

Nóbelsverðlaunin í efnafræði 2004: Ubiquitin miðlað próteinniðurbrot

Fyrir rúmlega hálfri öld voru umskipti próteina innan frumu lítt þekkt. Almenn var talið að frumur væru stöðugar einingar en framsýnir vísindamenn áttuðu sig á að nýmyndun og niðurbrot próteina væru mikilvægir ferlar og undir nákvæmri stjórn. Þegar farið var að vinna með geislamerktar amínósýrur fengust sannanir fyrir því að tilurð og eyðing próteina innan fruma væru sívirk fyrirbæri (Simpson MV 1953). Í þeim rannsóknum kom einnig fram að þörf var á orku, í formi ATP, fyrir próteinniðurbrot. Þetta olli nokkrum vangaveltum, því einkennilegt þótti að rof á orkuríku peptíðtengi þyrfti viðbótarorku, enda var ekki þörf á þessu hjá þekktum próteinkljúfum. Nokkur skýring þótti þó að orkuþörfin greindist snemma í próteinniðurbrotsferlinu, sem benti til þátttöku í stjórnun þess (Hershko & Tomkins 1971). Meltikorn höfðu verið þekkt frá því um 1960 og almennt var talið að þau væru helsti vettvangur próteinniðurbrots í frumunni. Nú hefur komið í ljós að próteinniðurbroti er nákvæmlega stýrt og mikil sértækni er varðandi hvarfefni, tíma- og staðsetningu. Lykilprótein í þessari stjórnun er ubiquitin sem fyrst var lýst árið 1975 (Goldstein et al.). Nafnið er dregið af latínu “ubique” sem þýðir “alls staðar”, enda er próteinið víða tjáð í talsverðu magni.

Í dag er heilmikið vitað um ubiquitin sem er 9kDa, 76 amínósýru-prótein. Það er vel varðveitt í þróun, t.d. er einungis þriggja amínósýru munur á ubiquitini í gerfrumu og spendýri. Ubiquitin hefur fjórar lysin (K) amínósýrur í stöðu 11, 29, 48 og 63. Lysin hefur lausan amínóhóp, en það er forsenda þess að ubiquitin geti myndað langar keðjur, eða fjölubiquitin. Þessar keðjur verða til þegar carboxyl-endi (C-endi) einnar ubiquitin sameindar er í samgildu tengi við K48 á næstu ubiquitin sameind. Prótein sem eru tengd fjölubiquitini eru merkt til niðurbrots og fyrsta skrefið er að flytja þau til próteasóma. Próteasóm eru fjölpróteinaflóki með tunnulaga byggingu. Próteinin eru



Aaron Ciechanover



Avram Hersko

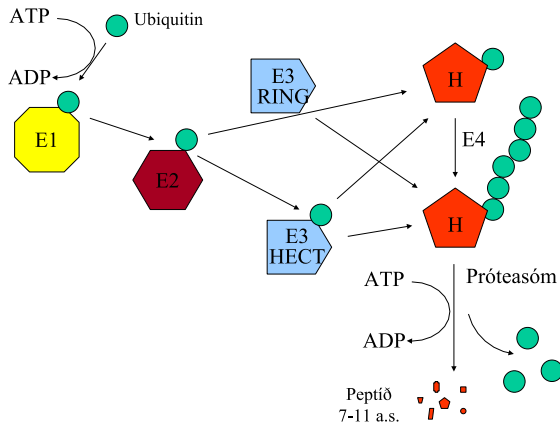


Irwin Rose

þrædd inn í próteósómin og brotin niður þar í lítil peptíð, oft 7-11 amínósýrur að lengd. Ubiquitin er ekki brotið niður í próteasómum, einungis er klippt á milli ubiquitin sameinda, en það gerist einnig utan próteasóma. Þannig er hægt að endurnota ubiquitin fyrir áframhaldandi próteinniðurbrot.

Nóbelsverðlaunahafarnir í efnafræði 2004, Aaron Ciechanover (f. 1947), Avram Herskho (f. 1937) og Irwin Rose (f. 1926) uppgötvuðu í sameiningu ubiquitin-miðlað próteinniðurbrot, ferli þar sem lífhvatakerfi tengir fjölmargar sameindir ubiquitins við prótein sem fruman þarf að losa sig við. Ákvörðun um veitingu Nóbelsverðlaunanna 2004 byggði einkum á rannsóknum sem þeir framkvæmdu á fyrri hluta níunda áratugarins. Aaron Ciechanover og Avram Herskho hafa lengst af starfað á Institute of Technology Haifa, Israel. Einnig störfuðu þeir báðir sem gestavísindamenn (þá var Ciechanover enn doktorsnemandi) á rannsóknastofu Irwin Rose, Institute for Cancer Research, Fox Chase Center í Philadelphiu Bandaríkjunum. Eftir doktorsprófið 1981 færði Ciechanover sig yfir til Massachusetts Institute of Technology (MIT) í Boston í Bandaríkjunum. Síðustu árin hefur Irwin Rose starfað við Kaliforníusháskólann í Irvine.

Nóbelsverðlaunin fengu þeir félagar einkum fyrir vinnu sína við að skilgreina þau lífhvatakerfi sem flytja ubiquitin yfir á prótein sem brjóta á niður (sjá mynd). Fyrsta skrefið er að C-endi ubiquitins tengist E1 virkjunarlífhvatanum á brennisteini amínósýrunnar cysteins í E1 með samgildu tengi. Þetta krefst ATP. Næst er ubiquitin flutt yfir á tengilífhvatann E2 og samskonar thiolestertengi milli ubiquitins og lífhvata myndað. E3 HECT ubiquitin lágasar tengjast einnig ubiquitini með samskonar samgildu tengi en E3 RING ubiquitin lágasar hvata tengingu ubiquitins beint við hvarfefni (H á mynd). C-endi ubiquitins tengist amínóhóp lysins á hvarfefni og síðan á K48 amínóhóp á



Mynd 1. Ubiquitin miðlað próteinniðurbrot. H = hvarfefni, a.s. = amínósýrur. Frekari skýringar eru í texta.

ubiquitin sameindinni sjálfri til að keðjumyndun geti átt sér stað, þ.e. fjölubiquitin verður til. E3 lígasar geta bæði hvatað tengingu fyrsta ubiquitinsins við hvarfefni og tengingu fleiri ubiquitina við fjölubiquitin keðjuna. Í sumum tilfellum er þörf á viðbótarlífhvatavirkni frá E4 til að mynda þessar keðjur.

Nóbelsverðlaunahafarnir notuðu einkum netblóðfrumur úr kaninum í starfi sínu og framkvæmdu súluþættun (Hershko et al. 1979). Við þættun á sellulósa súlu greindist prótein sem veldur próteinniðurbroti í fyrsta þætti og síðar kom í ljós að um ubiquitin var að ræða. Þetta prótein myndaði samgild tengi við önnur prótein (Ciechanover et al. 1980) og fjölliður (Hershko et al. 1980). Við frekari þættun með notkun salts var hægt að aðskilja það sem eftir var í tvo þætti, sem síðar kom í ljós að innihéldu annars vegar E1, E2 og E3 lílvatakerfin og hins vegar próteasóm. Nákvæmri byggingu og starfsemi próteasóma var ekki lýst fyrir en nokkrum árum síðar (Hough et al. 1986). Þó gáfu tilraunir Nóbelsverðlaunahafanna til kynna að próteinkljúfurinn væri fjölpróteinaflóki. Mikilvægar upplýsingar fengust með frekari rannsóknum á þessum þremur þáttum. Þörf var á þeim öllum til að melta hvarfefni og unnið var að frekari hreinsun og skilgreiningu á starfsemi. Notkun á sepharósa með samgildu tengi við ubiquitin kom að góðum notum og hægt var að setja upp aðstæður þar sem ATP og pyrofosfat komu við sögu (einkenni á E1), haft var áhrif á –SH hóp (E1, E2 og sum E3) og veik efnatengi (sum E3) (Ciechanover et al. 1982). Með þessari aðferðafræði var E1-E2-E3 ensímkerfunum að fullu lýst árið 1983 (Hershko et al. 1983) og stenst þessi hugmyndafræði enn þann dag í

dag þótt ítarlegri upplýsingar hafi komið fram á síðustu árum. Auk þess veittu tilraunirnar þær upplýsingar að um fjölbreytilegt kerfi væri að ræða og að ubiquitin miðlað próteinniðurbrot kæmi víða við (Pickart og Rose 1985). Einkum voru það lífefnafræðilegar aðferðir af þessum toga sem notaðar voru. Fyrstu rannsóknir á próteinniðurbroti í frumum voru einnig framkvæmdar og m.a. nýttu Nóbelsverðlaunahafarnir sér það að amínósýran Trp er ekki í ubiquitini. Þeir gátu því geislamerkt hvarfefnin án þess að geislamerkja ubiquitin, en það var hægt að greina með sértæku mótefni (Hershko et al. 1982). Mikilvæg vinna fór einnig fram með erfðafræðilegum aðferðum, t.d. kom frumulína úr músnum með stökkbreytt E1 að miklu gagni (Ciechanover et al. 1984, Finlay et al. 1984). Sú vinna gaf auk þess upplýsingar um hlutverk í frumum en E1 stökkbreytingin hafði m.a. áhrif á frumuhringinn. Ágætis staðfesting fékkst á hlutverki ubiquitins-próteasóma í frumuhring þegar cyclin greindist sem eitt af hvarfefnunum nokkru síðar (Glotzer et al. 1991).

Velta má fyrir sér ástæðum fyrir þrepaflutningi ubiquitins milli E1, E2 og E3. Flutningurinn virðist vera lykill að sértækni og stjórnun, einkum starfsemi E3 lígasar. Aðeins einn E1 virkjunarlífhvati er þekktur, en á mismunandi formum þó. Nokkrir tugir E2 tengilífhvata eru þekktir og sennilega skipta E3 lígasarnir hundruðum. Nokkur hluti af erfðamengi mannsins eru gen sem taka þátt í ubiquitin-próteasóm ferlinu. E3 lígasar eru yfirleitt fjöleininga prótein og mikið magn af nýjum upplýsingum berst stöðugt um það hvað ræður sértækninni. Ýmis skilaboð eru notuð um að hefja skuli fjölubiquitineringu á hvarfefnum. Má þar nefna fosfæringu og vatnsálagningu. Undireiningar í E3 eru oft grundvallarsameindir sem þekkja hvarfefni eins og t.d. F-box próteinin í SCF flókanum sem þekkja fosfærð hvarfefni. Annað dæmi er að sækni í mismunandi hvarfefni breytist þegar skipt er um eina undireiningu í APC flókanum. Upplýsingar um stöðugleika próteina sitja í þeim sjálfum og ubiquitin markaðir í hvarfefnum eru þekktar.

Á níunda áratugnum söfnuðust talsverðar upplýsingar um hlutverk ubiquitins í frumum og enn þann dag í dag er að bætast við þær. Listinn yfir ferli í frumunni með þátttöku ubiquitins-próteasóma er orðin langur. Má þar nefna frumuhring og sýningu á ónæmisvaka. Vitað er að afbrigðilegt próteinniðurbrot ubiquitin-próteasóm ferilsins tekur þátt í ýmsum sjúkdómsmyndum, þ.á.m. æxlisvexti og smitsjúkdómum.

Í vissum tilfellum er afbrigðilegt starf þekkt, t.d. hjá undireiningum í ubiquitin lígasa og veldur þetta því að ákveðin hvarfefni eru brotin niður of hratt eða of hægt. Um sértækt ástand getur verið að ræða, þ.e. orsakasambandið milli ubiquitin-próteasóm hvarfefnis og svipgerðar sjúkdóms er vel skilgreinanlegt, en einnig geta orðið almenn eitrunaráhrif vegna uppsöfnunar próteina og próteínflóka sem eyðileggja frumstarfið. Síðasta áratuginn hefur notkun á próteasóm hindrum aukist verulega, bæði á rannsóknastofum til að skilgreina ubiquitin-próteasóm starfið betur og sem lyf við sjúkdómum eins og krabbameini.

Áður fyrr höfðu margir þá sýn að starf ubiquitin-próteasóm ferilsins væri fyrst og fremst að eyða "rusl-próteinum". Með aukinni þekkingu verður samt æ ljósara að hér er um stórfenglegt og fínstillt stjórnerfi að ræða sem stuðlar að því að rétt magn af próteinum verður í hverri frumu á réttum stað á réttum tíma. Hér hefur einkum verið fjallað um fjölubiquitineringu í stöðu K48 sem merkir prótein til niðurbrots í próteasómum, en vitað er að staða K11, K29 og K69 geta skipt máli. Ubiquitinerung í stöðu K63 er þokkalega vel skilgreind en er ekki talin merkja prótein til niðurbrots, heldur hefur áhrif á DNA viðgerðir, próteinmyndun, virkjun á kínasa, innfrumun á viðtökum og innanfrumflutning. Einnig hefur greinst talsverður fjöldi af próteinum sem eru skyld ubiquitini og af þeim eru SUMO próteinin best þekkt. Þau taka þátt í ýmsu kjarnastarfi, s.s. kjarnaflutningi, aðskilnaði litninga, stjórnun á umritunar o.fl.

Heimildir

- [1] Ciechanover A., Heller H., Elias S., Haas A.L., Hershko A., ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1365-1368, 1980.
- [2] Ciechanover A., Elias S., Heller H., Hershko A., Covalent affinity purification of ubiquitin activating enzyme, *J. Biol. Chem.* **257**, 2537-2542, 1982.
- [3] Ciechanover A., Finlay D., and Varshavsky A., Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85, *Cell* **37**, 57-66, 1984.
- [4] Finlay D., Ciechanover A., and Varshavsky A., Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85, *Cell* **37**, 43-55, 1984.
- [5] Glotzer M., Murray A.W., and Kirschner M.W., Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway, *Nature* **349**, 132-138, 1991.
- [6] Goldstein, G., Scheid M.S., Hammerling V., Boyse E.A., Schlesinger D.H., and Niall H.C., Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 11-15, 1975.
- [7] Hershko A. and Tomkins G.M., Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture, *J. Biol. Chem.* **246**, 710-714, 1971.
- [8] Hershko A., Ciechanover A., and Rose I.A., Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes – component that interacts with ATP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3107-3110, 1979.
- [9] Hershko A., Ciechanover A., Heller H., Haas A.L., and Rose I.A., Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1783-1786, 1980.
- [10] Hershko A., Eytan E., Ciechanover A., and Haas A.L., Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells – Relationship to the breakdown of abnormal proteins. *J. Biol. Chem.* **257**, 3964-3970, 1982.
- [11] Hershko A., Heller H., Elias S., and Ciechanover A., Components of ubiquitin protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* **258**, 8206-8214, 1983.
- [12] Hough R., Pratt G., and Rechsteiner M., Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates, *J. Biol. Chem.* **261**, 2400-2408, 1986.
- [13] Pickart C.M. and Rose I.A., Functional heterogeneity of ubiquitin carrier proteins. *J. Biol. Chem.* **260**, 1573-1581, 1985.
- [14] Simpson, M.V., The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices, *J. Biol. Chem.* **201**, 143-154, 1953.

Sigurður Ingvarsson
Tilraunastöð Háskóla Íslands í
meinafræði að Keldum
v. Vesturlandsveg
112 Reykjavík, Ísland
siguring@hi.is