

osvrti

Nobelova nagrada za kemiju 2004.

Dobitnici: *Aaron Clechanover, Avram Hershko i Irwin Rose za otkriće degradacije staničnih proteina ovisne o ubikvitinu*

Ivana Weygand-Đurašević

Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Strossmayerov trg 14, 10000 Zagreb



Aaron Clechanover, Technion, Israelski institut za tehnologiju, Haifa, Izrael



Avram Hershko, Technion, Israelski institut za tehnologiju, Haifa, Izrael

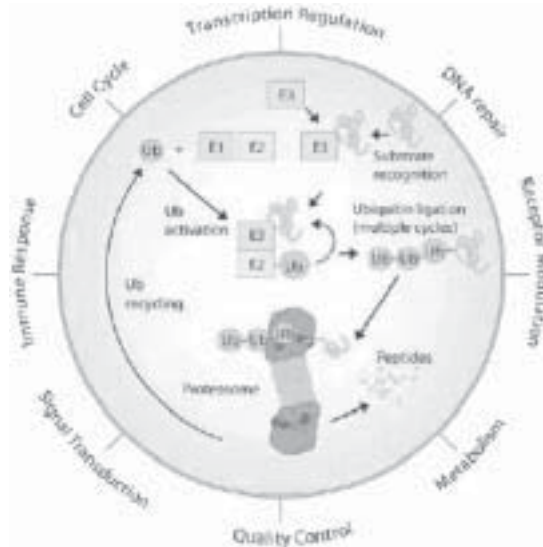


Irwin Rose, University of California, Irvine, USA

Ovogodišnji dobitnici Nobelove nagrade za kemiju^{1,2} Aaron Clechanover, Avram Hershko i Irwin Rose, pridonijeli su razumijevanju stanične regulacije uništenja neispravnih ili isluženih proteina na kemijskoj razini. Nove spoznaje o kontroliranoj smrti proteina objasnile su kako stanica provodi nadzor nad mnogim ključnim životnim procesima.

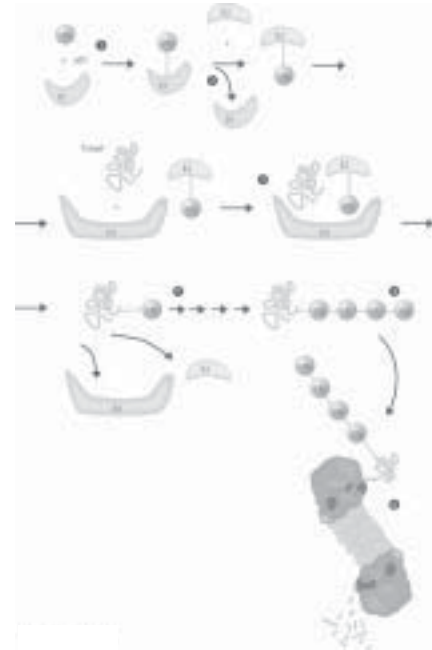
Proteini su stanične makromolekule bitne za građu i funkciju svih živih bića: biljaka, životinja i čovjeka. Eukariotske stanice, od mikroorganizma kvasca pa do čovjeka, sadržavaju oko 6000 – 30 000 proteinskih gena, i najmanje toliko različitih proteina. Tijekom posljednjih pedesetak godina brojna su otkrića pridonijela razjašnjenju biosinteze proteina, ali je relativno malo pozornosti posvećeno njihovoj razgradnji. Pionir u tom poslu svakako je bio Schoenheimer, koji je još 1942. pokazao da se životinjski proteini stalno sintetiziraju i razgrađuju.³ Većinu proteina unesenih u stanicu (npr. hranom) hidroliziraju enzimi bez dodatnog ulaganja energije. Međutim, razgradnja vlastitih staničnih proteina je proces

za koji treba energija.⁴ Aaron Clechanover, Avram Hershko i Irwin Rose, dobitnici ovogodišnje Nobelove nagrade za kemiju, pokazali su tijekom sedamdesetih i osamdesetih godina prošloga stoljeća da je razgradnja vlastitih staničnih proteina strogo kontroliran događaj, kojem prethodi programirano molekularno obilježavanje, nazvano "poljupcem smrti". Obilježeni protein usmjerava se potom u "odlagalište smeća" - proteasom, gdje se uništava kidanjem na male komadiće. Molekularna oznaka koja vodi protein u destrukciju je polipeptid ubikvitin.⁵ Neposredno prije razgradnje proteina proteasomom, ubikvitinski obilježavač se odcjepljuje i može se ponovno vezati na neku drugu proteinsku



Slika 1 – Ubikvitin-ovisna proteoliza i njezine mnogobrojne biološke funkcije

Fig. 1 – Ubiquitin-mediated proteolysis and its many biological functions



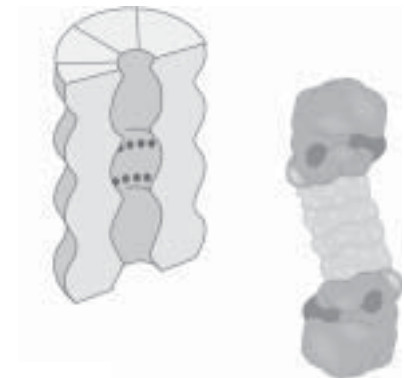
Slika 3 – Shema ubikvitin-ovisne degradacije proteina (koraci su opisani u tekstu)

Fig. 3 – Steps in ubiquitin-mediated protein degradation (as explained in the text)



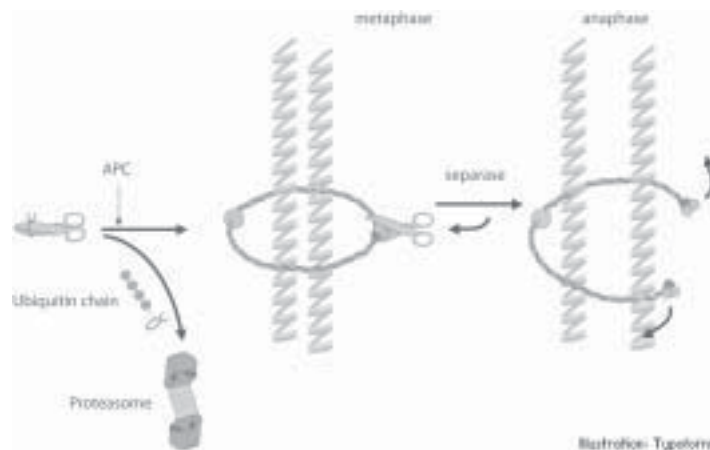
Slika 2 – Ubikvitin - polipeptid koji predstavlja “poljubac smrti”

Fig. 2 – Ubiquitin - a polypeptide that represents “kiss of death”



Slika 4 – Proteasom - “odlagalište smeća” u stanici. Crne točkice označavaju aktivni dio kompleksa koji razgrađuje proteine

Fig. 4 – Proteasome - the cell’s waste disposer. The black spots indicate active, protein-degrading surfaces



Slika 5 – Ubikvitin-ovisna degradacija proteina u separaciji kromosoma

Fig. 5 – Ubiquitin-mediated protein degradation in the chromosome separation

makromolekulu. Poticanjem degradacije odabranih proteina, stanica regulira odvijanje brojnih procesa (slika 1), kao što je stanična dioba, popravak DNA i imuni odgovor.

Prve eksperimente važne za razumijevanje degradacije proteina za koje je potrebna energija, načinili su Goldberg i suradnici⁶ pokazavši da stanični ekstrakt retikulocita (nezrelih crvenih krvnih stanica) katalizira razgradnju abnormalnih proteina na ATP-ovisan način. Upotrebom takva ekstrakta, Aaron Ciechanover, Avram Hershko i Irwin Rose uspjeli su nizom izvrsnih biokemijskih eksperimenata pokazati da se neželjeni proteini degradiraju postupno, i da je jedan od koraka obilježavanje ubikvitinom.⁷⁻⁹ Upravo pri tom obilježavanju troši se energija, ali utrošak je isplativ jer stanici omogućuje visokospecifični odabir samo nekih proteina za destrukciju.

Polipeptid ubikvitin (slika 2), sastavljen od 76 aminokiselina, izoliran je još 1975. godine, ali tada se još nije znala njegova funkcija. Nazvan je ubikvitinom (lat. *ubique*, "posvuda"), jer je uskoro pronađen u različitim eukariotskim organizmima, ali ne i u bakterijama. Godine 1978. Ciechanover i Hershko ustanovili su da je upravo ubikvitin nužan za ATP-ovisnu degradaciju proteina i da se kovalentno veže za različite proteine.^{7,8} Štoviše, nekoliko ubikvitinskih polipeptida veže se jedan za drugim za isti protein, što se naziva poliubikvitinacijom. Upravo je poliubikvitinacija "poljubac smrti", odnosno signal za uništenje proteina razgradnjom.^{9,10} Potrebne su tri različite vrste enzimskih aktivnosti: E1, E2 i E3, koje sudjeluju u postupnom obilježavanju proteina,¹¹⁻¹³ a razgradnja se odvija u šest koraka, kao što je prikazano na slici 3. Prvo E1 aktivira molekulu ubikvitina, za što je potrebna energija koja se dobiva hidrolizom ATP. Ubikvitin se svojom C-terminalnom karboksilnom skupinom veže za cistein enzima E1 tioesterskom vezom (1). Ubikvitin se potom prenosi na drugi enzim, E2 s kojim ponovno stvara tioestersku vezu (2). Enzim E3 je protein-ligaza. Prepoznaje ciljani protein koji treba razgraditi i prenosi ubikvitin s E2 na ciljani protein. Stvara se amidna veza između terminalne karboksilne skupine ubikvitina i pobočne aminoskupine jednog lizina u ciljnom proteinu (3). Enzim E3 otpušta ubikvitinirani protein (4). Ubikvitinacija se ponavlja, sve dok protein ne bude obilježen lancem međusobno povezanih ubikvitinskih polipeptida (5). Na kraju, ubikvitinski polimeri "privjesak" prepoznaje proteasom. Ubikvitinski marker se otpušta, a protein se kida u komadiće djelovanjem proteaza u proteasomu (6).

Avram Hershko i suradnici razvili su i imunokemijsku metodu za detekciju ubikvitin-ovisne degradacije proteina.¹⁴ Dodatkom radioaktivnih aminokiselina staničnoj kulturi (i to samo onih koje ne grade polipeptid ubikvitin, npr. triptofana), omogućena je sinteza mnogih različitih radioaktivnih proteina, od kojih su neki prirodno ubikvitinirani. Za destrukciju obilježeni interni stanični proteini detektirani su prema vezanju ubikvitin-specifičnih protutijela. Rezultati su pokazali da stanica zaista razara ubikvitinom obilježene proteine, i to u prvom redu one loše, koji ne zadovoljavaju rigorozni stanični zahtjev za pravilno sintetiziranim i strukturiranim proteinima. Novija su istraživanja pokazala da ih u stanici ima čak oko 30%.¹⁵ Istraživanja Ciechanovera, Hershka i Rosea odmah su dala naslutiti da i ispravni proteini bivaju kidani na ubikvitin-ovisan način, te da je to jedan od mogućnosti reguliranja staničnih procesa.

Stanični uređaj za procesivnu ubikvitin-ovisnu razgradnju proteina naziva se proteasom (pregledni članci 16, 17). Ljudska stanica sadržava oko 30 000 proteasoma. Proteasom je kompleks sastavljen od različitih proteaza (enzima koji kataliziraju hidrolizu drugih proteina), čiji su polipeptidni lanci složeni tako da čine bačvastu tvorevinu (slika 4). Aktivno mjesto proteasoma (označeno crnim točkicama na slici 4) nalazi se s unutarnje strane bačvastoga kompleksa, kako bi bilo zaštićeno od neposrednog dodira s ostalim dijelovima stanice. Da bi došao do aktivne površine proteasoma, protein mora proći kroz "ključanicu", koja prepoznaje poliubikvitinirane proteine, denaturira ih koristeći energiju hidrolize ATP

i tako priprema za degradaciju, nakon što se ukloni ubikvitinski marker. Rezultat razgradnje je smjesa peptidnih fragmenata dugih svega oko 7 – 9 aminokiselina. Samo poliubikvitinirani proteini podložni su degradaciji u proteasomu. Monoubikvitinacija ima brojne druge novootkrivene funkcije.¹⁸

Novija su istraživanja potvrdila da se ubikvitin-ovisnom degradacijom ne uništavaju samo abnormalni proteini, već je to vid regulacije djelovanja ispravnih proteina koji sudjeluju u važnim staničnim procesima, kao što su dijeljenje stanice, replikacija DNA i mijenjanje strukture kromosoma. Nekoliko primjera ilustrirat će važnost programirane degradacije proteina za živi svijet.

Prevenција samooprašivanja u biljaka

Biljke su većinom biseksualni, hermafroditiski organizmi. Samooprašivanje bi postupno vodilo k smanjenju genetičke raznolikosti, što bi postalo razlogom izumiranja vrste. Stoga se degradacijom određenih kontrolnih proteina postiže odbacivanje "vlastitoga" polena. Inhibicijom enzima E3 remeti se taj proces.

Enzim E3 sudjeluje u kontroli staničnoga ciklusa, jer razgrađuje važni regulatorni protein ciklin,¹⁹ a kao dio proteinskoga kompleksa APC ("anaphase-promoting complex") omogućuje i separaciju kromosoma tijekom mitoze i mejoze²⁰ (slika 5). Stanice mnogih malignih tumora sadržavaju promijenjeni broj kromosoma, kao rezultat pogrešne raspodjele kromosoma za vrijeme mitoze.

Popravak DNA

Jedna od funkcija proteina p53 je njegovo tumor-supresorsko djelovanje. Dakle, dok god stanica proizvodi ovaj protein, razvoj je tumora ometan. To je u skladu s nalazom da je u većini tumorskih stanica p53 mutiran. U normalnom je tkivu razina proteina p53 relativno niska, upravo zbog učestale degradacije ubikvitin-ovisnim mehanizmom. Međutim, ošteti li se stanična DNA, p53 se fosforilira i ne može više stvarati kopleks s enzimom E3. Kako je E3 bitan za ubikvitinaciju i degradaciju, razgradni se proces obustavlja, a razina tumor-supresorskog proteina u stanicama naglo poraste i potiče popravak oštećene DNA.²¹

Uzrok nasljednoj bolesti, cističnoj fibrozi (CF), nefunkcionalni je protein koji ima ulogu membranskoga kanala za provođenje kloridnih iona (CFTR, "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator"). Najveći broj pacijenata ima genetičku pogrešku zbog koje nedostaje jedna aminokiselina u eksprimiranom proteinu, te je on stoga krivo strukturiran. Stanica će ukloniti takav nefunkcionalni protein ubikvitin-ovisnom degradacijom.²²

Razumljivo je da je ubikvitin-ovisna degradacija proteina zanimljiva i farmaceutskoj industriji. Istražuju se nove vrste terapeutika, inhibitora različitih enzima opisanoga razgradnog puta. U kliničkom je testiranju jedan od proteasomskih inhibitora (*Velcade*), čije se djelovanje povezuje sa sprečavanjem nastanka mijeloma.

Literatura References

1. <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2004/public.html>
2. <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2004/chemadv04.pdf>
3. R. Schoenheimer, in *The dynamic state of body constituents*. Harvard University Press, Cambridge, 1942.
4. M.V. Simpson, *J. Biol. Chem.* **201** (1953) 143.
5. S. Gross-Mesilaty, J. L. Hargrove, A. Chiechanover, *FEBS Lett.* **405** (1997) 175.

6. *J. D. Etlinger, A. L. Goldberg*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (1977) 54.
7. *A. Ciechanover, Y. Hod, A. Hershko*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81** (1978) 1100.
8. *A. Hershko, A. Ciechanover, I. A. Rose*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (1979) 3107.
9. *A. Hershko, A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas, I. A. Rose*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 1783.
10. *A. Ciechanover, H. Heller, S. Elias, A. L. Haas, A. Hershko*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 1365.
11. *A. Ciechanover, H. Heller, R. Katz-Etzion, A. Hershko*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** (1981) 761.
12. *A. Hershko, A. Ciechanover, I. A. Rose*, *J. Biol. Chem.* **256** (1981) 1525.
13. *A. Hershko, H. Heller, S. Elias, A. Chiechanover*, *J. Biol. Chem.* **258** (1983) 8206.
14. *A. Hershko, E. Eytan, A. Ciechanover, A. L. Haas*, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 13964.
15. *B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter*, in *Molecular biology of the cell*, p. 358. Garland Science, New York, 2002.
16. *W. Baumeister, Z. Cejka, M. Kania, E. Seemuller*, *Biological Chemistry* **378** (1997) 121.
17. *D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister*, *Annu. Rev. Biochem.* **68** (1999) 1015.
18. *A. Pichler, F. Melchior*, *Traffic* **3** (2002) 381.
19. *M. Glotzer, A. W. Murray, M. W. Kirschner*, *Nature* **349** (1991) 132.
20. *K. Nasmyth*, *Annu. Rev. Genet.* **35** (2001) 673.
21. *R. Honda, H. Tanaka, H. Yasuda*, *FEBS Lett.* **420** (1997) 25.
22. *C. L. Ward, S. Omura, R. R. Kopito*, *Cell* **83** (1995) 121.

SUMMARY

The Nobel Prize in Chemistry 2004

I. Weygand-Đurašević

This year's Nobel Laureates in chemistry, Aaron Ciechanover, Avram Hershko and Irwin Rose, have contributed ground-breaking chemical knowledge of how the cell can regulate the presence of a certain protein by marking unwanted proteins with a label consisting of the polypeptide ubiquitin. Proteins so labeled are then broken down via the proteasomes. New knowledge of this form of controlled protein death has also contributed to explaining how many fundamental life processes are regulated.