

Komórkowi czyszciciele



Dr Agnieszka Podlaska pracuje nad procesami regulującymi funkcjonowanie proteasomu w komórkach drożdży

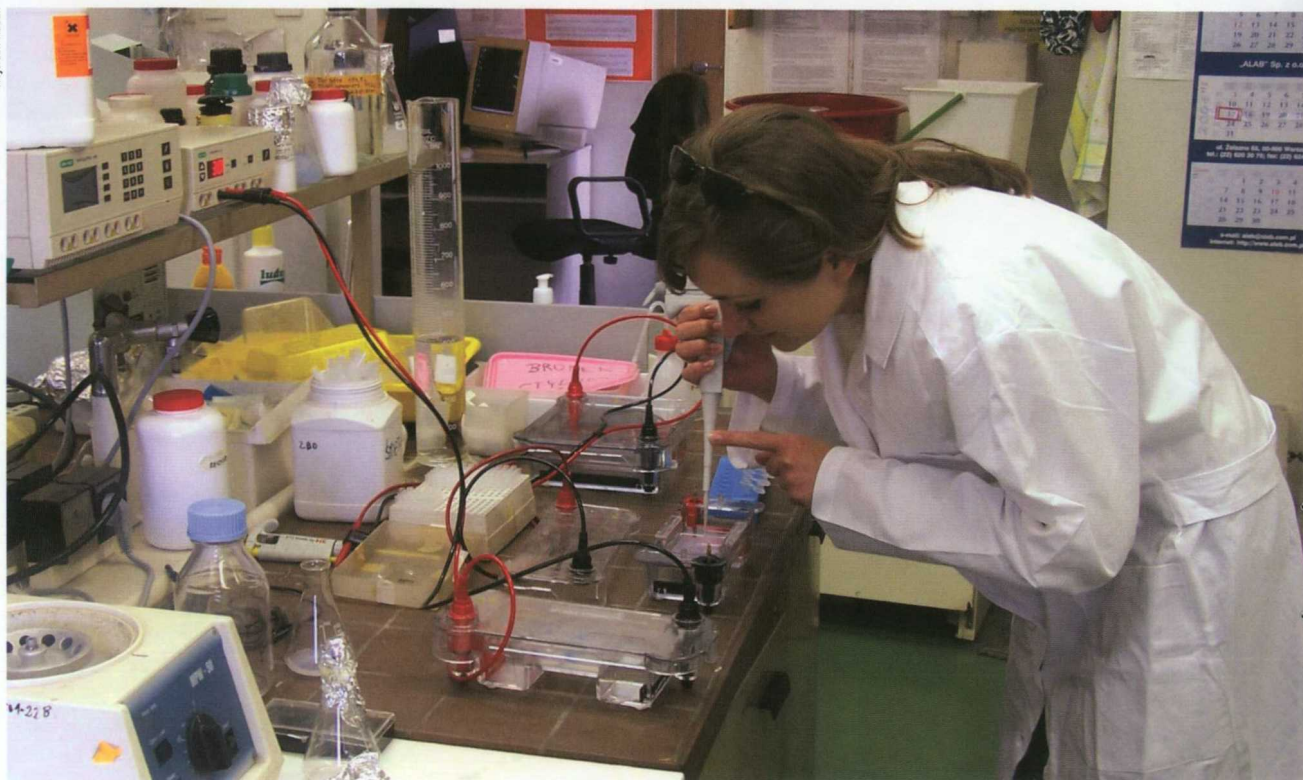
AGNIESZKA PODLASKA
Instytut Biochemii i Biofizyki, Warszawa
Polska Akademia Nauk
gala@ibb.waw.pl

Najważniejsze procesy komórkowe rzadko kojarzą się z rozpadem cząsteczek. Tymczasem integralność komórki nie może być zachowana, jeśli reakcjom syntezy nie towarzyszy jednocześnie precyzyjnie regulowana degradacja

W komórkach naszego organizmu toczą się ciągle przemiany budujących je składników. Jednocześnie następuje synteza i degradacja bardzo różnorodnych grup białek - podstawowego budulca wszystkich organizmów. Procesy te można porównać z pracami na placu budowy. Niczym nowe domy na podstawie projektu tak w komórce niezbęd-

ne w danej chwili białka powstają na bazie informacji genetycznej poprzez łączenie pojedynczych „cegielek” - aminokwasów w długie łańcuchy. Z kolei niepotrzebne czy nieprawidłowo zbudowane lub uszkodzone białka podlegają „rozbiórce” na aminokwasy. Ta rozbiórka, czyli degradacja, zachodzi głównie na drodze tzw. ubikwitynozależnej proteolizy. Funkcjonowanie tego procesu pozwala z jednej strony utrzymać w komórce porządek, uniemożliwiając kumulację niepotrzebnych i uszkodzonych białek, tym samym chroniąc komórkę przed śmiercią, a z drugiej - umożliwia uzyskanie mniejszych, biologicznie aktywnych fragmentów białka lub odzyskanie wolnych aminokwasów służących do budowy nowych struktur. Destrukcja białek odgrywa też kluczową rolę w regulacji bardzo różnych procesów wewnątrzkomórkowych. Dla przykładu degradacja niektórych białek zwanych inhibitorami prowadzi do aktywacji szlaków biochemicznych w komórce, innym razem

Wojciech Kuban



Proces ubikwitynozależnej degradacji białek został poznany w latach 80. XX w. i jest badany w wielu laboratoriach na całym świecie. W 2004 roku za prace na ten temat przyznano Nagrodę Nobla z dziedziny chemii

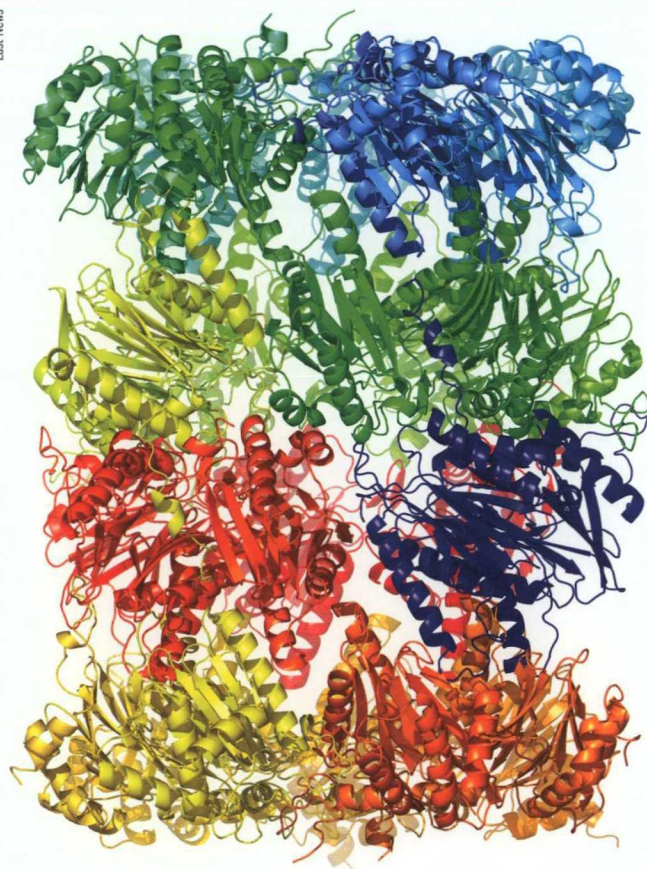
proteoliza białka aktywatora może działać jak hamulec bezpieczeństwa pozwalający na natychmiastowe zatrzymanie zachodzącego w komórce procesu.

Miniaturowe szpuleczki

W jaki sposób działa ubikwitynozależna degradacja białek? Proces ten angażuje struktury przypominające wyglądem miniaturowe szpuleczki zwane proteasomami. Są to wyspecjalizowane „rozdrabniacze” białek. Komórka ludzka zawiera około 30 tys. proteasomów. Zlokalizowane są one zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze komórkowym, a ich liczba zmienia się w komórce w zależności od zapotrzebowania na destrukcję. Bardzo ogólnie mówiąc, proteasom zbudowany jest z dwóch wielobiałkowych elementów. Pierwszy to przypominający cylinder rdzeń, posiadający wewnętrzny kanał. Właśnie w tym kanale zachodzi rozpad białka. Kanał jest zbudowany z 4 pierścieni, których niektóre podjednostki to peptydazy, enzymy proteolityczne odpowiedzialne za degradację białek, a więc, mówiąc obrazowo, „noże” umożliwiające cięcie wiązań pomiędzy poszczególnymi aminokwasami budującymi białko. Kolejne elementy proteasomu to tzw. czapeczki regulatorowe położone po jednej lub po dwóch stronach cylindra, odpowiedzialne za rozpoznanie białka przeznaczonego do degradacji oraz jego transport do wnętrza rdzenia.

Pocałunek śmierci

Jak są rozpoznane białka kierowane do degradacji przez proteasom? W komórkach istnieje pewnego rodzaju kontrola jakości białek. Jedni jej funkcjonariusze w postaci wyspecjalizowanych enzymów wyszukują białka, które trzeba zdegradować. Inne enzymy znakują owe białka, umożliwiając tym samym łatwe ich rozpoznanie przez proteasom. Wspomniana swego rodzaju „metka” to łańcuch specyficznie połączonych ze sobą małych (długości 72 aminokwasów) białek o nazwie ubikwityna. Przyłączenie łańcucha ubikwitynowego nazywane jest obrazowo „pocałunkiem śmierci”. Białko tak wyznakowane już nie ma szans na przetrwanie. Sprawne działanie zarówno procesu przyłączania molekularnej metki w postaci ubikwityny do białka, jak i samej jego degradacji ma kluczowe znaczenie dla komórki. I nie chodzi tu tylko o usuwanie białek uszkodzonych lub



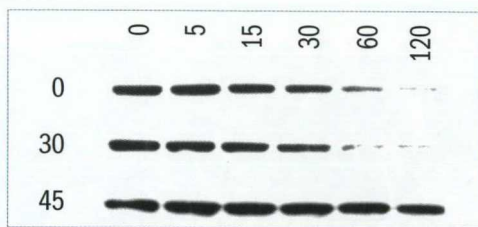
starych. Poprzez degradację wielu ważnych białek, chociażby p27, p53, NF- κ B, regulacji ulegają takie procesy komórkowe, jak podziały komórki, aktywacja genów, odpowiedź immunologiczna organizmu, procesy związane z naprawą uszkodzeń DNA i apoptoza. Niewłaściwe funkcjonowanie procesu ubikwitynozależnej proteolizy prowadzi do niektórych odmian nowotworów złośliwych. Defekt tego procesu związany jest także z szeregiem chorób układu nerwowego takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona.

Proces ubikwitynozależnej degradacji białek został poznany w latach 80. ubiegłego stulecia. Ze względu na złożoność proteolizy i możliwości jego wpływu na bardzo wiele mechanizmów komórkowych, proces badany jest do dziś w wielu laboratoriach na całym świecie. Część z tych badań została uhonorowana Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii w 2004 roku, a otrzymali ją dwaj Izraelczycy, Aaron Ciechanover i Avram Hershko, oraz Amerykanin Irvin Rose. Od początku 2000 roku badania nad funkcją proteasomu prowadzone są także w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Pracowni Mutagenety i Repe-

Rdzeń proteasomu przypomina wydrążony w środku walec. Przeznaczone do degradacji białko jest wsuwane do kanału i trawione przez enzymy – „noże”

Degradacja białek

Drożdżowa polimeraza DNA do zadań specjalnych - Pol η - ma krótki czas półtrwania (od lewej do prawej strony czarny prążek - Pol η - zanika). Jednak jeśli w komórce pojawią się uszkodzenia (tu na skutek promieniowania UV) - życie polimerazy wydłuża się. Liczby 0, 30, 45 w kolejnych rzędach to minuty, które upłynęły od zadziałania UV



Adrianna Skoneczna

racji DNA pod kierunkiem doc. dr hab. Ewy Śledziewskiej-Gójskiej.

Tolerancja na uszkodzenia

Nasz zespół bada między innymi udział proteasomu w kontroli procesów naprawy uszkodzeń DNA, wykorzystując do badań drożdże jako modelowe organizmy wyższe. Uszkodzenia DNA powstają na skutek działania licznych czynników zewnętrznych i wewnętrznych. Nieprawidłowości struktury DNA zaburzają procesy replikacji, co dalej wiąże się z ryzykiem powstawania niebezpiecznych mutacji. Dlatego właśnie komórki wykształciły szereg mechanizmów, które pozwalają wykryć i usunąć uszkodzenia materiału genetycznego. Pokazaliśmy, że prawidłowe działanie proteasomu jest niezbędne do funkcjonowania jednego z takich mechanizmów tzw. postreplikacyjnej naprawy uszkodzeń DNA. Mechanizm ten jest o tyle specyficzny, że pozwala komórce powielać materiał genetyczny pomimo istnienia uszkodzeń w DNA. Główna polimeraza replikacyjna odpowiedzialna za kopiowanie informacji genetycznej nie jest w stanie kontynuować pracy, kiedy na swojej drodze natyka się na uszkodzenie manifestujące się zmianą struktury DNA. Polimeraza wraz z towarzyszącymi jej białkami wspomagającymi proces replikacji „spada” wówczas z powielanej matrycy DNA, przez co synteza nowej nici zostaje zatrzymana. Naprawa postreplikacyjna pozwala wtedy przeżyć komórce mimo istnienia uszkodzeń, umożliwiając kontynuację replikacji i przekazanie komórce potomnej pełnej, choć zawierającej błędy, informacji genetycznej.

Jeden z głównych mechanizmów naprawy postreplikacyjnej angażuje tzw. polimerazy alternatywne (por. „Wierni kopiści”, „Academia” nr 4/2007). Nieco odmienna budowa tych polimeraz w stosunku do polimeraz replikacyjnych pozwala im na tolerowanie uszkodzeń DNA kosztem niskiej wydajności ich syntezy - składają one jedynie krótkie odcinki DNA. Polimeraza ζ (*zeta*, Pol ζ) i polime-

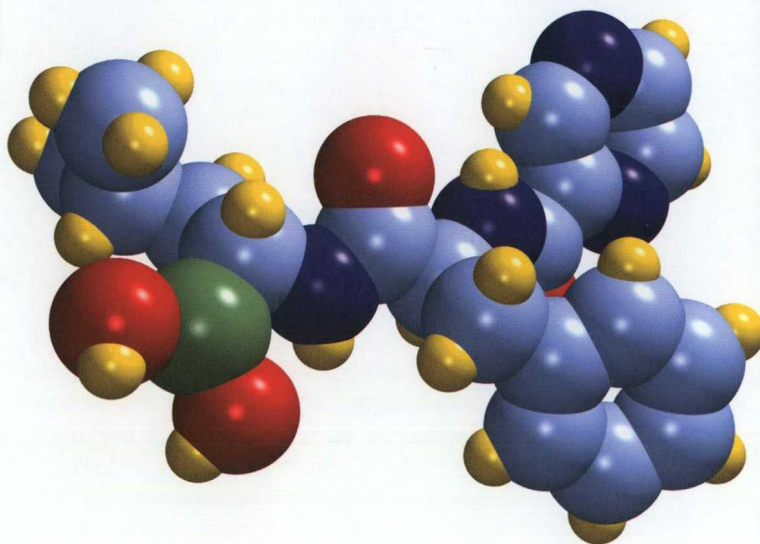
raza η (*eta*, Pol η) to dwie polimerazy niereplikacyjne funkcjonujące w komórkach drożdży i człowieka. Podstawową cechą pierwszej z nich jest kontynuacja syntezy DNA, nawet jeśli wcześniej pojawi się w nowosyntetyzowanej nici błąd: zostanie wstawiony nieprawidłowy nukleotyd. Jednak ta zdolność, której zasadniczo nie posiadają regularne polimerazy replikacyjne, prowadzi w konsekwencji do utrwalenia błędu i powstania mutacji. Ponadto Pol ζ wstawia prawidłowy nukleotyd, gdy w nici matrycowej (która służy jako wzorzec do syntezy) znajduje się uszkodzona tymina, np. glikol tymidylowy, powstający pod wpływem działania czynników stresu oksydacyjnego. Również ta cecha polimerazy ζ odróżnia ją od polimeraz replikacyjnych.

Białko ściśle nadzorowane

Pol η z kolei potrafi bezbłędnie replikować inne uszkodzenia DNA, np. dimery tyminowe powstające w wyniku działania promieniowania UV. Jednak powielając nieuszkodzony DNA, myli się aż 1 tys. - 10 tys. razy częściej niż polimeraza replikacyjna. Zarówno nadmiar tej polimerazy, jak i jej brak są szkodliwe dla komórki. Mutacja w genie ją kodującym u człowieka prowadzi do tragicznej choroby zwanej *Xeroderma Pigmentosum Variant*, w której komórki są bardzo wrażliwe na mutagenne działanie promieniowania UV, co drastycznie zwiększa szansę na rozwój raka skóry u chorych.

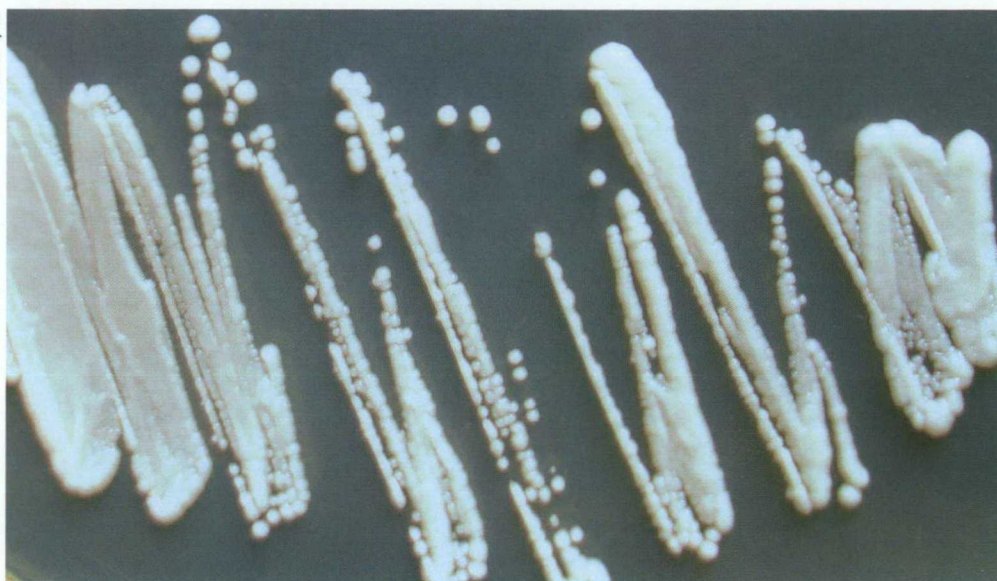
Obecność polimeraz alternatywnych w komórce bywa zatem zbawienna w przypadku działania czynników uszkadzających DNA.

Metodą leczenia może być wytwarzanie substancji hamujących aktywność proteasomu. Grafika ukazuje model inhibitora proteasomu testowanego w terapii szpiczaka. Kule błękitne - atomy węgla, żółte - wodoru, zielone - boru, granatowe - azotu, czerwone - tlenu



East News

Marta Filus-Kryńska



Badanie prostych organizmów, takich jak drożdże piekarskie (*Saccharomyces cerevisiae*), pomaga odkrywać procesy i mechanizmy działania komórek wyższych organizmów, także ludzkich

Może jednak być też niebezpieczna, ponieważ ich funkcjonowanie zwiększa liczbę mutacji w DNA. Z tego powodu liczba tych białek w komórce oraz ich dostęp do widełek replikacyjnych muszą być ściśle kontrolowane. Jedną z metod kontroli ilości „niebezpiecznych”, chociaż potrzebnych w sytuacjach wyjątkowych, enzymów może być celowe ich usuwanie. Rzeczywiście – z naszych badań jednoznacznie wynika, że kontrola stężenia alternatywnych polimeraz odbywa się w komórce drożdży na drodze ubikwitynozależnej proteolizy.

Białko nietrwałe

Pokazaliśmy, że kodowana w komórkach drożdży przez gen *RAD30* Pol η jest „metkowana” łańcuchem ubikwityn i dzięki temu degradowana przez proteasom. Jak ustaliliśmy, czas półtrwania tego białka (czas, w którym połowa białka ulega degradacji) jest krótki, wynosi ok. 20 minut. Okazało się również, że w odpowiedzi na powodujące uszkodzenia DNA promieniowanie UV czas życia białka znacząco się wydłuża, zatem istnieje aktywny system pozwalający Pol η uniknąć degradacji w chwilach zagrożenia dla komórki. To pierwszy uzyskany na świecie wynik, który pokazuje, że od sprawnie funkcjonującej ubikwitynozależnej proteolizy zależy prawidłowa kontrola działania alternatywnych polimeraz DNA w komórkach eukariotycznych.

Pozyskiwana dzięki pracy wielu laboratoriów szeroka wiedza na temat regulowania przez ubikwitynozależną proteolizę róż-

norakich procesów wewnątrzkomórkowych służy projektowaniu nowych terapeutyków. Inhibitory proteasomu były dwa lata temu wprowadzone do praktyki klinicznej w leczeniu szpiczaka mnogiego. Planowane jest rozszerzenie ich stosowania w innych chorobach nowotworowych, trwają badania nad ich zastosowaniem w leczeniu udaru czy chorób serca. Wygląda jednak na to, że aktywność proteasomu może regulować wiele procesów w komórce, przez co hamowanie jego aktywności może dawać немало efektów ubocznych. Badania funkcji proteolizy pomogą zatem pełniej ocenić ryzyko używania w terapii czynników hamujących działanie proteasomu. Z drugiej strony ułatwią projektowanie bardziej specyficznych inhibitorów, hamujących ściśle określone procesy komórkowe. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

- Broughton B.C., Cordonnier A., Kleijer W.J., Jaspers N.G., Fawcett H., Raams A., Garritsen V.H., Strydom A., Avril M.F., Boudsocq F., Masutani C., Hanaoka F., Fuchs R.P., Sarasin A., Lehmann A.R. (2002). Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, 22, 815-820.
- Podlaska A., McIntyre J., Skoneczna A., Sledziwska-Gojska E. (2003). The link between 20S proteasome activity and post-replication DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 49, 1321-1332.
- Skoneczna A., McIntyre J., Skoneczny M., Policinska Z., Sledziwska-Gojska E. (2007). Polymerase eta is a short-lived, proteasomally degraded protein that is temporarily stabilized following UV irradiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, 366 (4), 1074-86.