roku pierwszego leku będącego inhibitorem proteasomu – bortezomibu – do leczenia opornego szpiczaka mnogiego, intensywność badań nad regulacją systemu ubikwityno – proteasomalnego gwałtownie wzrosła.

Inhibitory proteasomu mogą działać na kilka sposobów. Inhibitor może dezaktywować centrum aktywne proteasomu w wyniku przyłączenia się do *N*-końcowej treoniny i/lub do kieszeni substratowych rozpoznających i przyłączających białka przeznaczone do degradacji [31].

Inhibitory różnią się od siebie grupami funkcyjnymi, które wpływają na ich sposób wiązania się z centrum aktywnym, specyficzność oraz odwracalność wiązania. W celu opracowania kontrolowanego hamowania aktywności proteasomu, zaprojektowano wiele różnorodnych związków chemicznych.

5.1. MAŁOCZĄSTECZKOWE INHIBITORY KOMPETYCYJNE

Inhibitory kompetycyjne są jak dotąd najlepiej poznaną grupą inhibitorów proteasomu. Mają strukturę krótkich peptydów zbudowanych z 2 do 4 aminokwasów. Są one podobne do substratów proteasomu zarówno pod względem struktury jak i właściwości hydrofobowych. Ich farmakofory wiążą się z treoniną tworząc tetraedryczny stan przejściowy lub acylo-enzym. Inhibitory kompetycyjne mogą wiązać się kowalencyjnie lub niekowalencyjnie i to zarówno z rdzeniem 20S jak i z 20S związanym z 11S lub 19S [36]. Najczęściej hamują one aktywność ChT-L proteasomu, ale mogą też wpływać na wszystkie trzy rodzaje peptydazowych aktywności. Poniżej omówione zostaną główne grupy inhibitorów proteasomu o szkielecie peptydowym.

5.1.1. Peptydyloaldehydy

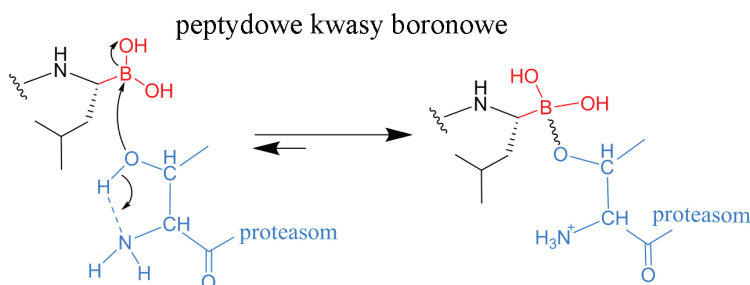
Peptydyloaldehydy to pierwsza i jak dotąd najlepiej poznana grupa inhibitorów proteasomu, będących także inhibitorami proteaz serynowych i cysteinowych [15]. Mechanizm inhibicji polega na utworzeniu wiązania kowalencyjnego między grupą aldehydową inhibitora, a grupą hydroksylową reszty treoniny, co prowadzi do utworzenia ugrupowania hemiacetalowego. Reakcja ta jest odwracalna w warunkach fizjologicznych [19].

W literaturze często spotyka się inhibitory o numeracji MG-XXX. Są to związki opracowane przez zespoły badawcze współpracujących ze sobą naukowców Adamsa i Steina. Najlepiej zbadanym przedstawicielem tej grupy związków jest MG-132 (Z-LLL-H). Jest on inhibitorem odwracalnym, selektywnie hamującym aktywność ChT-L proteasomu. W komórkach białaczkowych indukuje apoptozę zależną od białka p53 [30].

5.1.2. Peptydowe kwasy boronowe

Przeprowadzono wiele badań, które udowodniły rolę proteasomu w terapii przeciwnowotworowej. Ponieważ dostępne inhibitory nie działały wybiórczo na szlak proteasomalny, Adams wraz z współpracownikami, poszukując związków bardziej selektywnych, zaprojektowali inhibitory będące pochodnymi kwasu boronowego, które wykazują wprawdzie aktywność także wobec proteaz serynowych, ale w przeciwieństwie do peptydyloaldehydów, nie hamują aktywności proteaz cysteinowych. Większość związków z ugrupowaniem boronowym wykazało aktywność w obrębie panelu 60 nowotworowych linii komórkowych zgromadzonych w Narodowym Instytucie Raka (NCI) [37].

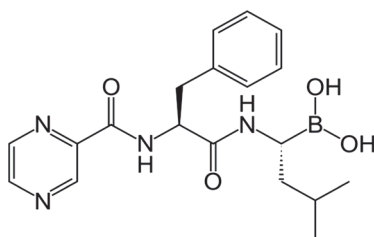
Istnieje przypuszczenie, że przyczyną znacznej aktywności peptydowych pochodnych kwasu boronowego jest tworzenie pseudokowalencyjnego wiązania pomiędzy wolnym orbitalem p atomu boru, a wolną parą elektronową atomu tlenu z grupy hydroksylowej Thr1. Prowadzi to do powstawania stabilnych, tetraedrycznych produktów przejściowych, których szybkość dysocjacji jest znacznie mniejsza niż w przypadku adduktów proteasomu z grupami aldehydowymi (Rys. 6) [15].



Rysunek 6. Mechanizm inhibicji proteasomu przez peptydowe kwasy boronowe [15]

Figure 6. Mechanism of proteasome inhibition by peptide boronic acids [15]

Spośród przebadanych w NCI związków, opierając się na ich specyficzności działania oraz efekcie cytotoksycznym, do dalszych badań klinicznych wybrano MG-341 (PS-341, bortezomib, (2-Pyz)-C(O)-FL-B(OH)₂) (Rys. 7), który specyficznie hamuje aktywność podjednostek $\beta 1$ oraz $\beta 5$, nie wpływając na aktywność $\beta 2$. Jest to pierwszy inhibitor proteasomu, który przeszedł wszystkie testy kliniczne i został zaakceptowany jako lek. Stosuje się go w leczeniu szpiczaka mnogiego oraz chłoniaka nieziarnicznego, a ostatnie badania pokazują, że może być on także skuteczny w leczeniu innych nowotworów złośliwych: raka płuc, niedrobnokomórkowego raka oskrzeli, raków nosogardzieli oraz raka nerki [38, 39].

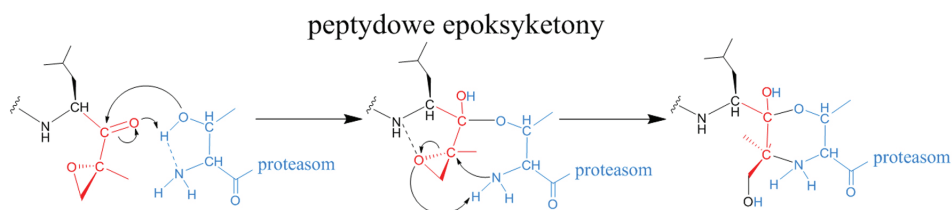


Rysunek 7. Bortezomib jako przykład peptydowego inhibitora proteasomu z C-kończącą grupą kwasu boronowego

Figure 7. Bortezomib as an example of peptidic proteasome inhibitors with C-terminal boronate

5.1.3. Peptydowe epoksyketony

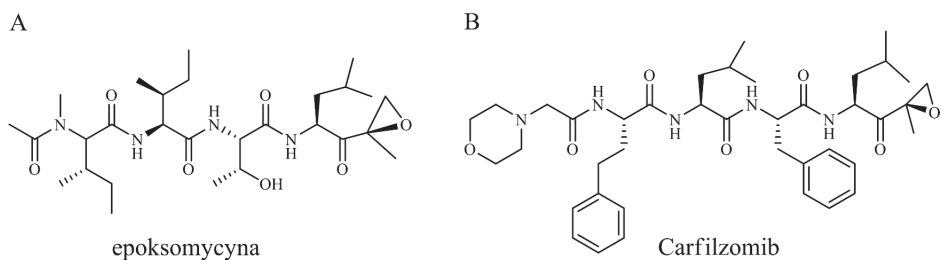
Ta klasa związków charakteryzuje się największą specyficnością wśród inhibitorów proteasomu. Peptydowe epoksyketony nie hamują innych proteaz, takich jak: kalpaina, tripsyna, chymotrypsyna, papaina oraz katepsyny [40]. Ich selektywność wynika z mechanizmu inhibicji – związki te jako jedyne tworzą nieodwracalne wiązanie zarówno z grupą hydroksylową jak i aminową Thr1, co prowadzi do powstania sześcioczłonowego pierścienia morfolinowego (Rys. 8) [15].



Rysunek 8. Mechanizm inhibicji proteasomu przez peptydowe epoksyketony [15]

Figure 8. Mechanism of proteasome inhibition by peptide epoxyketone [15]

Do przedstawicieli α,β' -epoksyketonów należą zarówno związki pochodzenia naturalnego np. epoksomycyna (Rys. 9A) jak i syntetycznego np. Carfilzomib (Rys. 9B). Carfilzomib jest jedynym związkiem tej klasy będącym w trakcie badań klinicznych (obecnie w trzeciej fazie). Jest to nieodwracalny inhibitor aktywności ChT-L, który wykazuje wysoką aktywność porównywalną do aktywności bortezomibu, ale znacznie wyższą selektywność [41].



Rysunek 9. Przykłady inhibitorów proteasomu z grupą epoksyketonową: a) pochodzenia naturalnego – epoksomycyna, b) syntetyczne – Carfilzomib

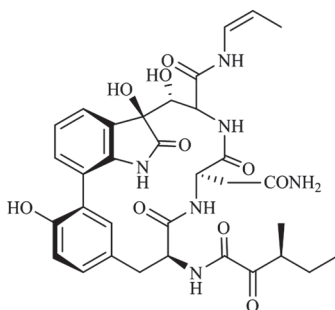
Figure 9. Examples of peptide epoxyketone as proteasome inhibitors: a) natural-epoxomicin, b) synthetic – Carfilzomib

5.1.4. Peptydowe winylosulfony

Peptydowe winylosulfony są syntetycznymi, nieodwracalnymi inhibitorami proteasomu po raz pierwszy opisanymi przez Bogoy i współpracowników w 1997 roku [42]. Związki należące do tej klasy inhibitorów charakteryzują się niską selektywnością, wykazując duże powinowactwo do proteaz serynowych. Ich mechanizm działania polega na utworzeniu kowalencyjnego wiązania z resztą hydroksylową grupy Thr1 proteasomu w reakcji Michaela [15].

5.1.5. TMC-95

W przeciwieństwie do wcześniej opisanych inhibitorów kompetycyjnych TMC-95 oddziałuje z proteasomem w sposób niekowalencyjny. Ten naturalny, cykliczny związek, zbudowany z trzech zmodyfikowanych reszt aminokwasowych (Rys. 12), blokuje wszystkie miejsca aktywne proteasomu, wiążąc się za pomocą rozbudowanej sieci wiązań wodorowych z katalitycznymi podjednostkami β , i nie wywołując przy tym zmian w obrębie reszty Thr1 [43].



Rysunek 10. Struktura związku TMC-95

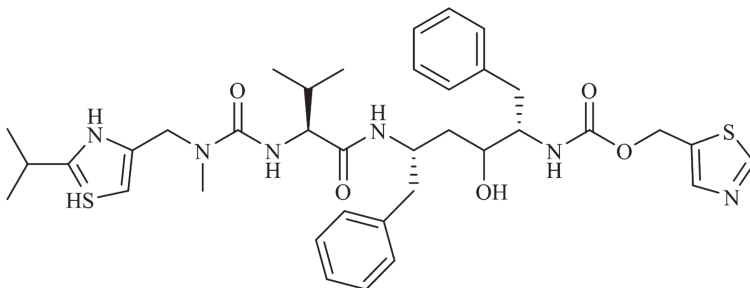
Figure 10. The structure of TMC-95

5.2. INHIBITORY NIEKOMPETYCYJNE

Inhibitory niekompetycyjne nie współzawodniczą z substratem o miejsce aktywne enzymu, zamiast tego oddziałują z podjednostkami niekatalitycznymi proteasomu, zwiększając lub zmniejszając skuteczność działania tego enzymu. Są one bardzo zróżnicowane pod względem chemicznym, należą do nich: białka i kompleksy białkowe, peptydy i ich pochodne, alkaloidy, antracykliny, a także produkty peroksydacji lipidów. Możliwości wpływania tego rodzaju związków na aktywność proteasomu są ogromne, choć jak dotąd słabo poznane. Oto kilka przykładowych niekompetycyjnych inhibitorów proteasomu.

5.2.1. Rytonawir

Rytonawir (Rys. 11) oddziałuje zarówno z centrum katalitycznym, jak i podjednostkami niekatalitycznymi proteasomu. Stosuje się go w terapii chorych na AIDS. Co ciekawe, został on zaprojektowany z myślą o kompetycyjnym blokowaniu centrum aktywnego proteazy aspartylowej wirusa HIV, jednak okazało się, że wpływa on również na hamowanie aktywności ChT-L proteasomu. Wiąże się on z enzymem niekowalencyjnie i odwracalnie [20].



Rysunek 11. Struktura rytonawiru – niekompetycyjnego inhibitora proteasomu

Figure 11. The structure of ritonavir – a noncompetitive inhibitor of the proteasome activity

5.2.2. Peptydy bogate w prolinę i argininę (peptydy PR)

Inhibitory tej grupy wywodzą się od PR39 – bogatego w reszty proliny i argininy 39-aminokwasowego peptydu (Rys. 12) o właściwościach przeciwbakteryjnych. Blokuje on także syntezę DNA oraz białek, indukuje angiogenezę, łagodzi stany zapalne, pomaga w leczeniu ran, chroni serce przed uszkodzeniami niedokrwienno-reperfuzyjnymi oraz blokuje przerzuty raka wątrobowo-komórkowego [20].

Badania wykazały, że 11-aminokwasowy *N*-końcowy fragment PR39 oddziałuje z pierścieniem α proteasomu 20S, uniemożliwiając efektywne otwieranie kanału katalitycznego. Miejsce wiązania peptydu najprawdopodobniej zlokalizowane jest

na zewnętrznej krawędzi pierścienia α , co sugeruje znaczną siłę allosterycznego oddziaływania [44]. Peptydy bogate w prolinę i argininę inhibują niekompetycyjnie i odwracalnie aktywność ChT-L oraz PGPH proteasomu, bardzo słabo wpływając na aktywność T-L [20].

R¹RRRPPPYLPRRPPPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRF³⁹

Rysunek 12. Sekwencja PR39 – peptydu bogatego w reszty proliny i arginy

Figure 12. The sequence of PR39 – proline and arginine-rich peptide

5.2.3. Białko HIV-1 Tat

Białko Tat (transaktywator ekspresji genów) jest jednym z dwóch istotnych czynników ekspresji genów wirusa HIV. Jest to małe białko, zbudowane, w zależności od typu wirusa, z 86–104 aminokwasów, jednak niekompletne formy tego wirusowego białka, zawierające od 58 do 72 aminokwasów, również wykazują aktywność biologiczną [45].

Odkryto, że białko Tat powoduje inhibicję aktywności ChT-L proteasomu oraz konkuruje z aktywatorem 11S (REG) w wiązaniu się do proteasomu 20S [46]. Porównanie struktury białka Tat i aktywatora REGa wykazało, że na powierzchni obu tych białek znajdują się trzy naładowane reszty aminokwasowe. Dla Tat są to: Lys51, Arg52 i Asp67, a dla REGa: Glu235, Lys236 i Lys239. Ponieważ sekwencje obejmujące te aminokwasy pośredniczą w wiązaniu do proteasomu 20S zostały nazwane miejscem RTP (ang. *REG/Tat-20S proteasome-binding*) Miejsce RTP obejmuje sekwencję od reszty 37 do 72, w której najważniejszy fragment stanowi tzw. zasadowa domena RKKRRQRRR (reszty 49–57) (Rys. 13) [47].

CFITKGLGISYGR⁴⁹KKRRQRRR⁵⁷PSQGGQTHQDPIPKQ

Rysunek 13. Fragment sekwencji białka Tat. Podkreślono aminokwasy tworzące zasadową domenę (reszty 49–57)

Figure 13. The part of Tat protein sequence. Underlined are amino acids forming a basic domain (residues 49–57)

Proteasomy są skomplikowanymi kombinatami proteolitycznymi zaangażowanym w wiele procesów zachodzących w komórce. Ich powiązanie z licznymi chorobami sprawiło, że stanowią cel działania projektowanych inhibitorów. Jednak wynalezienie skutecznego i selektywnego inhibitora bądź aktywatora proteasomu wymaga poznania dokładnej struktury oraz funkcji poszczególnych proteosomalnych kompleksów, a także zrozumienia ścieżek przekazywania sygnałów w tej ogromnej, proteolitycznej maszynie.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Ciechanover, Proc. Am. Thorac. Soc., 2006, **3**, 21.
- [2] G. Tan, T.A. Waldmann, Cancer Res., 2002, **62**, 1083.
- [3] S. Paul, Bioessays, 2008, **30**, 1172.
- [4] J. Pan, Q. Zhang, Y. Wang, M. You, *26S Proteasome Activity Is Down-Regulated in Lung Cancer Stem-Like Cells Propagated In Vitro* [online], PLOS One, [2011-05-20], dostępny w internecie: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0013298>.
- [5] J. An, Y. Sun, M. Fisher, M.B. Rettig, Mol. Cancer Ther., 2004, **3**, 727.
- [6] H. Seo, K.C. Sonntag, W. Kim, E. Cattaneo, O. Isacson, *Proteasome activator enhances survival of Huntington's disease neuronal model cells* [online] PLOS One, [2011-06-02], dostępny w internecie: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1800909/?tool=pubmed>.
- [7] M. Gaczyńska, P.A. Osmulski, W.F. Ward, Mech. Ageing. Dev., 2001, **122**, 235.
- [8] A.J. Marques, R. Palanimurugan, A.C. Matias, P.C. Ramos, R.J. Dohmen, Chem. Rev., 2009, **109**, 1509.
- [9] T. Jung, B. Catalgol, T. Grune, Mol. Aspects Med., 2009, **30**, 191.
- [10] M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. Bartunik, R. Huber, Nature, 1997, **386**, 463.
- [11] C. Cardozo, A. Vinitzky, C. Michaud, M. Orlowski, Biochemistry, 1994, **33**, 6483.
- [12] D.L. Mykles, M.F. Haire, Biochem. J., 1995, **306**, 285.
- [13] L. Borissenko, M. Groll, Chem. Rev., 2007, **107**, 687.
- [14] J. Li, M. Rechsteiner, Biochimie, 2001, **83**, 373.
- [15] A.F. Kisselev, A.L. Goldberg, Chem. Biol., 2001, **8**, 739.
- [16] M. Rechsteiner, C. Realini, V. Ustrell, Biochem. J., 2000, **345**, 1.
- [17] D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister, Annu. Rev. Biochem., 1999, **68**, 1015.
- [18] M. Groll, M. Bajorek, A. Köhler, L. Moroder, D.M. Rubin, R. Huber, M.H. Glickman, D. Finley, Nat. Struct. Biol., 2000, **7**, 1062.
- [19] P.A. Osmulski, M. Gaczyńska, Biochemistry, 2002, **41**, 7047.
- [20] X. Tan, P.A. Osmulski, M. Gaczyńska, Curr. Med. Chem., 2006, **13**, 155.
- [21] B.M. Stadtmueller, C.P. Hill, Mol. Cell, 2011, **41**, 418.
- [22] K. Sadre- Bazzaz, F.G. Whitby, H. Robinson, T. Formosa, C.P. Hill, Mol. Cell, 2010, **37**, 728.
- [23] M. Groll, M. Bajorek, A. Köhler, L. Moroder, D.M. Rubin, R. Huber, M.H. Glickman, D. Finley, Nat. Struct. Biol., 2000, **7**, 1062.
- [24] Z. Zhang, A. Clawson, C. Realini, C.C. Jansen, J. R. Knowlton, C.P. Hill, M. Rechsteiner, Proc. Nat. Acad. Sci., 1998, **95**, 2807.
- [25] E. Jankowska, M. Gaczyńska, P. Osmulski, E. Sikorska, R. Rostankowski, S. Madabhushi, M. Tokmina-Łukaszewska, F. Kasprzykowski, Biopolymers, 2010, **93**, 481.
- [26] J. Ortega, J.B. Heyman, A.K. Kajava, V. Ustrell, M. Rechsteiner, A.C. Sterem, J. Mol. Biol., 2005, **346**, 1221.
- [27] K. Tanaka, Proc. Jpn. Acad. Ser. B, 2009, **85**, 12.
- [28] L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa, 2005.
- [29] R. Debigare, S.R. Price, Am. J. Physiol. Renal Physiol., 2003, **285**, F1.
- [30] A. Jurszczyń, A.B. Skotnicki, Adv. Clin. Exp. Med., 2006, **15**, 309.
- [31] A. Kazula, E. Kazula, Farmacja Polska, 2009, **65**, 511.
- [32] A. Varshavsky, Genes Cells, 1997, **2**, 13.
- [33] M. Hochstrasser, Nature Cell Biol., 2000, **2**, E153.
- [34] L. Huang, C.H. Chen, Curr. Med. Chem., 2009, **16**, 931.
- [35] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, Science, 1995, **268**, 533.
- [36] M. Gaczyńska, P.A. Osmulski, Curr. Med. Chem. – Immun., Endoc. Metab. Agents, 2002, **2**, 279.

- [37] J. Adams, V.J. Palombella, E.A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D.D. Lazarus, J. Maas, C.S. Pien, S. Prakash, P. J. Elliott, *Cancer Res.*, 1999, **59**, 2615.
- [38] C.E. Denlinger, M.D. Keller, M.W. Mayo, R.M. Broad, D.R. Jones, *J. Thorac. Cardio. Sur.*, 2004, **127**, 1078.
- [39] C. Aghajanian, S. Soignet, D. S. Dizon, C. S. Pien, J. Adams, P. J. Elliott, P. Sabbatini, V. Miller, M.L. Hensley, S. Pezzulli, C. Canales, A. Daud, D. R. Spriggs, *Clin. Cancer Res.*, 2002, **8**, 2505.
- [40] L. Meng, R. Mohan, B.H. Kwok, M. Eloffsson, N. Sin, Crews C.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 10403.
- [41] S.D. Demo, C.J. Kirk, M.A. Aujay et al., *Cancer Res.*, 2007, **67**, 6383.
- [42] M. Bogyo, J. S. McMaster, M. Gaczyńska, D. Tortorella, A. L. Goldberg, H. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**, 6629.
- [43] M. Groll, M. Götz, M. Kaiser, E. Weyher, L. Moroder, *Chem. Biol.*, 2006, **13**, 607.
- [44] M. Gaczynska, P.A. Osmulski, Y. Gao, M.J. Post, M. Simons, *Biochemistry*, 2003, **42**, 8663.
- [45] A. Pugliese, V. Vidotto, T.S. Beltramo, S. Petrini, D. Torre, *Cell Biochem. Funct.*, 2005, **23**, 223.
- [46] M. Seeger, K. Ferrell, R. Frank, W. Dubiel, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 8145.
- [47] X. Huang, U. Seifert, U. Salzmänn, P. Henklein, R. Preissner, W. Henke, A.J. Sijts, P.M. Kloetzel, W. Dubiel, *J. Mol. Biol.*, 2002, **323**, 771.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 sierpnia 2012