

Proteasomy a nowe kierunki terapii

Arkadiusz Kazula¹, Ewa Kazula²

¹ Zakład Chorób Zwierząt Instytutu Weterynarii PAN

² Apteka Prywatna, Tarnobrzeg ul. Zakładowa 50

Adres do korespondencji: Arkadiusz Kazula, ul. Portowa 18/4, 27-600 Sandomierz, kazula.gen@wp.pl

Białka i peptydy obecne w żywej komórce po wypełnieniu swoich funkcji są rozkładane do podstawowych cegiełek aminokwasów, które są ponownie wykorzystywane, m.in. w procesie translacji białek. Przez wiele lat uważano, że rozkład białek przebiega jedynie w swoistych przedziałach komórkowych zwanych lizosomami, w których łatwo można kontrolować aktywność enzymów proteolitycznych. Jednak na początku lat 70 ubiegłego wieku, w badaniach prowadzonych przez Goldberg i wsp. [1] wykazano, że komórki bakteryjne oraz niedojrzałe krwinki czerwone potrafią również rozkładać niepożądane polipeptydy, pomimo braku wewnątrzkomórkowych lizosomów. W badaniach tych odtworzono w warunkach *in vitro* procesy rozkładu białek, które przebiegają na drodze tzw. ubikwitynozależnej proteolizy w specjalnych strukturach zwanych proteasomami. Proteasomy są dużymi wielkocząsteczkowymi kompleksami enzymatycznymi o masie cząsteczkowej około 2MDa, utworzonymi z białek. Odgrywają one główną rolę w systemie enzymatycznym, który ma za zadanie sprawną proteolityczną degradację niefunkcyjnych, nieprawidłowo zbudowanych lub uszkodzonych białek komórkowych. Kompleks proteasomowy reguluje „obrót” wielu białek wewnątrzkomórkowych, pełniących kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego, apoptozy, angiogenezy i ekspresji molekuł adhezyjnych [2–5]. Wewnątrz każdej komórki naszego organizmu znajduje się około 30 tys. proteasomów. Struktury te zlokalizowane są w cytoplazmie, jądrze komórkowym, skupiają się wokół centrioli, tworząc centra proteolityczne komórki. Ich liczba ulega częstym zmianom w zależności od zapotrzebowania komórki na destrukcję białek. Poza eliminowaniem białek uszkodzonych i źle sfałdowanych, proteasomy regulują także kluczowe procesy wewnątrzkomórkowe. Nieprawidłowe funkcjonowanie tych struktur może być przyczyną wielu chorób molekularnych. Zaburzenie ich funkcjonowania może powodować nadmierny rozkład białek istotnych dla przeżycia komórki

Proteasome a new trend in therapy · The 26S proteasome is a large intracellular protease that identifies and degrades proteins. The orderly degradation of cellular proteins is critical for normal cell cycling and function, and inhibition of the proteasome pathway results in cell-cycle arrest and apoptosis. Dysregulation of this enzymatic system may also play a role in tumor progression, drug resistance, and altered immune surveillance, making the proteasome an appropriate and novel therapeutic target in cancer. The ubiquitin-proteasome pathway is just beginning to be exploited as a target for cancer therapy. Nonetheless, given the available molecular biological, preclinical, and clinical data, there is very good reason to be optimistic that current drugs and future candidates will contribute significantly to the care of patients with cancer. This article discusses proteasome inhibition as a novel therapeutic target in cancer and focuses on the development, mechanism of action.

Keywords: Proteasome, *ubiquitin-proteasome pathway*, novel therapeutic target.

© Farm Pol, 2009, 65(7): 511-523

lub hamowanie rozkładu i kumulacji uszkodzonych lub patologicznych białek, co prowadzi do różnych zaburzeń molekularnych. Niewłaściwe funkcjonowanie procesu proteolizy w proteasomach jest przyczyną powstawania niektórych odmian nowotworów złośliwych oraz szeregu chorób układu nerwowego takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona. Komórki nowotworowe są bardziej wrażliwe na hamowanie aktywności kompleksów proteasomalnych niż komórki prawidłowe. Z tego powodu próbuje się otrzymać inhibitory aktywności proteasomów, które można wykorzystać w terapii nowotworów [6].

Wpływ proteasomów na funkcje komórek

Może się wydawać, że ciągła degradacja białek komórkowych w proteasomach jest dużym marnotrawstwem, ale jest ona w pełni uzasadniona, gdyż

Proteasomy są dużymi wielkocząsteczkowymi kompleksami enzymatycznymi utworzonymi z białek. Odgrywają one główną rolę w systemie enzymatycznym, który ma za zadanie sprawną proteolityczną degradację niefunkcyjnych lub uszkodzonych białek komórkowych. Kompleks proteasomu reguluje "obrót" wielu białek wewnątrzkomórkowych pełniących kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego, apoptozy, angiogenezy i ekspresji molekuł adhezyjnych.

istnieje szereg procesów biochemicznych, które są przynajmniej częściowo kontrolowane w wyniku aktywności proteasomów. Kontrola ta odbywa się poprzez zmianę stężenia i stabilności białek regulatorowych. Degradacja istotnych enzymów, bądź białek regulatorowych to dobry mechanizm spowalniania lub hamowania reakcji biochemicznych. W innych przypadkach wiele procesów biochemicznych ulega aktywacji podczas degradacji białek inhibitorowych przez proteasomy. Wydaje się, że właściwe działanie proteasomów reguluje prawidłową homeostazę komórki, jak również mediuje odpowiedź komórkową na chemioterapię [7]. Poprzez procesy degradacji w proteasomach komórka reguluje postęp cyklu komórkowego, supresję nowotworów, transkrypcję i replikację DNA [8]. Prawidłowo działające proteasomy biorą aktywny udział w kontroli procesów związanych z naprawą uszkodzeń DNA tzw. postreplikacyjną naprawą uszkodzeń DNA. Naprawa tego typu umożliwia przeżycie komórce mimo istnienia uszkodzeń DNA i prze-

kazywanie komórce potomnej pełnej, choć zawierającej błędy, informacji genetycznej [9, 10]. Dysregulacja procesów rozkładu białek w proteasomach może się przyczynić do progresji nowotworów, narastania oporności na leki oraz powstawania zmian w mechanizmach immunologicznych [11]. Innym skutkiem dysregulacji mogą być zaburzenia równowagi między białkami regulatorowymi, co może powodować zatrzymanie cyklu komórkowego w fazach G1-S i G2-M oraz apoptozę komórek. Procesy rozkładu białek przebiegają szczególnie intensywnie w czasie, gdy organizm jest wycieńczony rozwijającą się chorobą, szczególnie w takich chorobach, jak nowotwory, AIDS, cukrzyca czy w osłabionych mięśniach, gdzie następuje intensywna degradacja białek do aminokwasów, które są następnie przekształcane na glukozę, podstawowe źródło energii. Sprawna, niczym niezaburzona degradacja białek komórkowych jest istotna dla transdukcji sygnału, odpowiedzi na

stres oraz prawidłowej kontroli czynności receptorów [6,12]. W przypadku kontroli odpowiedzi zapalnej, czynnik transkrypcyjny NF- κ B (ang. nuclear factor) bierze udział w inicjacji ekspresji genów biorących udział w tej odpowiedzi. Jest on aktywowany w wyniku degradacji przez proteasomy białka I- κ B, które jest czynnikiem hamującym aktywność NF- κ B [13]. Proteasomy są również istotnym elementem układu opornościowego naszego organizmu, odgrywają one ważną rolę w prezentacji antygenów. W procesie degradacji obce immunogenne białka są trawione

przez proteasomy do krótkich peptydów złożonych z 6–12 aminokwasów, które jako epitopy zostają wychwycone i skierowane na powierzchnię komórki, gdzie są prezentowane układowi odpornościowemu i rozpoznawane jako antygeny patogenów. Podczas przebiegu choroby w niektórych narządach, takich jak śledziona, węzły chłonne powstają wyspecjalizowane typy proteasomów nazywane immunoproteasomami, które poprawiają efektywność układu nadzorczego w procesach rozpoznawania obcych antygenów [14, 15].

Choroby a proteasomy

Degradacja zbędnych białek przez proteasomy stanowi istotny wewnątrzkomórkowy system kontroli, który zapobiega nagromadzeniu się nieprawidłowych i toksycznych białek w komórce. Dzięki tym strukturom niszczone są białka o niewłaściwej konformacji oraz wadliwe białka powstające na skutek mutacji w genach kodujących. Niszczenie takich białek jest istotne w wielu chorobach o podłożu genetycznym, np. w przypadku mukowiscydozy, która jest spowodowana mutacją w genie kodującym białko błony komórkowej, pełniące funkcję kanału błonowego dla transportu jonów chlorkowych. Mutacja tego białka powoduje zmianę konformacji, co stymuluje jego rozkład w proteasomach przed wbudowaniem do błony komórkowej. Na skutek braku przenośnika jonów chlorkowych w płucach i innych narządach u osób chorych na mukowiscydozę zbiera się lepki śluz. W przypadku wielu chorób przyczyną powstawania zmian jest niezdolność proteasomów do rozkładu patologicznych białek [16]. Wykazano, że w przypadku chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, Alzheimera czy Huntingtona w neuronach OUN powstają złogi nieprawidłowych białek zasocjowane z proteasomami. Znalezienie przyczyny powstawania tych zmian histologicznych oraz utraty zdolności degradacji tych białek przez neurony może przynieść rozwiązanie w postaci skutecznej terapii tych schorzeń [6].

Szlak ubikwityna – proteasomy

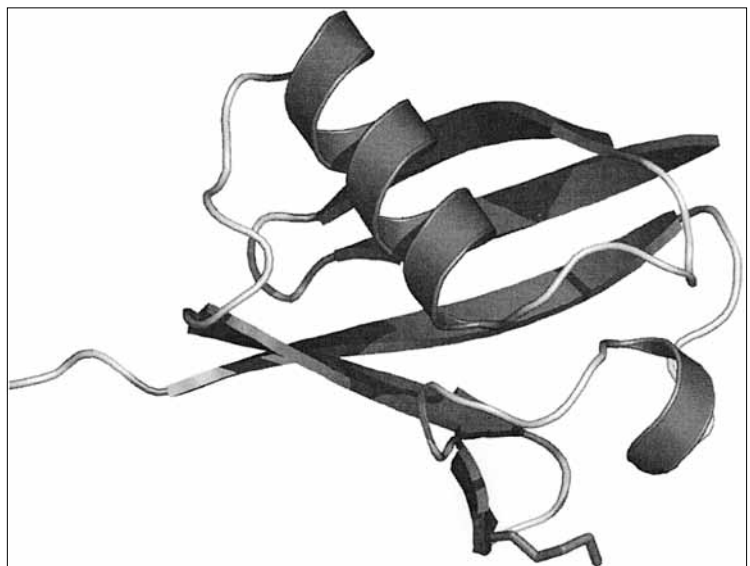
Ubikwitynacja – naznaczanie białek do degradacji

Białka ulegają biodegradacji w proteasomach nie w sposób przypadkowy. Przez wiele lat badano mechanizmy komórkowe rozpoznawania i kierowania niepotrzebnych białek do rozkładu. Okazało się, że w komórkach istnieje pewnego rodzaju kontrola jakości białek. Istnieją mianowicie specyficzne enzymy wyszukujące białka, które należy rozłożyć, natomiast inne enzymy powodują odpowiednie wyznaczenie, które pomaga w rozpoznaniu przez proteasom danego polipeptydu, który ma ulec destrukcji. Mechanizm

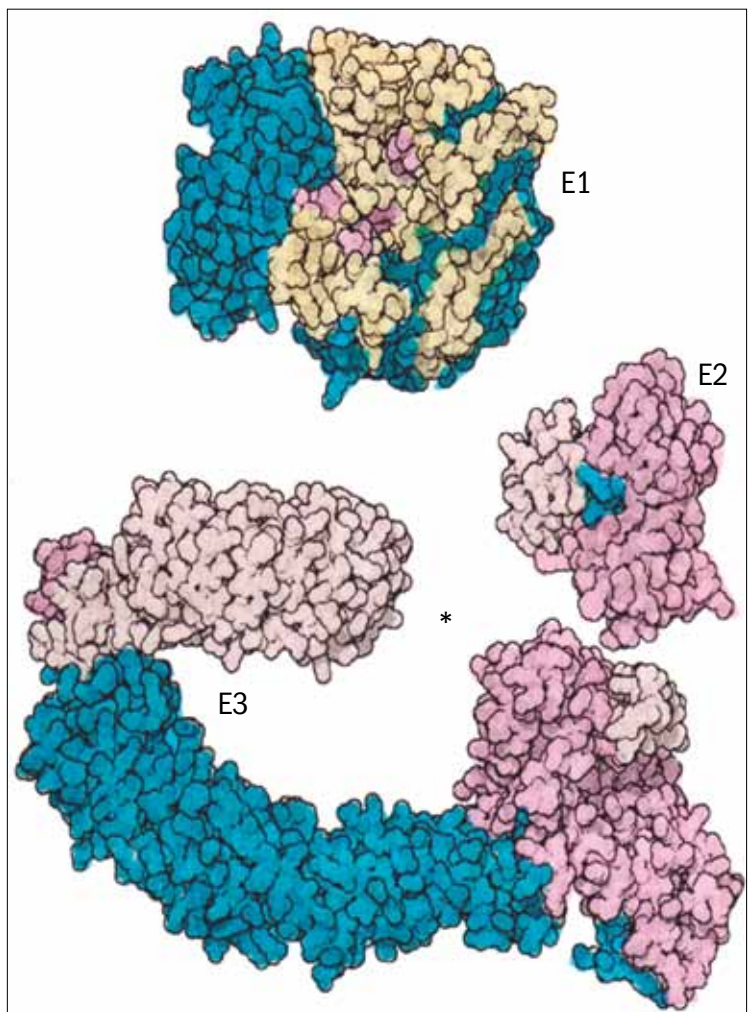
wyznakowania białek jest związany z wymagającą energii reakcją przyłączania specyficznych cząsteczek białkowych zwanych ubikwitiną (Ub), a proces przyłączania tych cząsteczek nazywany jest ubikwitynacją lub ubikwityzacją. Proces ten może przebiegać zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym [17].

Ubikwityna (Ub) jest małą cząsteczkowym białkiem o masie 8,5 kDa, składającym się z 76 reszt aminokwasowych (**rycina 1**). Białko to obecne jest w cytoplazmie w postaci wolnych cząsteczek, łańcuchów wielocząsteczkowych oraz w kowalentnym związku z innymi białkami. Występuje ono w komórkach wszystkich organizmów eukariotycznych, a ze względu na swoje analogiczne funkcje, struktura ubikwityny jest wysoce konserwatywna pod względem ewolucyjnym. Przykładowo sekwencja aminokwasowa ubikwityny drożdżowej różni się od białka ludzkiego tylko trzema aminokwasami spośród 76 aminokwasów [17]. Wystający karboksylowy koniec tego białka pełni aktywną rolę podczas procesu przyłączania białek przeznaczonych do degradacji. Na C-końcu cząsteczki Ub jest obecna grupa karboksylowa aminokwasu glicyny (Gly 76), która może się przyłączyć kowalencyjnie do grupy ϵ -aminowej reszty lizyny następnego białka (cząsteczka Ub zawiera 7 reszt lizyny) lub do reszty lizyny białka przeznaczonego do degradacji. Pomiędzy dwoma białkami tworzy się w miarę stabilne wiązanie izopeptydowe, które pozwala cząsteczkom ubikwityny dostarczyć naznaczone białko do miejsca degradacji. Energia potrzebna do wytworzenia tego wiązania pochodzi z hydrolizy ATP. Wiązanie izopeptydowe, do którego budowy jest używana grupa ϵ -aminowa lizyny wymaga mniej energii do utworzenia niż wiązanie peptydowe w naturalnie występujących łańcuchach peptydowych.

Przyłączenie do białka tylko jednej cząsteczki Ub jest bardzo słabym sygnałem degradacji. Największe znaczenie ma poliubikwitynacja, a poliubikwitynowe łańcuchy pełnią funkcję znacznika białek. Białko docelowe z ogonem poliubikwitynowym jest rozpoznawane przez proteasom, który wciąga wyznaczone białko do swego wnętrza powodując jego rozkład. Ubikwitynacji podlegają białka uszkodzone, zdeformowane, zdenaturowane i nieprawidłowo funkcjonujące, oraz białka obce dla komórki np. białka wirusowe. Proces ubikwitynacji jest pierwszym etapem w szlaku degradacji danego białka w komórce [6]. Należy dodać, że w szczególnych przypadkach rozkład białek komórkowych może być hamowany przez proteazy specyficzne dla ubikwityny (Ub-specific processing proteases – UBPs). Blisko 20 enzymów pełniących taką funkcję może zetrzeć piętno śmierci poprzez odłączenie cząsteczek ubikwityny od naznaczonego białka, nawet w miejscu degradacji, tj. w kompleksie proteasomu.



Rycina 1. Struktura przestrzenna ubikwityny. Ubikwityna, jak każde białko, posiada końce N i C. Wystający koniec C zawiera grupę karboksylową glicyny (Gly 78), która może tworzyć wiązanie izopeptydowe z następną cząsteczką Ub poprzez grupę aminową lizyny znajdującą się w pozycji 48



Rycina 2. Modele białek E1, E2 i E3, które biorą udział w procesie ubikwitynacji białka przeznaczającego do degradacji wewnątrz proteasomów

Tabela 1. Zależność okresu półtrwania białek cytozolowych drożdży od reszt aminokwasowych na N-końcu [22]

Reszty silnie stabilizujące białko Ala, Cys, Gly, Met, Pro, Ser, Thr, Val ($t_{1/2} > 30$ min)

Reszty bezpośrednio destabilizujące Arg, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Trp, Tyr ($t_{1/2} = 2$ do 30 min)

Reszty destabilizujące po modyfikacji chemicznej Asn, Asp, Glu, ($t_{1/2} = 3$ do 30 min)

Enzymy uczestniczące w ubiquitynacji białek są zdolne do bardzo selektywnego rozpoznawania substratu. Tworzenie wiązania izopeptydowego wymaga, oprócz energii, udziału trzech specyficznych enzymów (**rycina 2**), takich jak enzym aktywujący ubiquitynę (E1), enzym koniugujący (E2) i ligaza ubiquitynowo-białkowa¹ (E3) [18].

Ubiquitynację można podzielić na kilka etapów, w których uczestniczą trzy powyższe enzymy. W pierwszym etapie białko E1 przy udziale cząsteczki ATP aktywuje ubiquitynę przekształcając to białko do ubiquitynoadenylanu, który łączy się z grupą tiolową enzymu E1 z utworzeniem wysokoenergetycznego wiązania tioestrowego między końcową grupą karboksylową ubiquityny, a grupą hydrosulfidową enzymu E1. W etapie tym grupa adenylanowa przyłącza się do grupy karboksylowej C-końca ubiquityny, uwalnia cząsteczkę pirofosforanu. W następnym etapie ubiquityna z enzymu E1 zostaje przeniesiona na grupę hydrosulfidową enzymu E2, a następnie jest przenoszona na białko docelowe (transestryfikacja), przy czym w zależności od izoformy białka E2, etap ten może wymagać, ale nie musi, aktywności trzeciego enzymu E3. W przypadku, w którym enzym E3 jest wymagany, to właśnie on decyduje o wyborze białka do ubiquitynacji [19]. Cząsteczka ubiquityny odłącza się od enzymu E2 i przy udziale białka E3 przenoszona jest na grupę ε-aminową białka przeznaczonego do degradacji. Proces ten powtarza się aż do momentu, gdy zostanie utworzony odpowiedni łańcuch poliubiquityny, przyłączony do białka docelowego przeznaczonego do degradacji (**rycina 3**).

Sygnaly destrukcji

Należy sobie zadać pytanie, co decyduje o tym, że białko zostaje napiętnowane i degradowane oraz w jaki sposób enzymy biorące udział w procesie ubiquitynacji rozpoznają właściwe białko, które ma zostać przeznaczone do degradacji? Badania wykazały, że w dużym stopniu o okresie półtrwania białek cytoplazmatycznych w komórce decydują reszty aminokwasowe występujące na końcach

aminowych degradowanych białek. W wielu przypadkach białka podlegające specyficznej degradacji posiadają na N-końcu odpowiednią sekwencję aminokwasową złożoną z 8–10 aminokwasów nazywaną sygnałem destrukcji, a zależność tę nazywamy regułą N-końca (**tabela 1**). Motyw ten umożliwia rozpoznanie białek kierowanych do destrukcji za pomocą specyficznych białek rozpoznających (E3), które wiążą się z aminokwasami zlokalizowanymi w sekwencji destrukcyjnej [20]. Przykładowo, okres półtrwania białek drożdżowych zawierających na N-końcu metioninę wynosi około 20 godzin, podczas gdy dla białek zawierających argininę tylko 2 min. Reszty takie jak arginina lub leucyna silnie stymulują ubiquitynację, a białko takie jest niestabilne. Natomiast reszty aminokwasowe na N-końcu, takie jak metionina lub prolina działają odwrotnie [21].

Innym rodzajem genetycznego sygnału, który determinuje czas trwania białka jest obecność fragmentu sekwencji ubiquityny na N-końcu białka docelowego. Białka, które posiadają zakodowaną w DNA taką sekwencję ubiquityny, podlegają obligatoryjnej degradacji (ubiquitin fusion degradation – UFD). Taka metaboliczna niestabilność białek jest właściwością np. enzymów dokonujących naprawy uszkodzonego DNA, których aktywność przetrwała do momentu replikacji mogłaby spowodować powstanie mutacji. Następnym znanym sygnałem degradacji jest tzw. kaseta destrukcyjna D-box, sekwencja ta występuje w niektórych cyklinach i decyduje o degradacji białek uczestniczących w cyklu komórkowym. Szybka degradacja czynników transkrypcyjnych jest konieczna dla zachowania zdolności do zmiany tempa transkrypcji wielu genów. Następnym sygnałem jest sekwencja PEST (Pro-Glu-Ser-Thr), zawierająca prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę. Obecna jest ona aż w 1/3 wszystkich znanych sekwencji kodujących [17]. Nowo syntetyzowane białka, które nie osiągnęły jeszcze swego dojrzałego kształtu, są chronione przed ubiquityzacją za pomocą specyficznych białek zwanych chaperonami. Nowo powstałe łańcuchy peptydowe zawierają aminokwasy, które przybierają właściwy układ przestrzenny, tzw. konformację pod wpływem wielu sił. Na przykład każdy aminokwas łańcucha inaczej reaguje na obecność wody w cytoplazmie komórki. Aminokwasy hydrofobowe starają się uniknąć kontaktu z nią i kierują się do wnętrza molekuly, natomiast aminokwasy hydrofilowe oddziałują

¹ W przypadku człowieka istnieje pewna choroba znana pod nazwą zespołu Angelmana, która jest spowodowana wrodzonym defektem ligazy ubiquitynowej. Warto dodać, że badania prowadzone w naszym kraju nad właściwościami ubiquityny były jednymi z pierwszych na świecie. W 1973 roku rozpoczęto eksperymenty nad produkcją wyciągu z grasic cielęcych, który w 1981 został opatentowany pod nazwą Thymus Factor X (TFX). W toku licznych badań biochemicznych i klinicznych okazało się, że głównym składnikiem TFX są glikozylowane ubiquityny. Aktywność biologiczna tych podawanych parenteralnie ubiquityny obserwowano w wielu modelach klinicznych, również w przypadku zespołu Angelmana. Wydaje się, że wszechobecność procesów ubiquitylacji oraz ich wewnątrzkomórkowa lokalizacja powinny skłaniać do dalszych badań nad mechanizmami działania oraz do poszukiwania czystszych i aktywniejszych biologicznie frakcji.

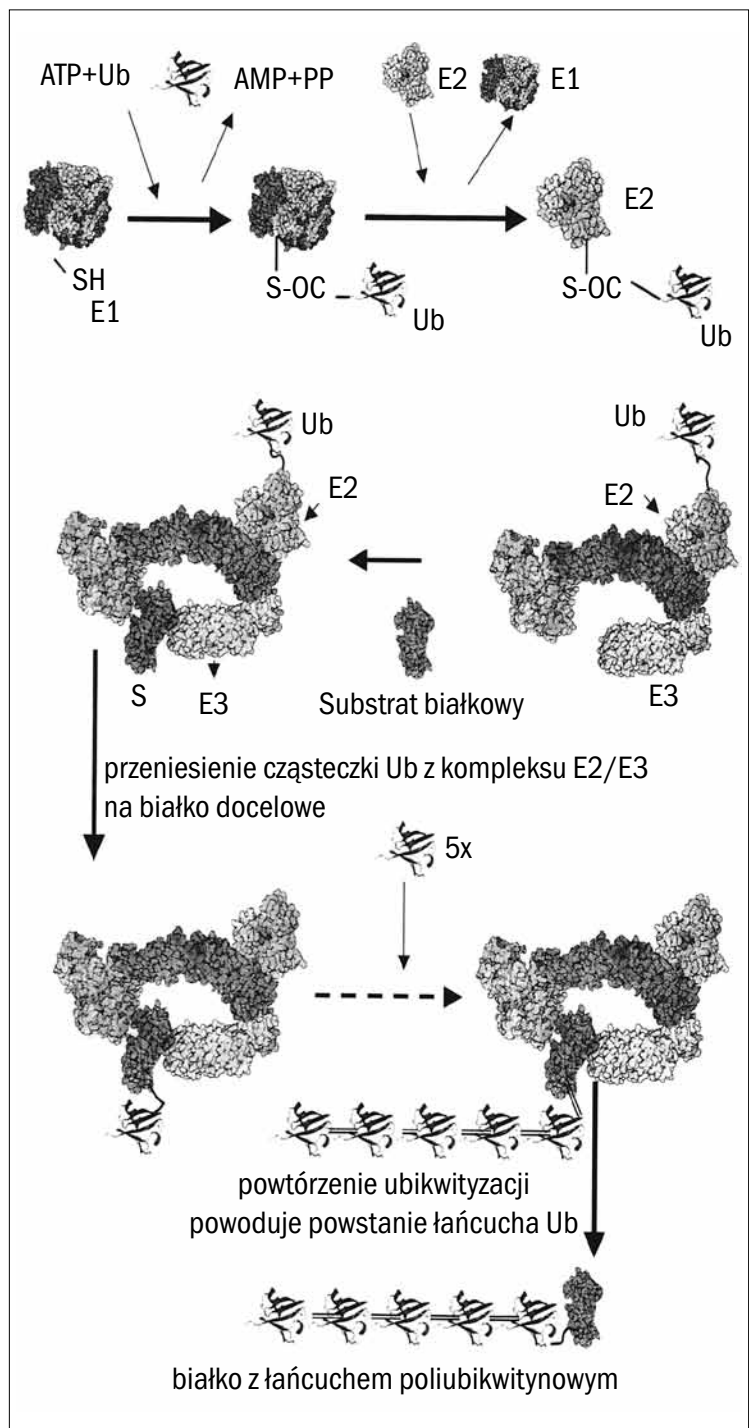
z wodą i umiejscawiają się na zewnątrz cząsteczki peptydu. Białkowe chaperony pomagają przy związaniu się nowo powstających łańcuchów aminokwasowych do właściwej konformacji, która decyduje o ich aktywności w komórce [23, 24]. Denaturacja lub nieprawidłowe fałdowanie białek ujawnia najprawdopodobniej sygnały degradacji, które w prawidłowej cząsteczce są ukryte wewnątrz przestrzennej struktury. Wydaje się, że większość polipeptydów komórki ma w swojej sekwencji sygnały destrukcji, które ujawniają się w następstwie przyjmowania nieprawidłowej konformacji białka, co powoduje uruchamianie procesów degradacji [6].

Rola białek E

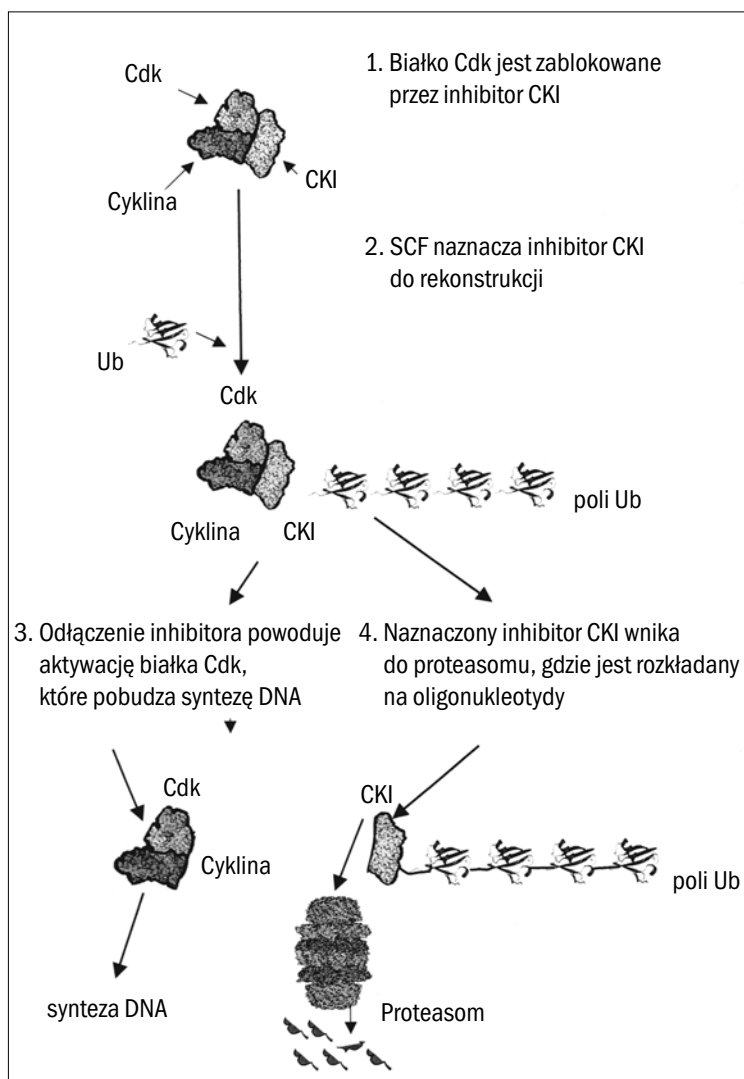
Komórki organizmów eukariotycznych zawierają jeden lub kilka wariantów enzymu E1, natomiast enzymy E2 i E3 występują w wielu odmianach strukturalnych. Enzymy E2 tworzą rodzinę białek spokrewnionych ewolucyjnie, natomiast białka E3 tworzą kilka rodzin białek. Badania wykazały, że o specyficzności substratowej procesu ubikwitynacji decydują enzymy E3, ale kompleks zbudowany z białek E2 i E3 umożliwia bardziej precyzyjny wybór białka przeznaczonego do degradacji. Białka typu E3 rozpoznają specyficzne sekwencje destrukcyjne białek przeznaczonych do ubikwitynacji. W zmieniających się warunkach fizjologicznych wywołanych infekcją lub brakiem składników odżywczych komórki modyfikują polipeptydy, dodając do nich grupy fosforanowe. W wyniku takiej fosforylacji zmienia się aktywność lub zdolność wiązania zmodyfikowanego białka z enzymem E3. Białka E3 poprzez stymulację trwałości istotnych białek, pełnią ważną rolę w regulacji różnorodnych procesów odbywających się w komórce, takich jak odpowiedź immunologiczna, podziały komórkowe i komunikacja międzykomórkowa. Wiele białek E3 należy do supresorów nowotworowych lub onkogenów, co wiąże proces ubikwitynacji z początkami nowotworzenia [6].

Rola proteasomów w regulacji cyklu komórkowego

Wiadomo że cykliny, cyklino-zależne kinazy CDK i inhibitory CDK, tzw. inhibitory CKI, pełnią kluczową rolę w regulacji postępu cyklu komórkowego [25]. W fazie S następuje podwojenie ilości komórkowego DNA. Warunkiem rozpoczęcia replikacji DNA w komórce jest aktywacja cyklino zależnych kinaz (CDK). Aktywne kinazy CDK powodują stymulację aktywności transkrypcyjnych aktywatorów E2F, które są wymagane do regulacji ekspresji genów w fazie S cyklu komórkowego [26,27]. Cząsteczki kinaz zbudowane są z cykliny i podjednostki Cdk. Cykliny są związane z białkowymi inhibitorami CKI, które są syntetyzowane w fazie G1 cyklu komórkowego. Aktywacja



Rycina 3. Schemat degradacji białek poprzez szlak ubikwitynowo-proteasomowy. Większość białek przeznaczonych do degradacji za pomocą szlaku Ub-proteasomowego ulega najpierw, poliubikwitylacji, która wymaga kilku etapów. W pierwszym etapie enzym E1 aktywujący ubikwitynę przy udziale cząsteczki ATP katalizuje adenylację ubikwityny. Powstaje ubikwitynoadenylan, który łączy się z grupą tiolową reszty cysteiny enzymu E1 z utworzeniem aktywnego kompleksu. W następnym etapie aktywowane białko Ub z kompleksu E1 jest przenoszone na resztę cysteiny enzymu koniugującego E2. Następnie cząsteczka ubikwityny odłącza się od białka E2 i przy udziale białka E3 jest przenoszona na grupę ε-aminową lizyny białka przeznaczonego do degradacji. Po kilku powtórzeniach takiego cyklu ubikwitynacji, białko docelowe ulega poliubikwitylacji i jest rozpoznawane przez część regulacyjną proteasomu 19S



Rycina 4. Regulacja cyklu komórkowego w wyniku działania proteasomów

kinaz CDK polega na degradacji białkowego inhibitora CKI w proteasomach (rycina 4). Oczywiście, aby inhibitor został skierowany do degradacji w proteasomach musi zostać wyznakowany za pomocą cząsteczek Ub. Białkowy inhibitor CKI podlega procesowi ubiquityzacji przy udziale enzymatycznych białek E3, które tworzą kompleks SCF. Kompleks ten rozpoznaje dane białka oraz inhibitor CKI po określonej strukturze przestrzennej. W komórkach naszych organizmów wykryto już kilkadziesiąt różnych kompleksów SCF, które posiadają specyficzne białka F-box zdolne do wiązania się z określonymi białkami przeznaczonymi do degradacji w proteasomach [28]. Kompleks SCF przesądza o wyborze danego białka, które ma zostać skierowane do proteasomów i pełni funkcję pośrednika łączącego wyznaczone do degradacji

białko z enzymami dodającymi ubiquitynę. Różnorodność kompleksów SCF i ich wybiórcze działanie pozwala komórce decydować, który typ białek i jaka ilość każdego z nich będzie w danej chwili do dyspozycji, aby prawidłowo przebiegał cykl komórkowy i inne procesy biochemiczne w komórce [15]. W chwili obecnej trwają prace mające na celu konstrukcję specyficznych inhibitorów kompleksów SCF, co pozwoli hamować cykl komórkowy komórek nowotworowych [29].

Budowa i mechanizm działania proteasomów

Kompleksy proteasomowe występują u wszystkich organizmów eukariotycznych. Obecność homologicznych do proteasomów struktur zaobserwowano również w przypadku organizmów prokariotycznych, jednak ich funkcja nie jest całkowicie poznana². Większość proteasomów organizmów wyższych osiąga masę 1500–2400 kD (26S). W latach 90. ubiegłego wieku, przy zastosowaniu dyfrakcji promieni X i przy wykorzystaniu techniki mikroskopii elektronowej, ustalono molekularną strukturę proteasomów. Każdy kompleks proteasomowy złożony jest z kilku podjednostek, które w sumie zbudowane są z około 44 polipeptydów [30]. W kompleksie tym wyróżniamy trzy podjednostki 20S, 19S i 11S. Podjednostka 20S, określana często mianem proteasom 20S, pełni rolę rdzeniowego kompleksu katalitycznego (o masie około 700 kD). Kompleks katalityczny zbudowany z rdzenia białkowego kształtem przypomina tunel, wewnątrz którego występuje aktywność proteolityczna. Natomiast podjednostka 19S pełni rolę kompleksu regulatorowego (o masie zbliżonej do 700kD) [31]. Podjednostka ta kontroluje transport znakowanych ubiquityną polipeptydów do wnętrza proteasomów. Typowy kompleks proteasomowy 26S zbudowany jest z rdzeniowej części katalitycznej 20S i dwóch podjednostek regulatorowych 19S przyłączonych po obu stronach cylindrycznej podjednostki 20S (rycina 5) [32, 33]. W przypadku niektórych immunoproteasomów występuje dodatkowa podjednostka oligopeptydowa (heptamer) 11S przyłączony do podjednostki 20S, który jest potencjalnym aktywatorem proteosomu [34,35,36]. Katalityczny kompleks rdzeniowy 20S jest zbudowany z 28 podjednostek polipeptydowych, 14 podjednostek alfa i 14 podjednostek beta [37]. Podjednostki te formują dwa zewnętrzne i wewnętrzne pierścienie, które są ułożone jeden na drugim budując strukturę cylindryczną posiadającą trzy przedziały. Każdy pierścień zewnętrzny

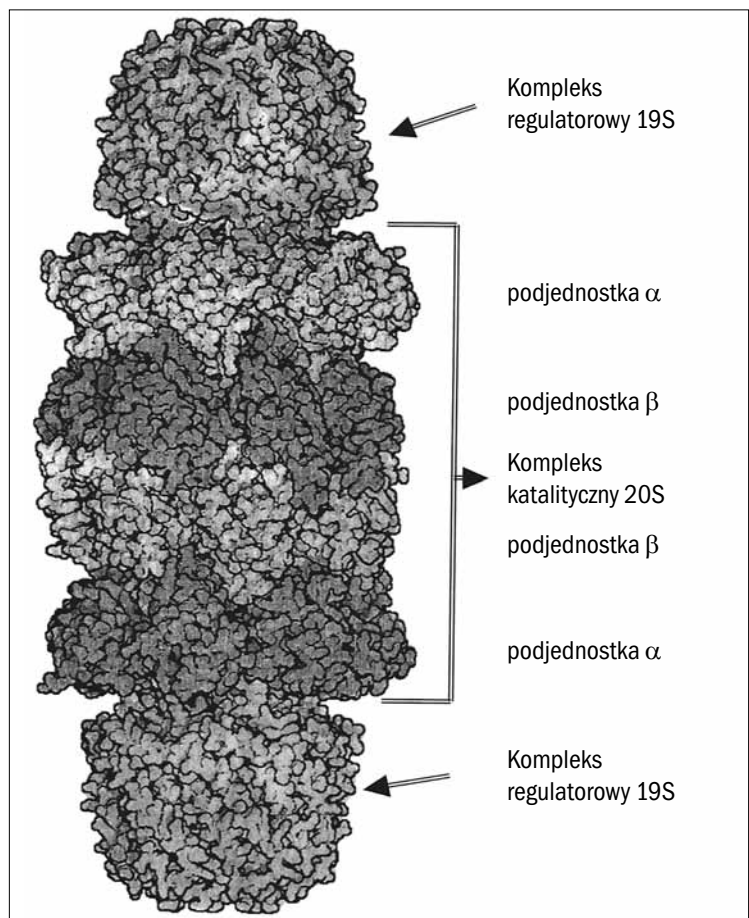
² W organizmach prokariotycznych brak ubiquityny, a jednak w tych komórkach zidentyfikowano specyficzne białka będące molekularnymi przodkami tego białka. Nie biorą one udziału w modyfikacji białek, lecz w biosyntezie koenzymu-tiaminy. Pokrewieństwo ewolucyjne między pierwszym etapem ubiquityzacji u eukariotów, a biosyntezą tiaminy u prokariotów potwierdzono dzięki zbadaniu struktury przestrzennej białka ThiS, której struktura jest podobna do ubiquityny. Wydaje się zatem, że proces znakowania w wyniku ubiquityzacji wyewoluował z istniejącego wcześniej szlaku biosyntezy tiaminy u prokariotów.

składa się z siedmiu podjednostek alfa ($\alpha 1-\alpha 7$), natomiast każdy pierścień wewnętrzny zbudowany jest również z siedmiu podjednostek beta ($\beta 1-\beta 7$) i otacza centralny kanał, który jest miejscem rozkładu białek. Proteolityczna aktywność proteasomów związana jest z podjednostkami beta. W eukariotycznych proteasomach 26S rdzeniowy kompleks katalityczny posiada trzy rodzaje aktywności proteolitycznej związanej z podjednostkami beta, tj. aktywność chymotrypsynowa, pozwalająca na cięcie łańcuchów polipeptydowych o strukturze hydrofobowej, trypsynowa, która umożliwia degradację łańcuchów zasadowych oraz kaspazopodobna, umożliwiająca rozcinanie łańcuchów peptydowych o charakterze kwasowym [31]. Dwa aktywne miejsca katalityczne znajdują się w podjednostce $\beta 1$ oraz po dwa w podjednostce $\beta 2$ i $\beta 5$ [38].

Wspólnym elementem proteasomów jest obecność katalitycznej triady w centrach aktywnych zbudowanych z trzech aminokwasów, które są odpowiedzialne za cięcie peptydów. Te aktywne miejsca degradacji białek znajdują się wewnątrz proteasomu na końcach aminowych podjednostek β zawierających w centrum aktywnym reszty treoniny i seryny. Grupy hydroksylowe tych aminokwasów przy udziale własnych grup aminowych przekształcają się w czynniki, nukleofilowe, które atakują grupy karbonylowe wiązań peptydowych tworząc produkt pośredni acylo-enzym. Wewnątrz proteasomów substraty są degradowane bez uwalniania produktów pośrednich do momentu aż białko zostanie rozłożone do krótkich peptydów o długości 7-9 reszt aminokwasowych [38]. Te krótkie peptydy powstające w wyniku działania proteasomu są następnie rozkładane do pojedynczych aminokwasów przez oligopeptydazy komórkowe (**rycina 6**).

Dostęp do wnętrza proteasomu jest kontrolowany przez kompleks regulatorowy 19S, zbudowany z 20 podjednostek. Kompleks ten przyłącza się do obu końców proteasomów tworząc dwa zewnętrzne pierścienie, które pełnią rolę bramy, przez którą następuje wciągnięcie do wnętrza degradacyjnej komory białek, które mają zostać rozłożone przez rdzeń katalityczny proteasomu. Podjednostka 19S posiada enzym zwany izopeptydazą odcinający nienaruszone cząsteczki ubikwityny, które są ponownie wykorzystane w procesie ubikwityzacji [17].

Na aktywność enzymatyczną proteasomów może wpływać szereg leków, których mechanizm terapeutycznego działania w dużym stopniu zależy od wpływu na aktywność proteasomów. Do związków, które podwyższają aktywność proteasomów należy zaliczyć kwas retinowy, geldanamycynę [42, 43]. Natomiast związki hamujące aktywność proteasomów w wielu przypadkach są wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej, co zasugerowało zastosowanie inhibitorów proteasomów w tego rodzaju terapii.

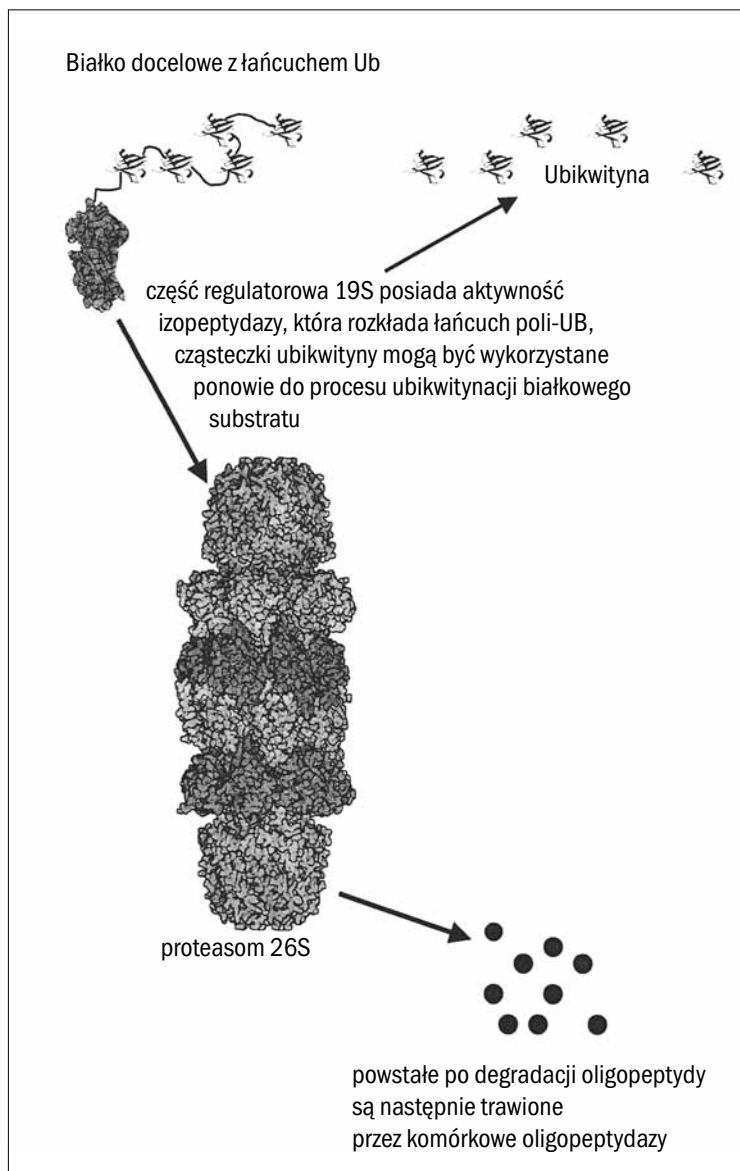


Rycina 5. Schemat ogólny proteasomu 26S, który zbudowany jest z dwóch kompleksów regulatorowych 19S i kompleksu katalitycznego 20S (proteasomu 20S). Część katalityczna 20S złożona jest z 28 homologicznych podjednostek α i β (14 α i 14 β) ułożonych w postaci 4 pierścieni [39]

Do związków hamujących aktywność proteasomów należą kwas taninowy, lek immunosupresyjny – cyklosporyna A, leki obniżające poziom cholesterolu z grupy statyn [44, 45]. Szczególnie ciekawym inhibitorem jest lek immunosupresyjny rapamycyna, która hamuje ekspresję specyficznego proteasomowego aktywatora białka PA28 i w ten sposób blokuje funkcje proteasomów. Do innych chemioterapeutyków o właściwościach hamujących aktywność proteasomów należy zaliczyć akklarubicynę, winblastynę i winkrystynę [46–49].

Szlak ubikwityno-proteasomowy a autofagia

Procesy degradacji białek i polipeptydów są równie ważne jak biosynteza nowych cząsteczek białkowych. Podczas ewolucji wykształciły się w komórkach dwa mechanizmy degradacji zbędnych białek, wcześniej omówiony szlak ubikwitynowo-proteasomowy oraz mechanizm autofagii za pomocą autofagosomów i lizosomów. Te dwa mechanizmy rozkładu zbędnych białek istnieją obok



Rycina 6. Białko naznaczone dostaje się do wewnętrznego kanału proteasomu gdzie ulega proteolitycznemu rozkładowi do krótkich oligopeptydów, które w dalszym etapie są rozkładane do aminokwasów przez komórkowe oligopeptydazy [40, 41]

siebie w naszych komórkach, ale wykorzystywane są do odmiennych celów. Za proces autofagii odpowiedzialne są wewnątrzkomórkowe organelle zwane autofagosomami, które nieustannie pochłaniają niewielkie ilości cytoplazmy, a wraz z nią usuwają z wnętrza komórki zużyte, uszkodzone i źle funkcjonujące białka oraz nieprawidłowo funkcjonujące organelle, bakterie i wirusy. Autofagia³, określana

często terminem „samozjadania” komórki, umożliwia degradację zbędnych i patologicznych białek oraz innych struktur komórkowych, które są ponownie wykorzystywane jako materiał budulcowy do biosyntezy niezbędnych cząsteczek. Istnienie autofagii jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania naszych komórek. Podczas licznych procesów biochemicznych odbywających się w komórkach powstaje niezliczona ilość zbędnych związków, które ulegają nagromadzeniu w cytoplazmie komórki. Aby zatem sprawnie funkcjonować komórka musi posiadać system, który będzie pozbywał się tych niepotrzebnych odpadków. Zaburzenie autofagii podobnie jak szlak Ub-P może posiadać groźne następstwa dla naszych organizmów, np. zaburzenie autofagii w neuronach może przyczyniać się do rozwoju choroby Alzheimera oraz powodować przedwczesne starzenie [50].

Medyczne aspekty autofagii

Autofagia a komórki nowotworowe

Pomimo że zjawisko autofagii jest korzystne dla komórek, to czasami może być szczególnie niebezpieczne dla pacjentów z chorobą nowotworową. Wykazano, bowiem że autofagię mogą wykorzystywać komórki nowotworowe, aby ratować się przed skutkami chemo- i radioterapii. Podczas napromieniania lub po podaniu chemioterapeutyków następuje podwyższenie aktywności autofagosomów w komórkach. Autofagia pozwala usunąć uszkodzone mitochondria, zanim zainicjują one proces apoptozy. Komórki nowotworowe mogą również wykorzystywać autofagię, aby chronić się przed zahamowaniem dostarczania do słabo unaczynionego guza składników odżywczych i tlenu. Autofagia w takim przypadku pozwala na spożytkowanie zbędnych cząsteczek i struktur komórkowych do produkcji energii i potrzebnych organelli w komórce. Wydaje się, zatem celowe w terapii zahamowanie autofagii podczas radio- lub chemioterapii. Trwają próby nad opracowaniem leków, które hamowałyby ten proces. Nie jest to jednak łatwe zadanie, gdyż zahamowanie autofagii w komórkach nowotworowych może z kolei doprowadzić do zwiększenia liczby uszkodzeń DNA, co może wpłynąć na remisję choroby. Uzyskanie, zatem właściwego efektu terapeutycznego przy użyciu leków tego typu będzie zapewne wymagać rozważnego wyważenia proporcji poszczególnych elementów terapii [50, 51].

³ Proces autofagii rozpoczyna się od ułożenia specyficznych cytoplazmatycznych białek i lipidów w dwuwarstwową błonę o kształcie miseczki, która otacza fragment cytoplazmy ulegając stopniowemu zamknięciu, wykształcając kapsułkowany autofagosom. Taki autofagosom zawiera, zatem przypadkowy fragment cytoplazmy, w której mogą się znaleźć różne molekuly, organelle czy patogeny. Po zamknięciu autofagosom transportuje swoją zawartość do znajdującego się w innym miejscu komórki lizosomu. Lizosomy są organelami, które zawierają enzymy trawienne, dochodzi do połączenia obu struktur i enzymy proteolityczne rozkładają dostarczony fragment cytoplazmy na prostsze związki, które są ponownie włączane do procesów biochemicznych odbywających się w komórce. Wydaje się, że już od chwili powstania proces ten służył do obrony komórek przed głodem i mógł być również prymitywnym mechanizmem odpornościowym komórek. W przypadku braku pożywienia komórki zaczynają wykorzystywać te składniki, które nie są niezbędne do przeżycia.

Autofagia w terapii chorób OUN

Właściwy proces autofagii pełni istotną rolę w utrzymaniu prawidłowych funkcji wszystkich komórek, jednak szczególnie ważny jest dla prawidłowego działania długo żyjących neuronów. Niewydolny proces autofagii odgrywa kluczową rolę w rozwoju schorzeń neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy Huntingtona, które prowadzą do powstania powolnych, lecz nieuniknionych zmian w mózgu. Jednym z typowych objawów starzenia się komórek nerwowych jest stopniowe gromadzenie się złogów lipo-peptydowych, amyloidu beta. Wydaje się, że złogi te powstają w wyniku niekompletnej autofagii. Sugeruje to jednocześnie sposób terapii w celu możliwości spowolnienia rozwoju choroby Alzheimera, która polegałaby na usprawnieniu autofagii. Taki sposób podejścia terapeutycznego próbuje się wykorzystać w terapii choroby Huntingtona. W tym celu stosuje się lek o nazwie rapamycyna. Związek ten, jako lek hamujący odpowiedź immunologiczną, stosowany jest w transplantologii w celu zapobiegania odrzucaniu przeszczepów narządów. W badaniach okazało się, że związek ten stymuluje autofagię i próbuje się go zastosować do usunięcia złogów białkowych [51].

Ostatnie lata przyniosły wiele szczegółów dotyczących przebiegu i regulacji procesu autofagii. Sprawne funkcjonowanie autofagosomów chroni nasz organizm przed chorobami infekcyjnymi, może opóźniać powstawanie wielu chorób neurodegeneracyjnych OUN. Dokładne zrozumienie mechanizmów zarządzających działaniem autofagosomów i znalezienie sposobu ich farmakologicznej stymulacji może przyczynić się do odkrycia nowych skutecznych perspektyw terapii nowotworów, chorób zakaźnych, zaburzeń immunologicznych oraz zaburzeń degeneracyjnych OUN, a w przyszłości może pozwolić na opóźnienie procesów starzenia się organizmu. Podczas badań prowadzonych w University of Pensylwania (USA) odkryto molekularny łącznik między dwoma głównymi szlakami rozkładu białek tj. między proteasomami i autofagami. Do chwili odkrycia obu systemów degradacji uważano, że choć przeznaczone są do tego samego celu, to jednak wykonują swoją rolę za pomocą różnych torów, które nie mają ze sobą nic wspólnego. Jednak badania wykazały, że obydwa mechanizmy mogą łączyć się ze sobą, a kluczową rolę w tym odgrywa białko HDAC6. Okazało się, że w mutantach, w których zablokowano aktywność proteasomów ich funkcje przejmowały autofagosomy, które były włączane w wyniku nadekspresji genu HDAC6. Przy wyłączonym genie nie następuje indukcja autofagocytozy, natomiast nadekspresja tego genu istotnie stymuluje ten proces. Badania sugerują, że odpowiedni poziom białka HDAC6, gdy proteasomy nie działają w komórce prawidłowo, może regulować proces autofagocytozy [52].

Mechanizm działania inhibitorów proteasomów

Inhibitory proteasomów otrzymano po raz pierwszy pod koniec lat 80. ubiegłego wieku. Były one pierwotnie używane jako narzędzia laboratoryjne w badaniach aktywności proteasomów w komórce w celu określenia ich roli w procesach komórkowych [31]. Inhibitory proteasomów mogą działać na kilka sposobów [30]. W jednym przypadku inhibitor może inaktywować centrum aktywne proteasomu w wyniku przyłączenia się do aminokwasu pełniącego funkcje katalityczne tj. N-terminalnej treoniny. Blisko N-terminalnej treoniny znajduje się kilka kieszeni rozpoznających i przyłączających ubikwitynowane białka przeznaczone do degradacji. Do tych kieszeni mogą się również przyłączać inhibitory proteasomów blokując tym samym przyłączanie substratów [53]. Wiele inhibitorów może wykazywać podwójny mechanizm działania w stosunku do proteasomów, tj. blokować miejsce przyłączania degradowanych białek i modyfikować N-terminalną treoninę. Przykładem takiego działania może być peptydowy inhibitor Ac-LLnL, który zawiera terminalną grupę acetylową, która formuje tioacetylowe połączenie z N-terminalną treoniną. Inhibitory o charakterze estrowym, takie jak laktacystyna czy niektóre polifenole otrzymane z zielonej herbaty hamują aktywność proteasomów, w wyniku tworzenia kowalencyjnych wiązań z N-terminalną treoniną [54, 55]. Niezwykle ciekawe z medycznego punktu widzenia są prace zmierzające do wykorzystania specyficznych inhibitorów proteasomów w terapii. W badaniach przedklinicznych wykazano, że inhibitory proteasomów są bardziej cytotoksyczne dla proliferujących komórek nowotworów niż spoczynkowych komórek prawidłowych [56]. Wykazano, że inhibitory proteasomów są zdolne do uruchamiania procesów apoptozy w hodowlach nowotworowych ludzkich linii komórkowych [56, 57], co zasugerowało możliwość zastosowania tego typu związków w terapii przeciwnowotworowej. Wydaje się, że komórki nowotworowe mają zmienne lub upośledzone białka cyklu komórkowego, co prowadzi do zwiększenia szybkości proliferacji, wzrostu gromadzenia się uszkodzonych białek i w ten sposób do większej zależności od procesów degradacji proteasomalnej. Aby zastosować inhibitory do odpowiedniej terapii konieczne jest poznanie dokładnych szlaków degradacji proteasomów. Należy bowiem

Proteasomy zbudowane są z dwóch białkowych elementów. Pierwszy z nich to rdzeń o wyglądzie cylindra z wewnętrznym kanałem. W tym to kanale przebiega proces destrukcji białek. Kanał zbudowany jest z 4 pierścieni, które zawierają specyficzne, peptydazy czyli enzymy proteolityczne odpowiedzialne za proteolizę białek. Następnym elementem proteasomu to część regulatorowa położona po dwóch stronach cylindra, odpowiedzialna za rozpoznawanie białek przeznaczonych do degradacji po ich uprzednim wyznakowaniu przez ubikwitynę.

zdać sobie sprawę, że inhibitory proteasomów w wyniku hamowania degradacji białek, powodują akumulację białek źle sfałdowanych lub uszkodzonych, co z kolei może wywołać odpowiedź szoku cieplnego i powodować śmierć komórki. W wielu przypadkach terapia z zastosowaniem inhibitorów proteasomów może przyczynić się do powstawania niekorzystnych zmian w komórkach pacjentów. Działanie przeciwno-

totworowe inhibitorów w wielu przypadkach związane jest z hamowaniem aktywności transkrypcyjnego czynnika NF- κ B, który jest ważnym regulatorem wpływającym na proces apoptozy w wielu typach komórek nowotworowych [57]. Proteasomy biorą aktywny udział w degradacji wielu białek regulatorowych, supresorów nowotworowych, czynników transkrypcyjnych i onkogenów. Proces inhibicji proteasomów może prowadzić do apoptozy przez wpływ na stężenie różnych ważnych fizjologicznie białek, które mogą wywoływać hamowanie aktywności NF- κ B, zwiększenie aktywności białek p53 oraz akumulację białek p27 i p21, które są inhibitorami cyklinozależnych kinaz [48]. Czynniki hamujące aktywność proteasomów mogą skutecznie

wspomagać chemioterapię, w wyniku hamowania mechanizmów odporności komórek nowotworowych na chemioterapeutyki. Inhibitory proteasomów zwiększają przeciwnowotworowe działania leków, takich jak doksorubicyna, antracykliny, co wiąże się z wpływem na aktywność NF- κ B i intensywność przekazywania sygnału przez komórki nowotworowe [48]. Ważnym mechanizmem oporności komórek nowotworowych na chemioterapię jest ekspresja przez te komórki membranowej pompy glikoproteinowej P, która powoduje wyrzucanie chemioterapeutyków na zewnątrz, co w konsekwencji zmniejsza ich wewnątrzkomórkowe stężenie i skuteczność działania. Prawidłowe funkcjonowanie proteasomów jest niezbędne w formowaniu tych glikoproteinowych struktur w błonach komórek nowotworowych. Hamowanie aktywności proteasomów zmniejsza drastycznie ilość pomp glikoproteinowych P w błonach komórek nowotworowych, co hamuje wydalanie chemioterapeutyków i zwiększa ich skuteczność terapeutyczną [49].

Inhibitory proteasomów

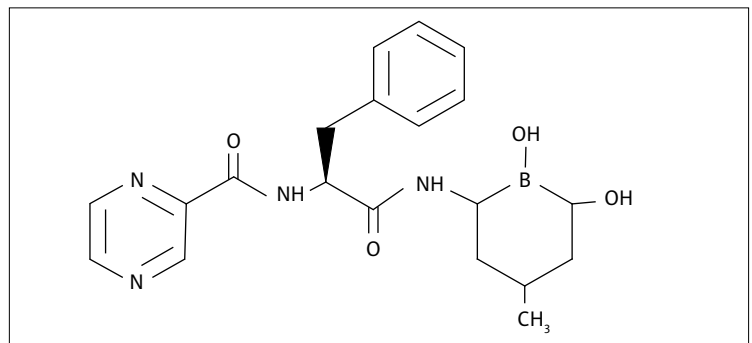
Możliwość kierowanej terapii w stosunku do szlaku ubikwityno-proteasomowego jeszcze w latach 90. ubiegłego wieku spotykało się z dużym sceptycyzmem ze względu na fakt, że szlak ten odgrywa istotną rolę w prawidłowej homeostazie komórkowej.

Jednak pierwsze badania w warunkach *in vivo* wykazały, że inhibitory proteasomów wykazują istotne działanie przeciwnowotworowe przy stosunkowo małej toksyczności [48]. Do tej pory odkryto i opisano kilka inhibitorów proteasomów [49]. Jednym z nich jest np. laktacystyna, która jest nieodwracalnym inhibitorem podjednostki katalitycznej β proteasomu. Związek ten indukuje apoptozę ludzkich komórek monoblastycznych [58]. Innym jest benzylooksykarbonylo-(Z)-Leu-Leu-leucynal, który jest tripeptydo-aldehydowym inhibitorem proteasomów indukującym w komórkach białaczkowych apoptozę zależną od białka p53. Powyższe inhibitory charakteryzują się małą swoistością w działaniu i z tego względu podjęto badania w celu zaprojektowania i otrzymania związków hamujących szlak proteasomów w sposób bardziej swoisty. Związkami tymi okazały się pochodne kwasu boronowego [56]. Kluczowym związkiem jest dipeptyd kwasu boronowego – bortezomib (kwas N-pyrazynokarbonylo-L-fenyloalanino-L-leucyno-boronowy, zwany uprzednio PS-341 (**rycina 7**) [59]. Mechanizm działania inhibitora proteasomu PS-341 opiera się w głównej mierze na interferencji z drogą przekazywania sygnałów poprzez receptor jądrowy NF- κ B [60]. Hamuje on szlak proteasomowy w sposób odwracalny poprzez wiązanie się bezpośrednio do rdzenia kompleksu proteasomowego 20 S, gdzie tworzy kowalencyjne wiązania z aktywnym miejscem treoniny. Połączenie to hamuje aktywność centrów aktywnych proteasomów. Związek ten był pierwszym inhibitorem aktywności proteasomów, który został użyty w badaniach klinicznych [61]. Hideshima i wsp. [62], wykazali, że bortezomib hamuje znacząco ekspresję molekuł adhezyjnych zmniejszając interakcję komórek szpiczaka z mikrośrodowiskiem szpiku przez zmniejszenie sekrecji cytokin, a wśród nich TNF, który stymuluje NF- κ B [62]. Bortezomid okazał się szczególnie przydatny w terapii szpiczaka mnogiego opornego na uprzednio stosowane terapie, deksametazonem, melfalanem i talidomidem. Komórki szpiczaka mnogiego umiejscawiają się głównie w szpiku kostnym, gdzie różnorodne czynniki humoralne wspomagają wzrost i przeżycie komórek nowotworowych, a także zapobiegają efektom cytotoksycznym chemioterapii. Przyleganie komórek szpiczaka mnogiego do komórek zrębu szpiku kostnego wywołuje wydzielanie cytokin, takich jak interleukina-6, 2 (IL-6/IL-2), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1) oraz naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), które z kolei nie tylko indukują proliferację komórek szpiczaka mnogiego, ale także hamują wywołaną przez chemioterapię apoptozę komórek nowotworowych [6]. Badania kliniczne wykazały, że ekspresja wielu czynników humoralnych po zastosowaniu bortezomibu uległa zahamowaniu, co przyczynia się do pomyślnego leczenia bortezomibem w szpiczaku mnogim [6].

W badaniach przedklinicznych wykazano, że inhibitory proteasomów są bardziej cytotoksyczne dla proliferujących komórek nowotworów złośliwych niż spoczynkowych komórek prawidłowych. Inhibitory proteasomów są zdolne do uruchamiania procesów apoptozy w komórkach nowotworowych, co zasugerowało możliwość zastosowania tego typu związków w terapii przeciwnowotworowej.

Mechanizm działania bortezomibu

Jednym z ważniejszych efektów terapeutycznych wywołanych stosowaniem bortezomibu jest indukcja apoptozy, która następuje w wyniku hamowania aktywności białka NF-κB. Grupa białek NF tworzy rodzinę dimerycznych czynników transkrypcyjnych, które rozpoznają i wiążą wspólne motywy sekwencji w chromosomalnym DNA [63]. NF-κB jest najważniejszym czynnikiem transkrypcyjnym tej rodziny i występuje w cytoplazmie prawie wszystkich komórek [63]. Konstitutywna aktywacja NF-κB w komórkach, wiąże się z proliferacją i opornością na leki, nadając w ten sposób komórkom nowotworowym oraz prawidłowym różnicującą wrażliwość na inhibitory proteasomów. W warunkach fizjologicznych obecny w cytoplazmie czynnik jest połączony ze swoistym inhibitorem I-κB. Podczas pobudzenia komórek np. przez cytokiny, stres środowiskowy czy chemioterapię, następuje aktywacja kaskady sygnałów, która prowadzi do aktywacji specyficznej kinazy białkowej IKK, która fosforyluje inhibitor I-κB. Kinaza IKK fosforyluje dwie reszty serynowe w N-końcowej domenie regulatorowej inhibitora I-κB [64]. Ufosforylowane seryny w N-końcowej pozycji białkowego inhibitora są rozpoznawane z kolei przez ligazę ubikwityny E3 typu SCF, co prowadzi do ubikwitynacji inhibitora I-κB, który tak naznaczony jest następnie degradowany przez proteasomy. Degradacja inhibitora I-κB powoduje aktywację czynnika NF-κB, który przemieszcza się do jądra, gdzie wiąże się ze zgodnymi sekwencjami obecnymi w regionach promotorowych wielu genów związanych z czynnikami wzrostu/przeżycia, wywołując ich transkrypcję. W końcowym etapie prowadzi to do zwiększenia ekspresji różnych cytokin, chemokin, cząsteczek adhezyjnych i ich receptorów [6]. Aktywacja NF-κB sprzyja wytwarzaniu cytokin (IL-6, TNF), czynników przeżycia (inhibitory białek apoptozy), i cząsteczek przylegania międzykomórkowego (cząsteczka przylegania komórek naczyń i selektyna-E) [65]. Przyleganie patologicznych plazmocytów do komórek zrębowych szpiku kostnego wywołuje mediowaną przez NF-κB transkrypcję i wydzielanie IL-6 i IGF-1 [65]. Zarówno IL-6, jak i IGF-1 sprzyjają przeżyciu komórek szpiczaka mnogiego w szpiku kostnym. Komórki nowotworowe posiadają zwiększoną (w porównaniu do komórek prawidłowych) aktywność NF-κB [65], natomiast wrażliwe na leki komórki szpiczaka mnogiego wykazują mniejszą aktywność NF-κB niż odporne na leczenie komórki szpiczaka mnogiego. Zwiększone stężenia NF-κB relacjonowano także w komórkach szpiczaka mnogiego pochodzących od chorych z nawrotem po chemioterapii [65]. Wyniki te wskazują, że NF-κB jest kluczowym regulatorem wzrostu i przeżycia komórek nowotworowych, który nadaje oporność na chemioterapię. Terapeutyczne



Rycina 7. Bortezomib

inhibitory proteasomów, takie jak wspomniany wyżej bortezomib hamują aktywność NF-κB w komórkach pacjentów w wyniku blokowania degradacji I-κB [66]. Hamowanie aktywności czynnika NF-κB pełni korzystną rolę u pacjentów chorych na nowotwory w wyniku zmniejszenia ekspresji różnych czynników wzrostu, przeżycia i angiogenetycznych, które umożliwiają rozwój i proliferację komórek nowotworowych. Prowadzi to między innymi do obniżania poziomu białek proapoptycznych Bcl-2 i A1/Bfl-1, wywołujących uwalnianie cytochromu C, aktywację kaspazy 9 oraz apoptozę komórek [66]. Wydaje się, że inhibicja aktywności czynnika NF-κB, a w konsekwencji apoptoza wywołana przez bortezomib, jest jednym z najważniejszych mechanizmów działania tego związku [66]. Aktywacja czynnika NF-κB powoduje ekspresję różnych cytokin mediujących angiogenezę i wzrost. W wyniku działania bortezomibu następuje hamowanie angiogenezy oraz blokowanie zależnej od czynnika NF-κB indukcji wydzielania przez komórki zrębowe czynników wzrostu, takich jak IL-6, co w znacznym stopniu ogranicza wzrost komórek nowotworowych [67]. Dalsze prace wykazały, że apoptoza indukowana przez bortezomib wiąże się nie tylko z hamowaniem aktywności czynnika NF-κB, ale również z takimi zdarzeniami jak pobudzenie klasycznych białek odpowiedzi stresowej, takich jak białka szoku cieplnego Hsp27, Hsp70 i Hsp90, zwiększenie ilości NH₂ końcowej kinazy c-jun, zmiana potencjału błony mitochondrialnej i wytwarzanie reaktywnych odmian tlenu, co powoduje indukcję wewnętrznego szlaku śmierci komórki (tj. uwolnienie do cytozolu białek mitochondrialnych – cytochromu c i mitochondrialnego aktywatora kaspaz), hamowanie szlaków sygnałowych kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny i kinazy 3-fosfatydiloizozotylo. Wszystkie powyższe mechanizmy sygnałowe mogą mieć

Bortezomib jest pierwszym inhibitorem aktywności proteasomów, który został użyty w badaniach klinicznych. Jednym z ważniejszych efektów terapeutycznych wywołanych stosowaniem bortezomibu jest indukcja apoptozy, która następuje w wyniku hamowania aktywności białka NF-κB. Bortezomib okazał się szczególnie przydatny w terapii szpiczaka mnogiego opornego na uprzednio stosowane terapie, deksametazonem, melfalanem i talidomidem.

łączny udział w działaniu bortezomibu przeciw szpiczakowi mnogiemu [67].

Przyszłe kierunki badań

Do chwili obecnej główny kierunek badań szlaku ubikwityno-proteasomowego dotyczy otrzymywania i zastosowania inhibitorów proteasomów. Natomiast zainteresowanie badaniami dotyczącymi mechanizmów odpowiedzialnych za ubikwityzację i otrzymanie odpowiednich substancji, które stymulowałyby ten proces w celach terapeutycznych jest kierunkiem, który od niedawna jest badany. Aktywacja lub hamowanie działania proteasomów powoduje spadek lub wzrost stężenia całej puli niepożądanych

białek komórkowych. Zastosowanie inhibitorów proteasomów nie będzie jednak jedynym skutecznym podejściem terapeutycznym podczas terapii danej jednostki chorobowej. Jest raczej niemożliwe, by można było selektywnie stymulować degradację lub hamowanie rozkładu tylko określonych białek patologicznych, decydujących o powstawaniu danej choroby poprzez wpływ na aktywność proteasomów. Terapia przy udziale inhibitorów polega na hamowaniu aktywności proteasomów zarówno w komórkach zmienionych patologicznie, jak i komórkach zdrowych. Jest ona skuteczna w przypadku komórek nowotworowych, w których zaburzonych jest wiele procesów biochemicznych. Trudno jednak będzie mechanizm takiej terapii zastosować do choroby molekularnej, w której praktycznie wszystkie komórki somatyczne organizmu wykazują się produkcją jednego wadliwego białka. Wydaje się, że selektywne hamowanie aktywności enzymów stymulujących ubikwityzację (E1, E2 czy E3) może być wydaj-

niejszym narzędziem terapeutycznym niż inhibitory proteasomów. Leki, które wykazywałyby zdolność hamowania lub pobudzenia aktywności konstytutywnej ligazy E3 mogłyby działać bardziej selektywnie wobec konkretnej jednostki chorobowej przy stosunkowo niskich efektach toksycznych dla organizmu. Jednym z ciekawszych potencjalnych celów takiej terapii jest białko MDM2, który ulega silnej ekspresji w niektórych nowotworach np. raku piersi. MDM2 należy do rodziny białek E3 odpowiedzialnych za degradację czynnika p53. Zahamowanie aktywności MDM2 powoduje zwiększenie poziomu p53, co prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego i nasilenia apoptozy komórek nowotworowych [55].

Następny interesujący cel to proteina F-box, która jest odpowiedzialna, za ubikwitynację inhibitora I- κ B. Zahamowanie tego procesu obniża aktywność NF- κ B, co uwrażliwia komórki nowotworowe na chemioterapię [56]. Innym białkiem będącym celem terapii jest białko p27. Ten inhibitor cyklin zależnych od kinaz jest obecny w niskich stężeniach szczególnie w komórkach bardzo złośliwych nowotworów. Białko to ulega ubikwityzacji w ostatniej fazie cyklu komórkowego przez kompleks SCF. Hamowanie aktywności tego kompleksu powoduje wzrost poziomu białka p27 w komórce, a konsekwencją tego jest zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptoza komórek [68, 69, 70, 71].

Podsumowanie

Wyniki badań klinicznych wskazują, że inhibicja proteasomów może się stać obiecującą strategią terapeutyczną w leczeniu nowotworów, szczególnie w leczeniu szpiczaka mnogiego (MM) opornego na chemioterapię. Wprowadzony do leczenia inhibitor proteasomów bortezomib jest pierwszym lekiem zatwierdzonym przez FDA w leczeniu MM. Obecnie trwają badania nad zastosowaniem tego typu inhibitora aktywności proteasomów w przypadku różnych hematologicznych i innych typach nowotworów złośliwych. Otrzymane wyniki sugerują możliwość zastosowania tego typu inhibitora w różnego typu chłoniakach oraz nowotworach złośliwych, takich jak niedrobnokomórkowy rak oskrzela, raki nosogardła, czerniaku złośliwym czy raku nerek [72, 73]. Prowadzone są również badania nad skojarzeniem inhibitorów proteasomów z innymi chemioterapeutykami. Dane przedkliniczne wykazują, bowiem, że w nowotworach litych aktywność bortezomibu jest zwiększona, gdy stosuje się go w połączeniu z lekami chemioterapeutycznymi, takimi jak gemcytabina, doksorubicyna, docetaksel. W przypadku innych, takich jak melfalan następuje nawet synergizm w działaniu. [74]. Trwają również próby w celu otrzymania selektywnych leków, które będą zdolne do hamowania aktywności białek E3. Ze względu na fakt, że każda z form białka E3 jest odpowiedzialna za niszczenie niewielkiej grupy białek wewnątrz komórki, otrzymane inhibitory powinny być wysoko specyficzne, o małym działaniu niepożądanym. Badania wykazują, że prawidłowa aktywność proteasomów może regulować wiele procesów biochemicznych w komórce i z tego względu hamowanie ich aktywności przez inhibitory może dawać wiele efektów ubocznych. Są, zatem potrzebne szczegółowe badania funkcji proteasomów, które pomogą w pełni ocenić ryzyko używania w terapii czynników hamujących aktywność działania tych struktur. Z kolei wiedza zebrana na ten temat ułatwi projektowanie specyficznych inhibitorów, które

Do chwili obecnej główny kierunek badań szlaku ubikwityno-proteasomowego dotyczy otrzymywania i zastosowania inhibitorów proteasomów. Natomiast wydaje się, że selektywne hamowanie aktywności enzymów stymulujących ubikwityzację (E1, E2 czy E3) może być wydajniejszym narzędziem terapeutycznym niż inhibitory proteasomów. Leki, które wykazywałyby zdolność hamowania lub pobudzenia aktywności konstytutywnej ligazy E3 mogłyby działać bardziej selektywnie wobec konkretnej jednostki chorobowej przy stosunkowo niskich efektach toksycznych dla organizmu.

będą wykorzystane do hamowania ściśle określonych procesów komórkowych w danej jednostce chorobowej.

Otrzymano: 2009.04.31 · Zaakceptowano: 2009.05.08

Piśmiennictwo

- Goldberg A.L.: Science 268, 522-532, 1995.
- Stevenson J., Nho C.W.: Proc Am Soc Clin Oncol, 22, 202-209, 2003.
- Cheson B.D.: Curr Oncol Rep 3, 250-259, 2001.
- Brooks P., Fuertes G., Murray R.Z.: Biochem. J., 346, 155-161, 2000.
- Spataro V., Norbury C., Harris A.L.: Br. J. Cancer, 77, 448-455, 1998.
- Jurczyszyn A., Skotnicki B.: Adv Clin Exp Med., 15, 2 309-320, 2006.
- Ping Dou Q.: Progress in Cell Cycle Research, 5, 441-446, 2003.
- Tan G., Waldmann T.A.: Cancer Res. 62, 1083-1087, 2002.
- Podlaska A., McIntyre J.: Mol. Microbiol. 49, 1321-1332, 2003.
- Skoneczna A., McIntyre J.: J. Mol. Biol. 366 (4), 1074-86, 2007.
- Spataro V., Harris A.L.: Br J Cancer 77, 448-455, 1998.
- Adams J., Palombella V.J.: Invest New Drugs, 18, 109-121, 2000.
- Palombella V.J., Conner E.M.: Proc Natl Acad Sci USA, 95, 15671-15676, 1998.
- Spataro V.: Br J Cancer 56, 448-455, 2000.
- Goldberg A.L.: Nature Biotechnology, vol 5, 494-496, 2000.
- Borman S.: Chemical and Engineering News, vol. 78, 12, 43-47, 2000.
- Berg J., Stryer L.: Biochemia PWN, Warszawa 2005.
- Fuller G., Shields D.: Podstawy molekularne biologii komórki. PZWL. Warszawa 2000.
- Thrower J.S., Hoffman I.: EMBO J, 19, 94-102, 2001.
- Hochstrasser M.: Natl Cell Biol vol. 2, 153-157, 2000.
- Tanaka K.: Arch Biochem Biophys 385, 89-94, 2001.
- Tobias T.E., Varshavsky A.: Science 254, 1374-1384, 1991.
- Chengkai D.: Cell, vol 6, 1005-1018, 21 IX. 2007.
- Whitesell L., Lindquist S.: Nature Reviews Cancer vol. 10, 761-772, 2005.
- Sherr C.J., Roberts J.M.: Genes Dev. vol 13, 1501-1512, 1999.
- Dou Q.P., Pardee A.B.: Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. vol. 53, 197-217, 1996.
- Nevins J.R., Jakoi L.: J. Cell Physiol. 173, 233-236, 1997.
- Won K.A., Reed S.I.: Embo J, 15, 4182-4193, 1996.
- Deanna M., Koanepp J.: Cell, vol. 97, 4, 431-434, 1999.
- Kisselev A.F., Goldberg A.L.: Chem. Biol. 8, 739-758, 2001.
- Lowe J., Stock D.: Science 268, 533-539, 1995.
- Hochstrasser M.: Curr. Opin. Cell Biol. vol. 7, 215-223, 1995.
- Yang Y., Peterson P.A.: J. Biol. Chem. 270, 27687-27694, 1995.
- Rechsteiner M., Realini C.: J. Biochem. 345, 1-15, 2000.
- Tanahashi N., Tanaka K.: J. Biol. Chem. 275, 14336-14345, 2000.
- Whitby F.G.: Nature 408, 115-120, 2000.
- Seemuller E.: Science, 268, 579-582, 1995.
- Pickart C.M., VanDemark A.P.: Nature Struct Biol, 7, 999-1001, 2000.
- Baumeister J.: Cell, 92: 367-373, 1998.
- Glickman MH, Ciechanover A: Physiol Rev, 82: 373-428, 2002.
- Jesenberger V, Jentsch S: Nat Rev Mol Cell Biol, 3: 112-121, 2002.
- Budd GT, Adamson PC, Gupta M.: Clin Cancer Res. 4, 635-642, 1998.
- Robertson JF: Br. J. Cancer, 85(Suppl 2): 11-14, 2001.
- Nam S., Smith D.M.: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 10, 1083-1088, 2001.
- Meyer S., Kohler N.G.: FEBS Lett, 413: 354-358, 1997.
- Orlowski R.Z.: Cell Death Differ, 6: 303-313, 1999.
- Orlowski R.Z., Baldwin A.S: Trends Mol Med. 8: 385-389, 2002.
- Orlowski R.Z., Small G.W.: J. Biol Chem 277, 27864-27871, 2002.
- Dickson RB, Lippman ME: Endocr Rev. vol 16, 559-589, 1995.
- Rubinsztein J.E., Murphy D.L.: Nature Reviews Drug Discovery, vol. 6, 304-312, 2007.
- Shintani T.: Science vol 306, 990-995, 2004.
- Pandey U.B.: Nature 447, 860-864 (14 June) 2007.
- Dou Q.P., Nam S.: Exp. Opin. Ther. Patents 10, 1263-1272, 2000.
- Fenteany G., Schreiber S.L.: Science 268, 726-731, 1995.
- Nam S., Smith D.M.: J. Biol. Chem. 276, 13322-13330, 2001.
- Orlowski M., Wilk S: Arch Biochem Biophys, 383: 1-16, 2000.
- Adams J, Palombella V.J.: Cancer Res, 59: 2615-2622, 1999.
- Orlowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A.: Cancer Res, 58: 4342-4348, 1998.
- Imajoh-Ohmi S., Omura S.: Bioch Bioph Res Commun, 217, 1070-1077, 1995.
- Richardson P.G., Anderson K.C.: N Engl J Med 348, (26), 2609-2617, 2003.
- Adams J.: Oncologist 7, 9-16, 2002.
- Hideshima T., Akiyama M.: Blood, 101: 703-705, 2003.
- Almond J.B., Cohen G.M.: Leukemia, 16, 433-44, 2002.
- Mitsiades N., Anderson K.C.: Blood 99, 4079-4086, 2002.
- Karin M., Delhase M.: Semin Immunol 12, 85-98, 2000.
- Hideshima T., Anderson K.C.: J. Biol Chem 277, 16639-16647, 2002.
- Mitsiades N., Anderson K.C.: Proc Natl Acad Sci USA, 99, 14374-14379, 2002.
- Shirane M., Hatakeyama S.: Biol Chem, 274: 28169-28174, 2002.
- Chiarle R., Pagano M., Inghirami G: Breast Cancer Res. vol. 3, 91-94, 2001.
- Podust VN et al.: A Nedd8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27Kip1 by ubiquitination, Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97(9):4579-84.
- Hara T.: J Biol Chem, vol. 276, 48937-48943, 2003.
- Goy A.H., Mesina O.: Proc Am Soc Clin Oncol, 22, 570-574, 2003.
- O'Connor O.A., Moskowitz C.: Proc Am Soc Clin Oncol, 22, 566-569, 2003.
- Drucker B.J., Bacik J.: Proc Am Soc Clin Oncol, 22, 386-397, 2003.
- Lenz H.J.: Cancer Treat Rev 29, 41-48, 2003.