

STRESZCZENIE

Większość białek wewnątrzkomórkowych *Eukaryota* degradowana jest z udziałem szlaku ubikwityna-proteasom 26S. Multikatalityczne kompleksy proteolityczne, proteasomy 26S, poprzez degradację wyznakowanych łańcuchem poliubikwitynowym białek, są zaangażowane w regulację wielu kluczowych procesów, takich jak: cykl komórkowy, proliferacja i różnicowanie komórek, apoptoza, transkrypcja, transdukcja sygnałów, morfogeneza, odpowiedź immunologiczna, odpowiedź na stres i inne czynniki zewnątrzkomórkowe, modulacja receptorów powierzchniowych, prezentacja antygeny, proteoliza enzymów i białek regulatorowych, kontrola jakości białek w siateczce endoplazmatycznej. Nieprawidłowe działanie szlaku ubikwityna-proteasom jest przyczyną wielu chorób, w tym nowotworowych i neurodegeneracyjnych. Stwierdzono udział degradacji proteasomalnej w rozwoju odpowiedzi immunologicznej i zapalnej, jak również w schorzeniach wywoływanych przez patogeny. W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania kliniczne, w których system ubikwityna-proteasom stanowi cel działań terapeutycznych, zarówno w odniesieniu do aktywności proteasomów, jak i procesu ubikwitylacji czy deubikwitylacji. Zidentyfikowano specyficzne inhibitory proteasomów, jak również inhibitory poszczególnych enzymów kaskady ubikwitylacji białek oraz enzymów deubikwitylujących. Do praktyki klinicznej została już dopuszczona druga generacja inhibitorów proteasomów.

WPROWADZENIE

W komórkach organizmów eukariotycznych funkcjonują dwa degradacyjne szlaki proteolizy wewnątrzkomórkowej [1,2]:

- szlak lizosomalny – mniej selektywny, obejmujący degradację białek endogennych w wyniku endo- lub pinocytozy bądź pod wpływem autofagocytozy czy selektywnego transportu;
- szlak pozalizosomalny – bardziej selektywny, obejmujący procesy proteolizy zachodzące w cytosolu, przede wszystkim z udziałem proteasomów 26S, a także degradację białek przez kalpajny cytosolowe oraz proteolizę w obrębie organelli subkomórkowych.

Lizosomy długo były uważane za jedyne miejsce degradacji białek w komórkach [3]. W latach 70. XX wieku wykazano jednak, że również komórki pozbawione lizosomów, takie jak retikulocyty, są zdolne do skutecznego rozkładu nieprawidłowych białek, a procesy te wymagają energii w postaci ATP, co było wówczas trudne do zrozumienia [4].

Kolejne badania przyczyniły się do wyjaśnienia degradacji białek zależnej od energii [5]. Wykazano wówczas udział ubikwityny jako kofaktora w proteolizie zależnej od ATP. Podczas badań zależnego od ATP systemu proteolitycznego retikulocytów, okazało się, że do jego funkcjonowania niezbędny jest termostabilny polipeptyd o masie cząsteczkowej 8,5 kDa, który w reakcji wymagającej ATP ulegał kowalencyjnemu przyłączeniu do różnych substratów białkowych [6]. Wkrótce udowodniono, że polipeptyd ten, określony mianem APF-1 (ang. *ATP-dependent proteolysis factor 1*), czyli ubikwityna, bierze udział w pozalizosomalnej proteolizie w komórkach organizmów eukariotycznych [7].

W latach 80. XX wieku, podczas badań nad wewnątrzkomórkowym systemem proteolitycznym, wykryto w komórkach wielu organizmów eukariotycznych niezwykle dużą proteazę, tzw. wielokatalityczny kompleks proteinazowy (MPC, ang. *multicatalytic proteinase complex*) [8]. Opisywany był on również przez innych autorów jako „alkaliczna proteaza stymulowana przez ATP” lub „makropaina”. Następnie wykazano, że degradacja białek na szlaku pozalizosomalnym odbywa się z udziałem tego wielokatalitycznego kompleksu proteolitycznego, który obecnie określa się terminem „proteasom”. Historia badań doty-

Magdalena Staszczak*

Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

*Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel.: (81) 537 50 40, e-mail: magdalena.staszczak@umcs.lublin.pl

Artykuł otrzymano 1 grudnia 2017 r.
Artykuł zaakceptowano 11 grudnia 2017 r.

Słowa kluczowe: proteasom, ubikwityna, inhibitory proteasomów, inhibitory ubikwitylacji/deubikwitylacji, nowotwory, patogeny

Wykaz skrótów: CHTL (ang. *chymotrypsin-like*) – aktywność chymotrypsynopodobna; CL (ang. *caspase-like*) – aktywność kaspazopodobna; DUBs (ang. *deubiquitinating enzymes*) – enzymy deubikwitynujące; E1 (ang. *ubiquitin-activating enzyme*) – enzym aktywujący ubikwitynę; E2 (ang. *ubiquitin-conjugating enzyme*) – enzym koniugujący ubikwitynę; E3 (ang. *ubiquitin ligase*) – ligaza ubikwitynowa; RP (ang. *regulatory particle*) – kompleks regulatorowy; TL (ang. *trypsin-like*) – aktywność trypsynopodobna; UCHs (ang. *ubiquitin C-terminal hydrolases*) – C-końcowe hydrolazy ubikwityny; USPs (ang. *ubiquitin-specific proteases*) – specyficzne proteazy ubikwityny

czących procesów wewnątrzkomórkowej degradacji białek stanowi temat wielu artykułów przeglądowych [1,9,10].

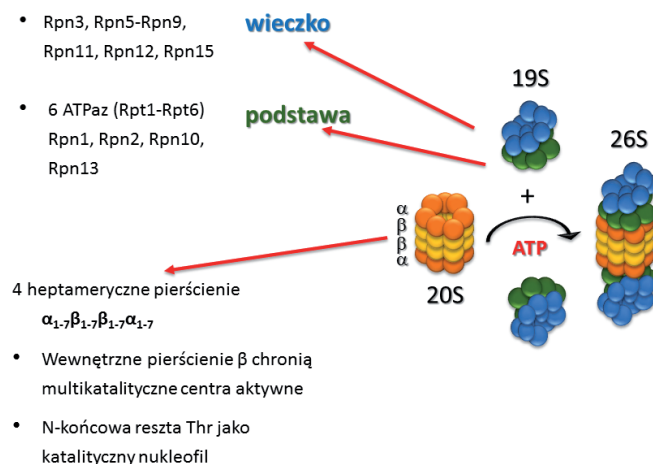
Proteasom nie rozkłada przypadkowych białek, a jedynie te wytypowane przez komórkę. Kowalencyjne przyłączenie ubikwityny do białka substratowego, z utworzeniem łańcucha poliubikwitynowego (w wieloetapowym procesie tzw. ubikwitylacji), jest zasadniczym sygnałem do proteolizy z udziałem proteasomów 26S [11,12]. Badania mechanizmu ubikwitylacji białek oraz struktury, właściwości i funkcjonowania proteasomu są intensywnie rozwijane ze względu na biologiczne znaczenie precyzyjnej kontroli procesu degradacji białek [13-16]. System ubikwityna-proteasom jest odpowiedzialny za rozkład białek ważnych dla prawidłowego funkcjonowania komórek: enzymów regulujących szlaki biosyntetyczne, białek regulujących przebieg cyklu komórkowego, wielu czynników transkrypcyjnych, białek kodowanych przez onkogeny i geny supresorowe czy też białek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej, jak również białek strukturalnych. W 2004 roku trzej naukowcy Aaron Ciechanover, Avram Hershko oraz Irvin Rose otrzymali Nagrodę Nobla, w dziedzinie chemii, za odkrycie zależnej od ubikwityny proteasomalnej degradacji białek wewnątrzkomórkowych.

Proteasomy odgrywają kluczową rolę w regulacji procesów zachodzących w komórkach, są one odpowiedzialne za degradację około 80-90% wszystkich białek wewnątrzkomórkowych [17]. Z tego względu, nieprawidłowe działanie szlaku ubikwityna-proteasom jest przyczyną wielu chorób. W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania kliniczne, w których ten system proteolityczny stanowi cel działań terapeutycznych, zarówno w odniesieniu do aktywności proteasomów, jak i systemu ubikwitylacji [14,16,18,19-26].

KOMPLEKS PROTEASOMU 26S

Proteasom 26S (EC 3.4.25.1) jest ATP-zależnym, wielokatalitycznym kompleksem, o masie cząsteczkowej ok. 2,5 MDa, odpowiedzialnym za degradację białek wewnątrzkomórkowych, o krótkim i długim okresie połowicznego życia, modyfikowanych za pomocą łańcucha poliubikwitynowego [12,17,27]. Jego obecność wykryto w cytoplazmie oraz w jądrze komórkowym wszystkich organizmów eukariotycznych [28-32]. Stanowi on około 1% wszystkich białek znajdujących się w komórce. Przeciętna komórka zawiera około 30 tys. proteasomów.

Kompleks proteasomu 26S (Ryc. 1) składa się z proteasomu 20S [33,34], tworzącego katalityczny rdzeń (CP, ang. *core particle*), który jest zasocjowany z jednej lub obu stron z asymetrycznym kompleksem regulatorowym 19S (RP, ang. *regulatory particle*), zwanym również PA700 [35]. Powstawanie proteasomu 26S z kompleksów 20S (CP) oraz 19S (RP) jest procesem zależnym od ATP [36]. Podczas gdy występowanie kompleksów proteasomowych 26S stwierdzono jedynie u *Eukaryota*, to niezależne od ATP proteasomy 20S wykryto, poza komórkami organizmów eukariotycznych, również u *Archaeobacteria* i niektórych *Eubacteria* [37].



Rycina 1. Struktura proteasomu 26S.

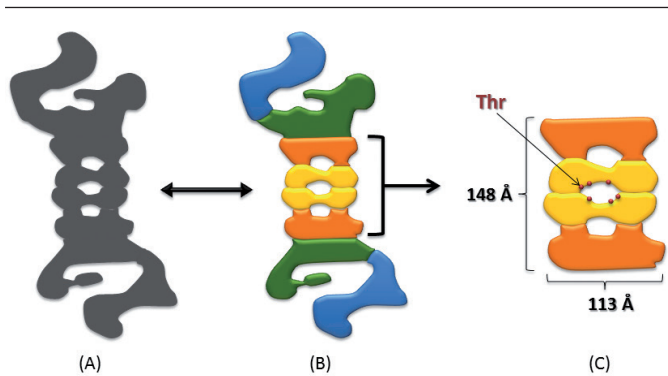
RDZEŃ KATALITYCZNY - PROTEASOM 20S

Proteasomy 20S *Eukaryota* zawierają 14 różnych, ale spokrewnionych podjednostek, które na podstawie podobieństwa sekwencji klasyfikowane są jako podjednostki typu α lub typu β [37]. Struktura proteasomu 20S ma charakter konserwatywny, pomimo wzrastającej w toku ewolucji złożoności w składzie podjednostek. Większość proteasomów 20S u *Prokaryota* zbudowana jest z dwóch rodzajów podjednostek: α i β [33,34], chociaż u *Rhodococcus* stwierdzono dwa typy podjednostek α ($\alpha 1$, $\alpha 2$) i dwa typy podjednostek β ($\beta 1$, $\beta 2$) [37]. Budowa eukariotycznego kompleksu rdzeniowego (CP) została opisana na podstawie analizy krystalograficznej oczyszczonych proteasomów drożdży [38].

Proteasom 20S, o masie cząsteczkowej 700 kDa, tworzy cylindryczny kompleks (14,8 nm długości i 11,3 nm szerokości) składający się z 28 podjednostek, które ułożone są w cztery współosiowe 7-członowe pierścienie (Ryc. 1 i Ryc. 2). W strukturze proteasomu 20S można wyróżnić dwa zewnętrzne pierścienie zbudowane z podjednostek typu α oraz dwa wewnętrzne pierścienie utworzone przez podjednostki typu β , które łącznie dają kompleks o stechiometrii $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ [38].

Aktywność katalityczna proteasomu 20S zlokalizowana jest jedynie w sześciu podjednostkach typu β - w każdym pierścieniu są to podjednostki $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 5$. Uformowany przez dwa wewnętrzne pierścienie podjednostek β kanał tworzy trzy wydrążenia (połączone przewężeniami), z których środkowe chroni centra aktywne. Wstęp do komory centralnej ograniczony jest przez wąską „bramkę”, utworzoną przez N-końcowe reszty aminokwasowe podjednostek α . Kanał ten, o średnicy 13Å pozwala na wejście tylko rozfałdowanym białkom. Powyższy mechanizm zapewnia całkowitą degradację substratów i zapobiega przypadkowej proteolizie [31,39].

Ze względu na budowę centrum aktywnego, proteasom 20S zaliczany jest do rodziny białek określanych jako Nth hydrolazy (ang. *N-terminal nucleophile hydrolases*), których wspólną cechą jest centrum aktywne tworzone przez pojedynczą resztę aminokwasową. Ta sama N-końcowa reszta



Rycina 2. Schemat proteasomu 26S (A i B) i proteasomu 20S (C), opracowany na podstawie obrazu z mikroskopu elektronowego [144].

dostarcza ugrupowanie nukleofilowe oraz pełni funkcję akceptora protonów [29]. W proteasomie 20S tą resztą aminokwasową jest Thr1. Na podstawie udziału treoniny w katalizie określona została odrębna grupa enzymów proteolitycznych, proteiny treoninowe (wcześniej znane były cztery grupy: proteiny serynowe, cysteinowe, aspartylowe i metaloproteiny) [40]. Rolę treoniny jako katalitycznego nukleofilu potwierdziły między innymi badania wskazujące, że delekcja N-terminalnej Thr1 lub mutacje tej reszty do alaniny, u drożdży oraz *Archaea*, prowadzą do zniesienia aktywności proteolitycznej [41].

Większość podjednostek typu β , w przeciwieństwie do podjednostek typu α , jest syntetyzowana w formie nieaktywnych prekursorów, ulegających na drodze ograniczonej proteolizy procesowi „dojrzewania” proteasomu, czemu towarzyszy uwolnienie reszt centrum aktywnego [42,43]. Propeptydy (o długości 4–70 reszt aminokwasowych) usuwane są dopiero po zamknięciu podjednostek typu β w obrębie kompleksu proteasomowego.

U *Archaea* wszystkie podjednostki β charakteryzują się taką samą budową, stąd w tej grupie organizmów występuje czternaście identycznych aktywności proteolitycznych [44]. Natomiast u *Eukaryota*, tylko trzy podjednostki β , spośród siedmiu podjednostek tworzących pierścień wewnętrzny, wykazują aktywności katalityczne.

Stwierdzone *in vitro* aktywności katalityczne eukariotycznych proteasomów 20S różnią się między sobą specyficznością w hydrolizie wiązań peptydowych [31,45,46] i zostały one określone jako aktywności:

- chymotrypsynopodobna (CHTL, ang. *chymotrypsin-like*) – zlokalizowana w podjednostce β_5 i odpowiedzialna za hydrolizę wiązania peptydowego utworzonego przez grupę karboksylową aminokwasów hydrofobowych (Tyr-X, Phe-X, Leu-X);
- trypsynopodobna (TL, ang. *trypsin-like*) – występująca w podjednostce β_2 i hydrolizująca wiązania peptydowe utworzone przez grupę karboksylową aminokwasów zasadowych (Arg-X, Lys-X);

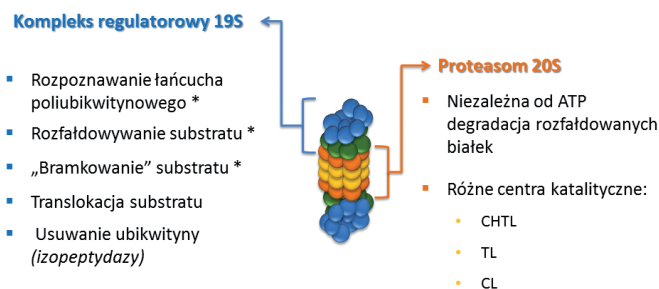
- kaspazopodobna (CL, ang. *caspase-like*), zlokalizowana w podjednostce β_1 i przeprowadzająca hydrolizę wiązania peptydowego utworzonego przez grupę karboksylową aminokwasów kwasowych, przy czym rozpad wiązania peptydowego zachodzi częściej po resztach kwasu asparaginowego niż glutaminowego.

W wielu komórkach narządów układu immunologicznego stwierdzono obecność tzw. immunoproteasomów, czyli proteasomów 20S połączonych z kompleksem regulatorowym 19S oraz kompleksem PA28 (ang. *proteasome activator 28*), indukowanym przez interferon γ [47,48]. Połączenie PA28 z proteasomem odgrywa istotną rolę w prezentacji antygeny, gdyż reguluje długość peptydów dla głównego układu zgodności tkankowej MHC I (ang. *major histocompatibility complex*) [49-51]. W przypadku immunoproteasomów konstytutywne podjednostki katalityczne: β_1 , β_2 i β_5 zastępowane są przez podjednostki indukcyjne: $i\beta_1$ (LMP2), $i\beta_2$ (MECL-1) oraz $i\beta_5$ (LMP7) [52]. W komórkach grasicy powstają immunoproteasomy szczególnego rodzaju, tzw. tymoproteasomy, które w rdzeniu katalitycznym, oprócz podjednostek $i\beta_1$ oraz $i\beta_2$, zawierają swoiste podjednostki $t\beta_5$ zamiast $i\beta_5$. Aktywność chymotrypsynopodobna $t\beta_5$ jest niższa niż konstytutywnych podjednostek β_5 ($c\beta_5$) oraz $i\beta_5$ [53].

KOMPLEKS REGULATORYWY 19S

Kompleksy regulatorowe 19S (RP) są niezbędne do rozpoznawania łańcucha poliubikwitynowego [33,54], rozfałdowywania białka i jego translokacji do wnętrza rdzenia katalitycznego CP, gdzie białko substratowe ulega degradacji [55-57] (Ryc. 3). Wiązanie RP do proteasomu 20S wywołuje zmiany konformacyjne w strukturze rdzenia katalitycznego, co powoduje otwarcie kanału wejściowego uformowanego przez N-końce podjednostek α oraz aktywację proteaz [50]. Przez otwarty kanał, o średnicy około 13 Å, rozfałdowane substraty przechodzą do miejsc katalitycznych we wnętrzu proteasomu 20S [58,59].

Kompleksy regulatorowe 19S zawierają co najmniej 19 różnych podjednostek białkowych o masach cząsteczkowych 28-110 kDa [35,53,60,61]. Wśród nich zidentyfikowano podjednostki wykazujące aktywności ATPazowe, izopeptydazowe oraz wiążące ubikwitynę. Podjednostki o aktywnościach ATPaz biorą udział w rozfałdowywaniu substratów białkowych przed ich translokacją do rdzenia



Rycina 3. Funkcje kompleksu regulatorowego 19S i proteasomu 20S (symbol * oznacza zależność od ATP).

proteolitycznego [55,62]. Ze względu na pełnioną funkcję określano je jako „*unfoldases*” lub „*reverse chaperones*”. Pozostałe podjednostki nie wykazują aktywności ATPazowych i są zaangażowane w rozpoznawanie substratów białkowych niosących sygnały do degradacji, warunkując selektywność proteolizy [33]. Kompleks regulatorowy posiada również aktywności izopeptydazowe, umożliwiające odłączanie łańcuchów poliubikwitynowych oraz ich cięcie na monomery, które mogą być ponownie wykorzystane [63]. W strukturze kompleksu regulatorowego 19S wyróżnia się dwa subkompleksy (Ryc. 1): podstawę (ang. *Base*) i wieczko (ang. *Lid*) [53,61,64,65].

Podstawa kompleksu 19S, przylegająca do zewnętrznego pierścienia α , zawiera sześć blisko spokrewnionych podjednostek Rpt (ang. *regulatory particle triple-A protein*), o aktywnościach ATPaz, zaliczanych do dużej rodziny białek AAA (ang. *ATPases associated with a variety of cellular activities*): Rpt1/S7, Rpt2/S4, Rpt3/S6a, Rpt4/S10, Rpt5/S6b, Rpt6/S8. Podjednostki występujące u drożdży oznaczane są jako Rpt, natomiast u wyższych *Eukaryota* jako S, w oparciu o ruchliwość podczas SDS-PAGE [35]. Podjednostka Rpt5 prawdopodobnie uczestniczy w rozpoznawaniu poliubikwitylowanego substratu [66]. Podjednostka Rpt2 wiąże się z pierścieniem utworzonym przez podjednostki typu α i uczestniczy w otwieraniu kanału oraz współuczestniczy w rozkładowywaniu substratu i jego translokacji do wnętrza proteasomu [58,59]. Oprócz ATPaz, w skład podstawy kompleksu regulatorowego wchodzi jeszcze cztery podjednostki Rpn (ang. *regulatory particle non-ATPase*), niebędące ATPazami: Rpn1/S2, Rpn2/S1, Rpn10/S5a oraz Rpn13 (Adrm1) [35,53,61]. Podjednostki Rpn1, Rpn10 i Rpn13 pełnią funkcję receptorów ubikwityny, rozpoznających substrat przeznaczony do degradacji w proteasomie. Ponadto podjednostka Rpn10 łączy podstawę z wieczkiem.

Wieczko kompleksu regulatorowego 19S składa się z dziewięciu różnych podjednostek nie ATPazowych: Rpn3/S3, Rpn5/S5, Rpn6/S9, Rpn7/S10a, Rpn8/S12, Rpn9/S11, Rpn11/S13 i Rpn12/S14 [31,53,67]. U drożdży zidentyfikowano dodatkową podjednostkę Rpn15 (Dss1/Sem1) [53,65]. Główną rolą wieczka jest deubikwitylacja substratów. Stwierdzono, że Rpn11 działa jako zależna od Zn^{2+} metaloizopeptydaza zaangażowana w proces deubikwitylacji białek, ulegających degradacji w proteasomach [68,69]. Innymi enzymami deubikwitylującymi te białka są również UCH37 (UCH-L5) (ang. *ubiquitin C-terminal hydrolase*) i USP6 (u drożdży)/USP14 (u ssaków) (ang. *ubiquitin specific protease*) [70]. UCH37 jest integralnym składnikiem kompleksu regulatorowego 19S u ssaków, natomiast brak tego enzymu u drożdży.

Podjednostki wieczka wykazują podobieństwo sekwencji do kompleksu sygnałowego COP9 (ang. *COP9 signalosome*, CSN), kluczowego regulatora licznych szlaków sygnałowych oraz kompleksu eIF3, inicjującego translację u *Eukaryota* [60].

U *Archeabacterium* stwierdzono występowanie kompleksu nukleotyduzy aktywującej proteasom, PAN (ang. *proteasome-activating nucleotidase*), będącego homologiem eukariotycznego kompleksu ATPaz wieczka [71]. Prawdo-

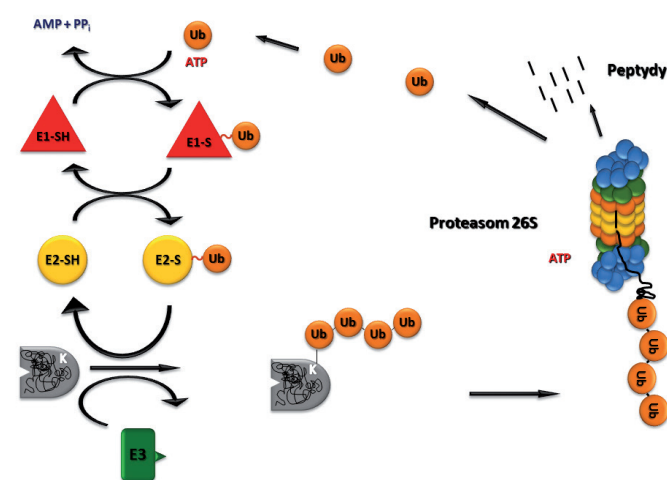
podobnie jest on prekursorem kompleksu 19S u *Eukaryota*, ponieważ stymuluje degradację białka przez proteasom 20S w komórkach *Thermoplasma acidophilum*.

DEGRADACJA BIAŁEK NA SZLAKU UBIKWITYNA-PROTEASOM

Kowalencyjne przyłączenie ubikwityny (w postaci łańcucha poliubikwitynowego) do białka substratowego jest zasadniczym [11,54,72], lecz nie wyłącznym sygnałem do proteolizy [73]. Podczas degradacji białek na szlaku ubikwityna-proteasom (Ryc. 4) zachodzą dwa zasadnicze procesy [11,12,74]: (1) ubikwitylacja – kowalencyjne przyłączenie łańcucha poliubikwitynowego do białka przeznaczonego do degradacji (w procesie modyfikacji białka ubikwityną C-końcowa reszta glicyny cząsteczki ubikwityny, Gly76, łączy się wiązaniem izopeptydowym z grupą ϵ -aminową reszty lizyny białkowego substratu) oraz (2) rozpoznanie i degradacja ubikwitylowanych białek przez kompleks proteasomowy 26S, z jednoczesnym uwolnieniem ubikwityny przez enzymy deubikwitylujące.

Degradację białek wewnątrzkomórkowych na szlaku ubikwityna-proteasom wyróżniają spośród innych procesów proteolizy charakterystyczne cechy [11,12], którymi są:

- zależność od ATP,
- rozpoznawanie substratu poprzez wyznakowanie łańcuchem poliubikwitynowym,
- bardzo duże rozmiary (2,5 MDa) oraz złożona budowa kompleksu proteolitycznego zaangażowanego w degradację białek - proteasomu 26S,
- udział wielu enzymów pośredniczących w przekazywaniu substratu białkowego do centrum aktywnego proteasomu 26S,
- centra aktywne proteasomu utworzone przez N-końcową resztę Thr,



Rycina 4. Schemat szlaku ubikwityna-proteasom 26S.

- miejsca aktywne proteasomu 26S, w przeciwieństwie do klasycznych proteaz, ukryte są wewnątrz kompleksu,
- pełna degradacja substratu do krótkich oligopeptydów (3-22 reszt aminokwasowych).

UBIKWITYNA

Ubikwityna jest małym, obojętnym, globularnym białkiem o masie cząsteczkowej około 8,6 kDa, zbudowanym z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, którego sekwencja aminokwasowa jest w bardzo dużym stopniu zachowana w ewolucji [75]. Ubikwityna określana jest mianem „wszędobylskiego peptydu” UBIP (ang. *ubiquitin immunopoietic polypeptide*), ponieważ występuje ona we wszystkich typach komórek eukariotycznych, w stanie wolnym lub tworząc wiązania kowalencyjne z innymi białkami [76].

Struktura pierwszorzędowa ubikwityny to 76 reszt aminokwasowych, wśród których bardzo licznie występuje reszta lizyny (K6, K11, K27, K29, K33, K48 i K63). Charakterystycznym elementem struktury przestrzennej jest C-końcowy fragment łańcucha polipeptydowego utworzony przez cztery reszty aminokwasowe (-Leu-Arg-Gly-Gly), który wystaje z powierzchni cząsteczki. Za jego pośrednictwem, poprzez Gly76, ubikwityna zostaje połączona z enzymem E1, a także z ε-aminową grupą lizyny białka przeznaczanego do degradacji i Lys48 innych cząsteczek ubikwityny, z którymi tworzy liniowe lub rozgałęzione łańcuchy za pomocą wiązań izopeptydowych [72].

Duża zawartość ubikwityny w każdej komórce, zachowana w ewolucji struktura pierwszorzędowa oraz powszechne występowanie u organizmów eukariotycznych świadczą o kluczowej roli tego białka w prawidłowym przebiegu podstawowych procesów komórkowych. Najważniejszą funkcją ubikwityny jest udział w zależnej od ATP pozalizosomalnej degradacji białek, polegający na kierowaniu białka do degradacji w kompleksie proteasomowym 26S [54,72].

Mono- lub multiubikwitylacja białek (bez tworzenia łańcucha), a także tworzenie łańcuchów na reszcie Lys innej niż reszcie Lys48, może stanowić sygnał do endocytozy białek, transportu białek do lizosomów lub wakuoli, jak również może regulować przemieszczanie się białek pomiędzy jądrem a cytoplazmą oraz działanie wielu białek uczestniczących w różnych procesach metabolicznych [72,75,77]. Zidentyfikowano również wiele białek pokrewnych ubikwitynie (UBLs, ang. *ubiquitin-like proteins*), np. SUMO (ang. *small ubiquitin-like modifier*) czy NEDD8 (ang. *neuronal precursor cell-expressed, developmentally down-regulated*), które poprzez C-końcową resztę glicyny wiążą się z innymi białkami i biorą także udział w wielu procesach regulacyjnych, a ich dołączanie do białek jest równie złożone jak dołączanie ubikwityny [78-80].

PROCES UBIKWITYLACJI

Przyłączenie ubikwityny do białka substratowego jest kaskadowym procesem (Ryc. 4), zachodzącym przy udziale ATP [72,81,82], katalizowanym kolejno przez następujące

enzymy: E1 – enzym aktywujący ubikwitynę (ang. *ubiquitin-activating enzyme*), E2 – enzym koniugujący ubikwitynę (ang. *ubiquitin-conjugating enzyme*), E3 – ligazę ubikwitynową (ang. *ubiquitin ligase*).

Enzym E1 jest białkiem o zachowanej w ewolucji sekwencji aminokwasowej, natomiast E2 i E3 są bardziej zróżnicowane [11], w komórkach ssaków występuje około 30-40 różnych enzymów E2 oraz 700-1000 różnych enzymów E3 [83,84]. Stwierdzono, że może również występować dodatkowy enzym E4, uczestniczący w wydłużaniu łańcucha poliubikwitynowego [85,86].

Proces ubikwitylacji białka substratowego obejmuje następujące etapy [72,85]:

- utworzenie w reakcji zależnej od ATP wysokoenergetycznego wiązania tioestrowego pomiędzy resztą Gly na karboksylowym końcu ubikwityny (Gly76) a grupą tiolową (-SH) Cys w centrum aktywnym enzymu E1 [E1-S~Ub],
- przeniesienie aktywowanej ubikwityny na grupę -SH reszty Cys w enzymie koniugującym E2 [E2-S~Ub],
- przeniesienie ubikwityny z enzymu E2 na grupę ε-aminową wewnętrznej reszty Lys substratu białkowego, w reakcji katalizowanej przez ligazę ubikwitynową E3.

Ligazy ubikwitynowe są wielopodjednostkowymi kompleksami białkowymi, w których określone podjednostki biorą udział w rozpoznaniu substratu i dołączaniu do niego łańcucha poliubikwitynowego (dzięki interakcji z enzymem E2) lub pojedynczymi polipeptydami, w których specyficzne fragmenty cząsteczki pełnią funkcję rozpoznania substratu i dołączania do niego łańcucha poliubikwitynowego.

Wyróżnia się dwa podstawowe typy ligaz ubikwitynowych [87-89]: (1) RING E3 – ligazy z domeną RING finger (ang. *really interesting new gene*), katalizujące bezpośrednio przeniesienie na substrat zaktywowanej i powiązanej z enzymem E2 ubikwityny oraz (2) HECT E3 – ligazy z domeną HECT (ang. *homologous to E6-AP C-terminus*), w których przed ostatecznym dołączeniem ubikwityny do właściwego substratu dochodzi do przeniesienia zaktywowanej ubikwityny z enzymu E2 na ligazę ubikwitynową E3 (z utworzeniem kowalencyjnego intermediatu).

Substrat białkowy przeznaczony do degradacji zanim zostanie rozpoznany przez proteasom musi przejść co najmniej cztery cykle enzymatyczne, łańcuch poliubikwitynowy stanowiący sygnał do degradacji zawiera co najmniej 4 cząsteczki ubikwityny [54]. Stwierdzono również, że w przypadku niektórych białek pierwsza cząsteczka ubikwityny może być przyłączana do N-końcowej reszty aminokwasowej, a nie do ε-aminowej wewnętrznej reszty Lys substratu białkowego [1]. Ostatnio wykazano, że degradacja z udziałem proteasomów 26S może dotyczyć także pewnych monoubikwitylowanych białek [90]. W porównaniu do białek ulegających poliubikwitylacji, charakteryzują się one mniejszą masą cząsteczkową, bardziej uporządkowaną

strukturą i zaangażowaniem w specyficznych szlakach komórkowych.

DEGRADACJA SUBSTRATU I DEUBIKWITYLACJA

Po naznaczeniu substratu łańcuchem poliubikwitynowym następuje jego rozpoznanie przez kompleks proteasomu 26S i degradacja. Istnieją jednak białka, które mogą być degradowane przez proteasomy 26S bez uprzedniej ubikwitylacji [91]. Odpowiednia budowa podjednostkowa kompleksu regulatorowego 19S warunkuje prawidłowe ustawienie substratu, tak aby mógł być on rozfałdowany przez ATPazy tworzące podstawę kompleksu regulatorowego. Hydroliza ATP, oprócz rozfałdowywania białka, wykorzystywana jest również do otwierania kanału formowanego przez zewnętrzny pierścień podjednostek α oraz do przeniesienia substratu przez otwarty kanał do rdzenia katalitycznego 20S [39,58,92,93].

Substrat białkowy, po przedostaniu się do wnętrza komory proteolitycznej proteasomu 20S, ulega hydrolizie do małych oligopeptydów, zawierających od 3 do 22 reszt aminokwasowych, dzięki obecności sześciu aktywnych miejsc katalitycznych, po trzy w każdym pierścieniu podjednostek β [13,92]. Średnia długość peptydów wynosi od 7 do 9 aminokwasów. Taką długość osiąga około 15% powstających peptydów. Peptydy wytwarzane przez proteasomy mają krótki okres półtrwania. Nie ulegają one akumulacji w komórce, lecz dalszej degradacji przy udziale innych proteaz i aminopeptydaz. Część powstających peptydów jest transportowana do siateczki endoplazmatycznej, a następnie jest prezentowana na powierzchni komórki przez MHC I [11].

Ubikwitylacja białek docelowych jest procesem odwracalnym. Łańcuch poliubikwitynowy musi zostać usunięty z degradowanego białka przed translokacją substratu do komory proteolitycznej rdzenia proteasomu [94]. Usunięcie łańcucha poliubikwitynowego, poprzez hydrolizę wiązania amidowego między białkiem i C-końcową resztą Gly cząsteczki ubikwityny, może następować również w przypadku, gdy substrat został nieprawidłowo ubikwitylowany [11]. Łańcuchy poliubikwitynowe odcięte od białek, są następnie degradowane przez enzymy deubikwitylujące (DUBs, ang. *deubiquitinating enzymes*), a ubikwityna ponownie wykorzystana na szlaku ubikwityna-proteasom [94,95]. W komórkach *Eukaryota* stwierdzono ponad 100 różnych enzymów deubikwitylujących, należących do sześciu rodzin, z których najważniejszymi są: USPs (ang. *ubiquitin-specific proteases*; specyficzne proteazy ubikwityny) i UCHs (ang. *ubiquitin C-terminal hydrolases*; C-końcowe hydrolazy ubikwityny) [83,95,96]. Proteazy z rodziny USPs uczestniczą w odcinaniu cząsteczek ubikwityny od poliubikwitynowych łańcuchów, a także katalizują hydrolizę wiązań izopeptydowych między ubikwityną a białkiem substratowym. Rodzina UCHs, obejmuje, podobnie jak USPs, proteazy cysteinowe, które odcinają m.in. krótkie peptydy od C-końca ubikwityny. Pozostałe rodziny to OTUs (ang. *ovarian tumor proteases*), MJDs/Josephins (ang. *Machado-Joseph disease domain proteases*), MINDY (ang. *motif interacting with ubiquitin-containing novel DUB family*) oraz JAMMs (JAB1/MNP/MOV34). Z wyjątkiem enzymów deubikwitylujących

z rodziny JAMMs, obejmującej zależne od jonów Zn^{2+} metaloproteazy, pozostałe DUBs należą do proteaz cysteinowych.

Enzymy deubikwitylujące pełnią ważną rolę w regulacji szlaku ubikwityna-proteasom, głównie poprzez usuwanie z białek substratowych cząsteczek ubikwityny i łańcuchów poliubikwitynowych. Ponadto DUBs odpowiadają za powstawanie funkcjonalnej ubikwityny z jej prekursorów oraz rozcinają wolne łańcuchy poliubikwitynowe, uwalniając monomery ubikwityny [83,95,96].

ROLA SZLAKU UBIKWITYNA-PROTEASOM W REGULACJI PROCESÓW KOMÓRKOWYCH: POTENCJAŁ TERAPEUTYCZNY

Obecność szlaku proteasomalnej degradacji białek wykazano dotychczas w komórkach zwierząt [11], roślin [30,97] oraz grzybów [98-100]. Dzięki zastosowaniu specyficznych inhibitorów proteasomów wykazano udział tych złożonych kompleksów proteolitycznych nie tylko w degradacji białek wewnątrzkomórkowych krótko żyjących, lecz także białek o długim okresie półtrwania oraz zaangażowanie proteasomów w wiele mechanizmów regulujących kluczowe procesy, takie jak: cykl komórkowy, proliferacja i różnicowanie komórek, apoptoza, transkrypcja, transdukcja sygnałów, morfogeneza, odpowiedź immunologiczna, odpowiedź na stres i inne czynniki zewnątrzkomórkowe, modulacja receptorów powierzchniowych, prezentacja antygenów, proteoliza enzymów i białek regulatorowych, kontrola jakości białek w siateczce endoplazmatycznej (ERAD, ang. *endoplasmic reticulum associated protein degradation*) [11,14,63,101].

Zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu szlaku ubikwityna-proteasom stanowią przyczynę wielu chorób. Stwierdzono udział proteasomów w rozwoju chorób nowotworowych (spowodowanych np. degradacją białka p53 czy cyklicznie-zależnego inhibitora kinaz p27Kip1), kardiomiopatii, jak również w rozwoju odpowiedzi zapalnej (indukowanej m.in. przez rozkład I κ B, inhibitora czynnika transkrypcyjnego NF- κ B) czy immunologicznej oraz w schorzeniach wywoływanych przez patogeny. Natomiast brak skutecznej degradacji nieprawidłowo sfałdowanych białek leży u podłoża chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona oraz choroba Huntingtona, związana z występowaniem powtórzeń poliglutaminowych w zmutowanym białku [16,18,26,85,102].

Biorąc pod uwagę stopień zaangażowania proteasomalnej degradacji białek w regulację wielu procesów kluczowych dla właściwego funkcjonowania komórki, łatwo zrozumieć poszukiwanie inhibitorów enzymów tego szlaku, jako potencjalnych leków w terapii różnych schorzeń. Znacząca większość stosowanych w badaniach laboratoryjnych inhibitorów proteolizy ubikwityno-zależnej blokuje (odwracalnie lub nieodwracalnie) funkcje rdzenia katalitycznego proteasomu 26S, nie zaś przebieg wcześniejszych etapów szlaku, zależnej od proteasomów i ubikwityny, degradacji białek [14,18,20,103].

Ingerencja w niezwykle złożony mechanizm proteolizy ubikwityno-zależnej na końcowym etapie, jaki stanowi

rozkład białek przez proteasom 26S, jest jednak wciąż mało przewidywalna, dlatego podejmowane są próby uzyskania podobnego efektu poprzez blokowanie procesów prowadzących do ubikwitylacji białka substratowego, rozpoznawania łańcucha poliubikwitynowego przez podjednostki kompleksu regulatorowego 19S, jak również poprzez hamowanie aktywności enzymów deubikwitylujących. W niektórych schorzeniach znaczenie terapeutyczne może mieć nie zahamowanie, ale zwiększenie tempa degradacji określonych białek [22,23,25,83,104].

INHIBITORY PROTEASOMÓW

Brak specyficznych inhibitorów długo był głównym czynnikiem ograniczającym zrozumienie funkcji proteasomu *in vivo*. W ciągu ostatnich lat zidentyfikowano związki, które mogą swobodnie przenikać przez błonę komórkową i hamować proteolityczną funkcję proteasomu [20,103,105] (Tab. 1).

Podstawowym warunkiem hamowania aktywności proteasomu jest zablokowanie reszty Thr1 katalitycznych podjednostek β poprzez utworzenie wiązania (najczęściej kowalencyjnego) pomiędzy inhibitorem a grupami funkcyjnymi (hydroksylową i N-końcową aminową). Pomimo, że proteasom posiada sześć miejsc aktywnych, nie jest konieczne blokowanie ich wszystkich, aby uzyskać efekt hamowania aktywności proteolitycznej kompleksu. Działanie większości inhibitorów proteasomów polega na hamowaniu aktywności chymotrypsynopodobnej (CHTL), co jednak jest wystarczające dla zablokowania funkcji proteasomu, ze względu na dominację tej aktywności w stosunku do pozostałych aktywności proteasomu: trypsynopodobnej (TL) oraz kaspazopodobnej (CL) [106].

Wyróżnia się inhibitory proteasomów otrzymywane syntetycznie oraz inhibitory pochodzenia naturalnego. Syntetyczne inhibitory proteasomów stanowią ujednoczoną grupę związków o strukturze małych peptydów, różniących się ugrupowaniem na C-końcu. Głównymi inhibitorami proteasomów o szkieletie peptydowym są: aldehydy peptydowe, α -ketoaldehydy peptydowe, α -ketoamidy peptydowe, peptydowe pochodne sulfonianu winylu oraz peptydowe pochodne kwasu boronowego [107]. Typowy schemat budowy takich inhibitorów specyficznych wobec proteasomów obejmuje obecność krótkiego peptydu połączonego kowalencyjnie z farmakoforem. Z miejscem aktywnym enzymu reaguje cząsteczka farmakofora, peptyd zaś łączy się z miejscem wiązania substratu białkowego.

Naturalne inhibitory stanowią niejednorodną grupę związków, wytwarzanych przez organizmy należące do różnych grup systematycznych (stąd też ich zróżnicowana budowa chemiczna). Należą tu np.: estry tiolowe γ -laktamu, liniowe epoksyketony peptydowe, czy też peptydy makrocykliczne [107].

Do celów terapeutycznych nie stosuje się inhibitorów z grupy aldehydów peptydowych, gdyż obecność wysoce reaktywnej aldehydowej grupy funkcyjnej zmniejsza specyficzność oddziaływania [108]. Połączenie selektywności, stabilności metabolicznej oraz siły oddziaływania pepty-

dowych pochodnych kwasu boronowego stawia je w pozycji najlepszych kandydatów do celów terapeutycznych [13,21,109]. Przykładem takiego inhibitora proteasomów jest bortezomib, wprowadzony w 2003 roku przez firmę Millenium Pharmaceuticals jako lek Velcade i zaakceptowany do klinicznego stosowania w leczeniu pacjentów z progresją szpiczaka mnogiego. W komórkach nowotworowych aktywność proteasomów 26S jest zwykle podwyższona, co chroni je przed apoptozą. Głównym celem przeciwnowotworowych strategii terapeutycznych opartych na blokowaniu aktywności proteasomów jest indukowanie apoptozy, zarówno przez aktywację szlaku wewnątrzpochodnego (mitochondrialnego), jak i zewnątrzpochodnego (receptorowego), w proliferujących komórkach – bardziej wrażliwych na działanie inhibitorów proteasomów niż komórki prawidłowe.

Najnowsze badania wskazują na ogromny potencjał inhibitorów proteasomów w leczeniu chorób wywołanych przez takie patogeny jak np. *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania* sp., *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* czy *Plasmodium falciparum* [26,110].

ALDEHYDY PEPTYDOWE

Pierwszą rodziną syntetycznych inhibitorów proteasomów były aldehydy peptydowe, które wcześniej z powodzeniem wykorzystywano jako inhibitory proteaz serynowych i cysteinowych. Grupa aldehydowa stanowi cel ataku nukleofilowego, przeprowadzanego przez grupy hydroksylowe oraz tiolowe, występujące w centrach aktywnych proteaz serynowych i cysteinowych. W przypadku proteasomów, inhibitory te tworzą kowalencyjne wiązanie hemiacetalowe z grupą funkcyjną N-końcowej treoniny w centrach aktywnych. Cechą typową dla aldehydów peptydowych jest szybkie przenikanie przez błony oraz odwracalny efekt inhibicji [20,103].

Przykładem najwcześniej rozpoznanego inhibitora, należącego do tej grupy, jest leupeptyna (Ac-Leu-Leu-Arg-al), izolowana z różnych gatunków *Actinomyces*, która stosowana była jako inhibitor proteaz serynowych oraz cysteinowych. Leupeptyna okazała się również skutecznym inhibitorem aktywności TL proteasomu 20S [111]. Przykładami aldehydów peptydowych o zwiększonej selektywności względem aktywności CHTL proteasomu 20S są m.in. PSI (Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al), MG115 (Z-Leu-Leu-nVal-al) oraz MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) [112]. Dzięki wysokiej selektywności, odwracalnej inhibicji miejsc aktywnych proteasomu oraz stosunkowo niskiej cenie, MG132 (opracowany przez firmę Myogenics) wykorzystywany jest często w badaniach nad udziałem proteasomów w procesach komórkowych [20,103].

Do tej grupy inhibitorów należy również tyropeptyna A, będąca naturalnym aldehydem peptydowym otrzymanym z *Kitasatospora*, gatunku należącego do *Actinomyces*. Hamuje ona aktywność CHTL oraz w mniejszym stopniu TL i CL. Fellutamid B, naturalny inhibitor tej klasy, wyizolowany ostatnio z morskiego grzyba *Penicillium fellutanum*, silnie hamuje aktywność CHTL i mniej efektywnie pozostałe aktywności proteasomu [103].

PEPTYDOWE POCHODNE KWASU BORONOWEGO

Badania nad aldehydami peptydowymi doprowadziły wprost do opracowania peptydowych pochodnych kwasu boronowego, Zamiana ugrupowania aldehydowego (MG132) na resztę kwasu boronowego (MG262), skutkowała bardzo znaczącym wzrostem potencjału inhibicyjnego. Stanowiło to podstawę do zaprojektowania mniejszych, dipeptydowych pochodnych kwasu boronowego, których przykładem jest bortezomib (opracowany przez Myogenics/Proscript). Charakteryzują się one bardzo wysoką specyficnością w odniesieniu do proteasomów, ponieważ reszta kwasu boronowego, w przeciwieństwie do grupy aldehydowej, wykazuje znacznie mniejszą zdolność do reagowania z proteazami cysteinowymi, takimi jak katepsyny czy kalpainy [113].

Bortezomib (PS-341) jest pierwszym inhibitorem proteasomów, który znalazł zastosowanie w praktyce klinicznej (jako Velcade), u pacjentów z chorobami nowotworowymi. Został on zatwierdzony w 2003 r. przez FDA do leczenia chorych na opornego szpiczaka mnogiego (*multiple myeloma*) [84,109,114]. Jego działanie cytotoksyczne jest silniejsze w stosunku do proliferujących komórek nowotworowych niż komórek prawidłowych i polega na indukowaniu ich apoptozy, poprzez zahamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, warunkującego nasiloną transkrypcję genów odpowiedzialnych za syntezę cytokin prozapalnych, białek antyapoptotycznych, adhezyn i białek uczestniczących w angiogenezie, ale także hamowanie transkrypcji genów odpowiedzialnych za syntezę białek proapoptotycznych. Blokowanie aktywności proteasomów przez specyficzne inhibitory prowadzi do zahamowania zachodzącej na szlaku ubiquityna-proteasom degradacji I- κ B, inhibitora czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Bortezomib indukuje również apoptozę komórek raka trzustki, stercza, jajników i jego zastosowanie może być rozszerzone na inne nowotwory złośliwe, takie jak czerniak czy nowotwór centralnego układu nerwowego [109,115,116].

Ze względu na efekty uboczne przyjmowania bortezomibu, takie jak neuropatie obwodowe czy trombocytopenia oraz zjawisko oporności na ten lek, poszukuje się innych skutecznych inhibitorów proteasomów, które charakteryzowałyby się mniejszą toksycznością. Opracowano nowe pochodne kwasu boronowego, które zalicza się do inhibitorów proteasomów tzw. drugiej generacji. Do tej grupy związków należą znajdujące się w fazie badań klinicznych: delanzomib (CEP-18770) oraz iksazomib (MLN2238), farmakologicznie aktywna postać, powstająca podczas hydroлізу cytrynianu iksazomibu (MLN9708) [20,114,117].

PEPTYDOWE EPOKSYKETONY

Epoksyketony peptydowe to klasa inhibitorów proteasomów zidentyfikowana pod koniec lat 90. XX wieku. Należą do niej epoksomycyna i eponemycyna, naturalne α' , β' -epoksyketony peptydowe, wyizolowane z dwóch różnych gatunków *Actinobacteria*. Epoksomycyna jest wysoce specyficznym inhibitorem proteasomów i nie hamuje aktywności innych proteaz, takich jak kalpainy, trypsyna, chymotrypsyna, papaina czy katepsyny. Związek ten hamuje

przede wszystkim aktywność CHTL proteasomu, a pozostałe aktywności, TL i CL są hamowane znacznie wolniej (odpowiednio 100 i 1000 razy) [103]. Do grupy naturalnych α' , β' -epoksyketonów peptydowych, hamujących aktywności CHTL i CL proteasomów, należą również związki: TMC-86A i B, TMC-89A i B oraz TMC-96, wyizolowane odpowiednio ze *Streptomyces* sp. TC 1084, *Saccharothrix* sp. TC 1094 oraz *Streptomyces* sp. TC 1087 [118].

Epoksyketony tworzą z resztą Thr1 centrum aktywnego, w dwustopniowym procesie, jedyny w swoim rodzaju pierścień morfolinowy, z udziałem α -NH₂ treoniny. Ta wyjątkowa cecha doprowadziła do opracowania nowych peptydowych epoksyketonów. Pierwszym z nich był YU-101, bardzo silny i specyficzny inhibitor aktywności chymotrypsynopodobnej. Jego pochodną jest karfilzomib (PR-171), który jako pierwszy z inhibitorów proteasomów tzw. drugiej generacji został zatwierdzony przez FDA w 2012 r. do stosowania w monoterapii szpiczaka mnogiego (jako Kyprolis) [119]. Oprozomib (ONX-0912, PR-047) jest analogiem karfilzomibu, podobnie selektywnie hamującym aktywność CHTL proteasomu, wykazującym silne działanie przeciwnowotworowe w badaniach klinicznych I/II fazy [23,116,117].

Większość inhibitorów proteasomów z różnych klas (np. MG132, bortezomib, epoksomycyna, β -laktonektacystyny) hamuje przede wszystkim aktywność CHTL, co pozwala na efektywne blokowanie degradacji proteasomalnej. Jednak przy stosowanych stężeniach tych związków stwierdza się również hamowanie aktywności TL i CL, wskazujące na możliwość większego niż pierwotnie przypuszczano znaczenia tych aktywności w degradacji białek wewnątrzkomórkowych [120]. W oparciu o te obserwacje oraz fakt hamowania przez bortezomib także aktywności kaspazopodobnej podjęto próby opracowania inhibitorów selektywnych wobec poszczególnych miejsc katalitycznych proteasomu [24,120,121]. Ma to pozwolić na określenie znaczenia każdej z aktywności (CHTL, TL i CL) w procesie degradacji białek oraz ich indywidualnej roli jako celów w terapiach przeciwnowotworowych czy przeciwzapalnych. Peptydowy epoksyketon YU-101 był pierwszym selektywnym inhibitorem aktywności CHTL proteasomów oraz immunoproteasomów (β 5, i β 5). Modyfikacje rusztowania epoksyketonów doprowadziły do opracowania specyficznego wobec podjednostki β 5 inhibitora PR-825 oraz dwóch inhibitorów podjednostki i β 5 immunoproteasomów, PR-924 i PR-957 (ONX-0914). Do peptydowych epoksyketonów należą również nowe inhibitory YU-102 i bardziej specyficzny NC-001, hamujące kaspazopodobne miejsca aktywne β 1 oraz i β 1. Dużym wyzwaniem było opracowanie zdolnych do przenikania przez błony komórkowe inhibitorów aktywności trypsynopodobnej. Pierwszymi z nich są zidentyfikowane kilka lat temu epoksyketony peptydowe NC-002 i NC-022, selektywne inhibitory aktywności TL proteasomów oraz immunoproteasomów (β 2, i β 2) [120,122]. Coraz więcej danych wskazuje na kluczowe znaczenie immunoproteasomów w patogenezie wielu chorób autoimmunologicznych i nie jest ono bezpośrednio związane z procesem prowadzącym do prezentacji antygenów przez MHC klasy I. Wyniki prowadzonych we współpracy z firmami farmaceutycznymi badań przedklinicznych, z zastosowaniem selektywnych inhi-

bitorów immunoproteasomów, wskazują na szansę opracowania skutecznych terapii chorób autoimmunologicznych [24].

B-LAKTONY

Grupa inhibitorów proteasomów należących do β -laktonów obejmuje naturalne niepeptydowe metabolity, które zidentyfikował Omura [123,124], izolując z bakterii *Streptomyces lactacystinaeus* pierwszy związek tego typu laktacystynę, posiadającą zdolność indukowania wzrostu neurytów w linii komórkowej neuroblastoma, a także hamowania cyklu komórkowego. Wykazano, że laktacystyna nieodwracalnie modyfikuje N-końcową resztę treoniny (Thr1), głównie podjednostek $\beta 5$ proteasomu [125]. Kolejne badania dowiodły, że formą laktacystyny odpowiedzialną za blokowanie proteasomu jest β -lakton *clasto*-laktacystyny (omuralid), produkt jej rearanzacji w środowisku obojętnym [126]. Laktacystyna, uznawana za wysoce specyficzny inhibitor proteasomów jest jednak zdolna do hamowania aktywności niektórych proteaz serynowych, np. katepsyny A [127].

W ciągu ostatnich lat odkryto nowe inhibitory proteasomów należące do grupy β -laktonów, a jednym z ważniejszych jest salinosporamid A (marizomib, NP-0042), będący metabolitem wtórnym morskiego promieniowca *Salinospora tropica* [20,103]. Chociaż jest on strukturalnie podobny do omuralidu, posiada kilka unikalnych cech, które łącznie wzmacniają jego siłę i powodują nieodwracalną inhibicję wszystkich aktywności proteasomu (CHTL, TL i CL). Marizomib jest najsilniejszym z inhibitorów proteasomów, które obecnie znajdują się w fazie badań klinicznych, a jego zalecą jest możliwość doustnego podawania [116,117]. Marizomib indukuje apoptozę w komórkach szpiczaka mnogiego opornych na bortezomib (za pośrednictwem szlaku zależnego od kaspazy-8, a nie od kaspazy-9, jak w przypadku bortezomibu) i skuteczniej hamuje czynnik NF- κ B. W połączeniu z bortezomibem wykazuje synergistyczne działanie, ze względu na odmienną budowę oraz inny mechanizm działania [116].

Inną grupą naturalnych β -laktonów są belaktozyny, wyizolowane ze szczepów *Streptomyces* sp. Zostały one zidentyfikowane podczas badań ukierunkowanych na poszukiwanie nowych kandydatów na leki przeciwnowotworowe, podczas których wykazano zdolność tych związków do zahamowania cyklu komórkowego w komórkach HeLa na granicy faz G2/M. Następnie stwierdzono, że belaktozyny hamują aktywności proteasomów. Interesującą właściwością tych inhibitorów jest ich wiązanie się do miejsc „naśladowujących” miejsce wiązania substratu [20,128].

SYRBAKTYNY

Syrbaktyny (ang. *syrbactins*) zostały stosunkowo niedawno zidentyfikowane jako inhibitory proteasomów. Przedstawicielami tej klasy związków są: syryngolina A (SylA, ang. *syringolin A*), która jest czynnikiem wirulencji roślinnego patogenu *Pseudomonas syringae* oraz glidobaktyna A (GlbA, ang. *glidobactin A*), wytwarzana przez przedstawicieli rzędu *Burkholderiales* [103,129]. W strukturze syrbaktyn występuje

makrocycliczny układ laktamowy, zawierający podwójne wiązanie pomiędzy węglem C2 i węglem C3, które poprzez reakcję addycji uczestniczy w tworzeniu kowalencyjnego wiązania eterowego z atomem tlenu grupy hydroksylowej reszty Thr1 w centrum aktywnym. Skutkiem tej reakcji jest nieodwracalna inhibicja wszystkich trzech aktywności proteasomów.

Syryngolina A hamuje proliferację oraz indukuje apoptozę w komórkach neuroblastomy i raka jajników. Glidobaktyna A, początkowo zidentyfikowana jako związek o właściwościach przeciwgrzybiczych, wykazuje silne działanie antyproliferacyjne na linii komórkowej szpiczaka mnogiego [103].

OKSATIAZOLONY

Mycobacterium tuberculosis jest jedynym znanym patogenem bakteryjnym, którego proteasomy 20S są niezbędne do utrzymania się tego mikroorganizmu w myszach. Ze względu na skalę problemu, jakim jest gruźlica powodująca zgon około 1,5 miliona osób rocznie oraz pojawianie się szczepów lekoopornych, opracowanie nowych terapii ma kluczowe znaczenie. Badania przesiewowe 20000 związków pozwoliły na zidentyfikowanie dwóch kowalencyjnych inhibitorów - oksatiazolonów, GL5 i HT1171, które były ponad 1000 razy bardziej selektywne w stosunku do proteasomów 20S *M. tuberculosis*, w porównaniu do proteasomów ludzkich (aktywności $\beta 5$) i nieodwracalnie hamowały proteasomy tej bakterii, reagując z resztą Thr1 centrum aktywnego [26].

NIEKOWALENCYJNE INHIBITORY

Cykliczne peptydy

Cykliczne peptydy należące do rodziny TMC-95A są naturalnymi związkami wytwarzanymi przez grzyb *Apiospora montagnei*, będący patogenem roślin. Są silnymi i odwracalnymi inhibitorami wszystkich trzech aktywności proteasomów i nie wykazują zdolności do hamowania innych proteaz, takich jak kalpaina, katepsyny, kaspazy, czy tripsyna. Wiążą się do miejsc aktywnych proteasomu w sposób niekowalencyjny, poprzez sieć składającą się z pięciu wiązań wodorowych. Cyklicznym oktapeptydem jest argiryna A (ang. *Argyria A*), będąca metabolitem śluzowej bakterii *Archangium gephyra*. Jest ona inhibitorem proteasomów równie silnym jak bortezomib i wykazuje silne działanie przeciwnowotworowe w komórkach opornych na bortezomib. Ze względu na stosunkowo duży jej rozmiar zakłada się, że może ona blokować aktywność proteasomu poprzez zaburzenie interakcji pomiędzy proteasomem 20S i jego aktywatorami [103]. Do grupy cyklicznych peptydów należą zidentyfikowane ostatnio jako inhibitory proteasomów scytonemidy A i B, wyizolowane z sinic *Scytonema hoffmani* [20,130].

Naturalne peptydy

Inhibitorami proteasomów należącymi do tej grupy są naturalne peptydy bogate w reszty proliny i argininy. Przedstawicielem tych związków jest PR39, wyizolowany z jelit świni, ze względu na wykazywanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych [131]. PR39 i jego homologi są wydzielane przez makrofagi i obecne w wysięku ran u wie-

lu zwierząt. Wykazano, że PR39 jest niekompetycyjnym i odwracalnym inhibitorem proteasomu, hamował degradację IκBα [103,131]. Peptyd PR11 odpowiadający jedenaśtu N-końcowym resztom aminokwasowym PR39 również hamuje aktywność proteasomów. Peptydy bogate w reszty proliny i argininy zostały uznane za nową klasę inhibitorów proteasomów [131].

Niepeptydowe inhibitory

Przedstawicielem tej grupy niekowalencyjnych inhibitorów proteasomów jest PI-083 [20,132]. Jego szczególną cechą jest selektywne hamowanie wszystkich trzech miejsc aktywnych proteasomów w komórkach, które uległy transformacji nowotworowej. Nie hamuje natomiast proteasomów w komórkach prawidłowych.

Pochodne hydroksymocznika

Dotychczas zidentyfikowane inhibitory proteasomów charakteryzują się strukturą peptydową, która łączy się z

miejscem wiązania substratu albo posiadają grupę reaktywną, wiążącą się kowalencyjnie z N-końcową resztą treoniny w centrum aktywnym. Ostatnio opracowana, przy wykorzystaniu biblioteki inhibitorów Bayer CropScience AG, nowa klasa inhibitorów proteasomów to pochodne hydroksymocznika (ang. *hydroxyureas*, HUs), które odwracalnie hamują aktywność chymotrypsynopodobną proteasomów [133].

INHIBITORY NIESPECYFICZNE

Inhibitory proteasomów to nie tylko związki specyficznie hamujące te multikatalityczne kompleksy proteolityczne [20,103]. Stwierdzono, że aktywność proteasomów jest blokowana również przez wiele naturalnych metabolitów, takich jak np. antybiotyki tiazolowe (tiosrepton, siomycyna A) [134], niektóre triterpenoidy (celastrol, witaferyna A), kurkumina [135], kapsaicyna [136], gliotoksyna (znana jako inhibitor aktywacji NF-κB) oraz flawonoidy, jak np. genisteina czy polifenole zielonej herbaty. Głównymi polifenolami zielonej herbaty są: galusan epigallokatechiny (EGCG),

Tabela 1. Inhibitory rdzenia katalitycznego proteasomów (na podstawie [20,23,24,26,103,105,114,117,118]).

Struktura (klasa) inhibitora	Przykład		
Specyficzne	Aldehydy peptydowe	Leupeptyna MG132 Tyropeptyna A Fellutamid B	
	Peptydowe pochodne kwasu boronowego	MG262 Bortezomib (PS341, Velcade) Delanzomib (CEP-18770) Iksazomib (MLN9708/MLN2238)	
	Peptydowe α',β'-epoksyketony	Epoksymycyna Eponemycyna Karfilzomib (PR-171, Kyprolis) Oprozomib (ONX-0912, PR-047) Inhibitory specyficzne wobec podjednostek katalitycznych: β5, iβ5: YU-101 β2, iβ2: NC-022 β1, iβ1: YU-102, NC-001 β5: PR-825 iβ5: PR-924, PR-957 (ONX-0914)	
	β-laktony	Laktacystyna β-lakton <i>clasto</i> -laktacystyny (omuralid) Salinosporamid A (NPI-0052, Marizomib) Belaktozyny	
	Syrbaktyny	Syryngolina A (SylA) Glidobaktyna A (GlbA)	
	Oksatiazolony (specyficzne wobec <i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	HT1171 GL5	
	Cykliczne peptydy	TMC-95A i pochodne Argiryny A-H Scytonemid A i B	
	Naturalne peptydy	PR-39	
	Inhibitory niepeptydowe	PI-083	
	Pochodne hydroksymocznika		
	Niespecyficzne	Flawonoidy	EGCG Genisteina
		Triterpenoidy	Celastrol Witaferyna A
		Pochodne siarki	Gliotoksyna

epigallokatechina (EGC), galusan epikatechiny (ECG) i epikatechina (EC) [137]. Największą bioaktywność wykazuje EGCG, który wykazuje działanie przeciwnowotworowe, reagując z wieloma białkami. Stwierdzono, że EGCG działa również jako inhibitor proteasomów. Opracowano również syntetyczne analogi tego związku. Próby uzyskania synergistycznego działania w terapiach z jednoczesnym użyciem bortezomibu wykazały jednak, że EGCG tworzy wiązanie kowalencyjne z bortezomibem i blokuje w ten sposób jego aktywność przeciwnowotworową [138,139]. Z tego względu pacjentom leczonym bortezomibem oraz innymi pochodnymi boronowymi zaleca się ograniczenie spożywania produktów o dużej zawartości flawonoidów, takich jak zielona herbata [139].

INHIBITORY KOMPLEKSU REGULATOROWEGO 19S

Badania inhibitorów kompleksu regulatorowego 19S (RP) są znacznie mniej zaawansowane niż te dotyczące inhibitorów rdzenia katalitycznego proteasomów (20S). W kompleksie RP potencjalnymi celami dla opracowywanych leków są aktywność ATPazy, receptory ubikwityny oraz enzymy deubikwitylujące [20,103]. Zlokalizowane w podstawie kompleksu 19S ATPazy są najlepiej poznanymi enzymami RP. Badania przesiewowe biblioteki cząsteczek peptoidów połączonych z analogami puryny doprowadziły do zidentyfikowania peptoidowego inhibitora RIP-1 (ang. *regulatory particle inhibitor peptoid-1*), którego celem okazała się podjednostka Rpt4. Związek ten w mikromolowych stężeniach hamuje proces rozkładowy białek i degradację białka p27, zaangażowanego w regulację cyklu komórkowego. Określono minimalny farmakofor RIP-1, który posłużył do otrzymania prostszych wersji tego inhibitora, o zwiększonej aktywności komórkowej.

Główną rolą kompleksu regulatorowego jest rozpoznawanie, przez odpowiednie receptory ubikwityny (Rpn1, Rpn10, Rpn13), białek wyznakowanych łańcuchem poliubikwitynowym. Badania niskocząsteczkowych związków stabilizujących cykliny B w ekstraktach oocytów *Xenopus laevis* pozwoliły na odkrycie dwóch związków: ubistatyny A oraz ubistatyny B, które blokują wiązanie łańcuchów poliubikwitynowych do ich receptorów, a tym samym dalszą degradację białek przez proteasomy 26S [19,20,103].

Znajdujące się w kompleksie regulatorowym enzymy deubikwitylujące (Rpn11, UCH37, USP14) usuwają łańcuch poliubikwitynowy z białka, umożliwiając translokację substratu do rdzenia katalitycznego proteasomu i następnie jego degradację [83,95,96]. Inhibicja aktywności tych enzymów przez związki b-AP15 oraz IU-1 została opisana w podrozdziale „Inhibitory enzymów deubikwitylujących”.

INHIBITORY UBIKWITYLACJI

INHIBITORY ENZYMU E1

Reakcja katalizowana przez enzym aktywujący ubikwitynę (E1) obejmuje adenylację C-końca ubikwityny, a następnie utworzenie kowalencyjnego wiązania tioestrowego z resztą cysteiny w centrum aktywnym E1. Zahamowanie aktywności tego enzymu prowadzi do całkowitego zablokowania szlaku ubikwityna-proteasom, dając końcowy

efekt analogiczny do powodowanego przez hamowanie aktywności proteasomów, a nie tak specyficzny jak w przypadku hamowania aktywności enzymów E2 i E3 czy enzymów deubikwitylujących (Tab. 2).

Pierwszym zidentyfikowanym inhibitorem enzymu aktywującego ubikwitynę, zdolnym do przenikania przez błony, jest pyrazon PYR-41, który wiąże się kowalencyjnie z E1 uniemożliwia ubikwitylację i degradację przez proteasomy takich białek jak np. supresor p53, zapobiegający transformacji nowotworowej [23,25,113]. Inny strukturalnie podobny inhibitor PYZD4409 (również jak PYR-41) zdolny jest do indukowania apoptozy w komórkach nowotworowych. Do związków hamujących aktywność enzymu E1, na drodze modyfikacji katalitycznej reszty Cys, należą także JS-K i disiarczek NSC624206. Ponadto, inhibitorem E1 okazał się largazol, związek naturalny znany ze zdolności do hamowania aktywności deacylaz histonów, który blokuje etap adenylacji ubikwityny (a nie tworzenia wiązania tioestrowego) [113].

Oprócz enzymów aktywujących ubikwitynę, w komórkach występują enzymy E1 aktywujące białka ubikwitynopodobne, np. NEDD8. Firma Millennium Pharmaceuticals opracowała niskocząsteczkowy inhibitor enzymu aktywującego NEDD8, MLN4924 (pevonedistat) [25,113,140], który tworzy addukt MLN4924-NEDD8, naśladujący substrat i kompetycyjnie hamujący enzym E1. W związku z tym niemożliwe staje się przyłączenie NEDD8 np. do białka SCF^{Skp2}, zaangażowanego w regulację cyklu komórkowego. Inhibitor MLN4924 zastosowany został w badaniach klinicznych fazy II, dotyczących nowotworów hematologicznych [23,140].

INHIBITORY ENZYMU E2

Pomimo obecności katalitycznej reszty cysteiny w centrum aktywnym enzymów koniugujących ubikwitynę (E2), poszukiwanie ich inhibitorów nie przyniosło jeszcze takich efektów, jak w przypadku enzymów E1. Dotychczas opracowano tylko dwa inhibitory aktywności enzymu E2 (Tab. 2). Pierwszym z nich jest CC0651, niskocząsteczkowy związek zidentyfikowany podczas prób znalezienia inhibitorów ubikwitylacji białka p27^{Kip1}, ważnego dla progresji cyklu komórkowego i potencjalnego celu terapii przeciwnowotworowych. Blokowanie aktywności enzymu E2 (hCdc34) przez CC0651 zachodzi na drodze inhibicji allosterycznej [23,25,113]. Drugim z poznanych inhibitorów innego enzymu koniugującego ubikwitynę (Rad6) jest TZ9, związek kompetycyjnie hamujący aktywność tego E2, ważnego dla procesów poreplikacyjnej naprawy DNA [23,25,113]. Stwierdzono, że TZ9 skutecznie blokuje ubikwitylację histonów *in vitro* i hamuje proliferację komórek [113].

INHIBITORY ENZYMU E3

Specyficzność szlaku ubikwityna-proteasom w odniesieniu do białek ulegających degradacji jest w znaczącym stopniu uwarunkowana selektywnością ligaz ubikwitynowych (E3), z tego względu enzymy te stanowią atrakcyjne cele dla potencjalnych terapeutów. Większość ligaz ubikwitynowych (poza HECT) nie posiada klasycznego centrum

Tabela 2. Inhibitory enzymów kaskady ubikwitylacji (na podstawie [19,23,25,83,113,140]).

Enzym	Inhibitor	Mechanizm działania
E1 (enzym aktywujący ubikwitynę)	PYR-41	Blokuje tworzenie wiązania tioestrowego z ubikwityną, wiążąc się kowalencyjnie z resztą Cys w centrum aktywnym E1
	PYZD4409	Blokuje tworzenie wiązania tioestrowego z ubikwityną, wiążąc się kowalencyjnie z resztą Cys w centrum aktywnym E1
	JS-K	Blokuje tworzenie wiązania tioestrowego z ubikwityną, wiążąc się kowalencyjnie z resztą Cys w centrum aktywnym E1
	NSC624206	Blokuje tworzenie wiązania tioestrowego z ubikwityną, wiążąc się kowalencyjnie z resztą Cys w centrum aktywnym E1
	Largazol	Blokuje etap adenylacji ubikwityny (a nie tworzenia wiązania tioestrowego)
	MLN4924 (Pevonedistat)	Tworzy kowalencyjny addukt z NEDD8 (białkiem ubikwitynopodobnym), który niekompetycyjnie hamuje E1
E2 (enzym koniugujący ubikwitynę)	CC0651	Blokuje hCdc34 (E2) drodze inhibicji allosterycznej
	TZ9	Blokuje Rad6 (E2) na drodze inhibicji kompetycyjnej
E3 (ligaza ubikwitynowa)	Nutlina-3 (RO5045337)	Hamuje interakcje MDM2-p53, blokując w ligazie MDM2 domenę wiążącą białko p53
	RG7112 (pochodna Nutliny-3)	Hamuje interakcje MDM2-p53, blokując w ligazie MDM2 domenę wiążącą białko p53
	JNJ-26854165 (Serdemetan)	Blokuje interakcje kompleksu p53-MDM2 z proteasomem.
	MI-219	Blokuje interakcje MDM2-p53
	MI-888	Blokuje interakcje MDM2-p53
	AT-406	Blokuje ligazy IAP
	GDC-0152	Blokuje ligazy IAP
	TL32711	Blokuje ligazy IAP

aktywnego, natomiast umożliwia oddziaływanie białko-białko pomiędzy substratem a niosącym zaktywowaną ubikwitynę enzymem E2. Z tego względu hamowanie ligaz E3 wymaga ingerowania w oddziaływanie między tymi białkami, co jest bardzo trudne do osiągnięcia za pomocą niskocząsteczkowych związków [83,113] (Tab. 2).

Pierwszą ligazą ubikwitynową, dla której opracowano cząsteczki inhibitorowe był enzym MDM2 (HDM2 u ludzi), który ubikwityluje białko supresorowe p53, przeciwdziałające transformacji nowotworowej. Firma Roche opracowała Nutliny, *cis*-imidazolinowe inhibitory hamujące oddziaływanie MDM2-p53, które stabilizują poziom białka p53 w komórkach. Kolejnym inhibitorem (będącym pochodną Nutliny-3) jest RG7112, który wprowadzono do badań klinicznych fazy I w odniesieniu do guzów litych i nowotworów hematologicznych [113]. Opracowano również inny związek JNJ-26854165 (Serdemetan), podawany doustnie w badaniach klinicznych fazy I, którego mechanizm działania jest odmienny i polega na blokowaniu oddziaływania kompleksu p53-MDM2 z proteasomem. Do inhibitorów ligazy MDM2 należą także związki nowej klasy (ang. *spirooxindoles*), które przedstawicielami są MI-219 oraz MI-888 [113].

Ważną grupą ligaz E3, dla której intensywnie poszukiwano inhibitorów, jest rodzina ligaz IAP (ang. *inhibitor-of-apoptosis-protein*). Ligazy IAPs regulują apoptozę, poprzez różne szlaki, obejmujące kaspazy 3, 7 i 9. W fazie prób klinicznych znajduje się wiele związków, które opracowywano w oparciu o naturalne inhibitory IAPs, jakimi są białka apoptogenne SMAC/DIABLO (ang. *second mitochondrial activator of*

caspases/direct IAP-binding protein with low pl) [19,23,25,113]. Należą do nich AT-406 (firmy Ascenta Therapeutics), związek podawany doustnie w badaniach I fazy, dotyczących leczenia guzów litych i chłoniaka oraz stosowane dożylnie inhibitory GDC-0152 (firmy Genentech/Roche) i TL32711 (firmy Tetralogics Pharma) [113].

INHIBITORY ENZYMÓW DEUBIKWITYLUJĄCYCH

Specyficzność enzymów deubikwitylujących dotyczy zarówno rozpoznawania substratów, jak i połączeń ubikwityny. Wiele spośród DUBs stanowi atrakcyjne cele w terapiach przeciwnowotworowych. Należą do nich zwłaszcza enzymy chroniące białka przed degradacją, poprzez usuwanie z nich łańcuchów ubikwityny, zanim zostaną rozpoznane przez proteasomy (Tab. 3) [22,23,25,83,104,113].

Substratami enzymu deubikwitylującego USP7 (ang. *ubiquitin-specific protease 7*) są różne białka, w tym MDM2 (ang. *mouse double minute 2*) – ligaza E3, która odpowiada za ubikwitylację białka supresorowego p53. USP7 stabilizując MDM2 obniża poziom p53, zatem blokowanie aktywności USP7 zwiększa poziom tego supresora nowotworu poprzez wymuszoną degradację MDM2. Stwierdzono, że nadekspresja USP7 jest bezpośrednio związana z rozwojem raka prostaty [22]. Pierwszy opisany niskocząsteczkowy inhibitor deubikwitynazy USP7 to HBX 41,108. Późniejsze badania wykazały jednak, że nie był on specyficzny wobec DUBs. Kolejny zidentyfikowany związek HBX 19,818 jest specyficznym kowalencyjnym inhibitorem USP7, który nie hamuje innych USPów ani innych DUBs. Związki nisko-

Tabela 3. Inhibitory enzymów deubikwitylujących (na podstawie [22,23,25,83,104,113,141,142]) .

Inhibitor	Enzym	Działanie
HBX 41,108	USP7	Niespecyficzny wobec DUBs
HBX 19,818	USP7	Specyficzny kowalencyjny inhibitor USP7 (nie hamuje innych USPs ani innych DUBs).
P005091	USP7 i USP47	Podwójna aktywność (blokuje USP7 i USP47)
P0050429	USP7 i USP47	Podwójna aktywność (blokuje USP7 i USP47)
FT671	USP7	Wysoce specyficzny, niekowalencyjny inhibitor ligazy USP7
FT827	USP7	Wysoce specyficzny, niekowalencyjny inhibitor ligazy USP7
GNE-6640	USP7	Selektywny inhibitor USP7, indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych
GNE6776	USP7	Selektywny inhibitor USP7, indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych
LS1	UCH-L3	
PR-619	DUBs	Hamuje wiele różnych DUBs, wykazując się wysoką selektywnością wobec tych enzymów, w porównaniu do innych grup proteaz cysteinowych
LDN91946	UCH-L1	Silny inhibitor UCH-L1, deubikwitynazy zaangażowanej w rozwój choroby Parkinsona
b-AP15	UCH37 (UCH-L5) i USP14	Selektywnie hamuje deubikwitynazy zasocjowane z kompleksem regulatorowym 19S
IU-1	USP14	Selektywny tylko wobec deubikwitynazy USP14, stymuluje degradację białek, w tym zaangażowanych w rozwój chorób neurodegeneracyjnych

cząsteczkowe P005091 oraz P0050429 wykazują podwójną aktywność, zdolne są do blokowania zarówno enzymu USP7 jak i USP47. Całkiem niedawno zidentyfikowano dwa związki, FT671 i FT827, które okazały się wysoce specyficznymi, niekowalencyjnymi inhibitorami ligazy USP7 [141]. FT671 wykazywał *in vivo* aktywność przeciwnowotworową w mysim modelu szpiczaka mnogiego. Nowymi selektywnymi inhibitorami USP7 są też związki GNE-6640 i GNE6776, uzyskane w ostatnich latach w badaniach przesiewowych, z wykorzystaniem NMR. Oba związki indukują apoptozę w komórkach nowotworowych [142].

Opracowano także inhibitory innych enzymów deubikwitylujących. Wśród 1000 związków analizowanych metodą FRET (ang. *fluorescence resonance energy transfer*), z wykorzystaniem fluorescencyjnie znakowanej ubikwityny, odkryto inhibitor LS1, hamujący aktywność UCH-L3 (ang. *ubiquitin C-terminal hydrolase L3*). Kolejny związek, PR-619, jest zdolny do hamowania wielu różnych DUBs, wykazując się wysoką selektywnością wobec tych enzymów, w porównaniu do innych grup proteaz cysteinowych. Jest on cennym narzędziem w badaniu funkcji enzymów deubikwitylujących w schorzeniach neurodegeneracyjnych [143]. Silnym inhibitorem deubikwitynazy UCH-L1 (jednej z najwcześniej opisanych DUBs), mającej znaczenie w chorobie Parkinsona, okazał się związek LDN91946 [113].

Hamowanie enzymów deubikwitylujących zwykle prowadzi do nasilenia tempa degradacji ich substratów przez proteasomy. Jednak nie zawsze taki proces zachodzi, ponieważ istnieją DUBs niezbędne do degradacji białka, takimi enzymami są deubikwitynazy zlokalizowane w regulatorowych kompleksach 19S proteasomów 26S (Rpn11, UCH37, USP14). Odcinają one łańcuch poliubikwitynowy od białka substratowego, umożliwiając jego degradację w rdzeniu katalitycznym proteasomu. Zidentyfikowano niskocząsteczkowy związek b-AP15, który selektywnie hamuje UCH37 (UCH-L5) i USP14, zasocjowane z kompleksem 19S deubikwitynazy, będące proteazami cysteinowymi [20,23,83,113]. W przypadku łącznego zahamowania aktywności tych DUBs obserwuje się efekt analogiczny do wywoływanego

przez inhibitory proteasomów. Przypuszcza się, że inhibitory kluczowej podjednostki Rpn11, będącej metaloproteazą zależną od Zn^{2+} , powinny powodować nawet silniejszy efekt. W przeciwieństwie do nich, inhibitor IU-1, selektywny tylko wobec deubikwitynazy USP14, stymuluje degradację białek, w tym powstających w wyniku uszkodzeń oksydacyjnych oraz specyficznych białek zaangażowanych w rozwój chorób neurodegeneracyjnych [25,113].

PODSUMOWANIE

Od odkrycia szlaku ubikwityna-proteasom nastąpił znaczący postęp w poznaniu skomplikowanych interakcji pomiędzy poszczególnymi elementami tego systemu. Dzięki zidentyfikowaniu i zastosowaniu specyficznych inhibitorów stało się możliwe bardziej dogłębne zrozumienie procesu degradacji białek w proteasomach 26S, jak również poszczególnych etapów szlaku prowadzących do ubikwitylacji czy deubikwitylacji białek substratowych. Wyjątkowym sukcesem jest bardzo szybkie przeniesienie wyników badań laboratoryjnych szlaku ubikwityna-proteasom do praktyki klinicznej, przede wszystkim w odniesieniu do terapii onkologicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Ciechanover A (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 79-86
2. Staszczak M, Zdunek E (1999) Proteoliza wewnątrzkomórkowa. *Post Biochem* 45: 32-41
3. de Duve C, Wattiaux R (1966) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 28: 435-492
4. Etlinger JD, Goldberg AL (1977) A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 54-58
5. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA (1980) 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
6. Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A (1980) ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1365-1368

7. Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL (1980) Ubiquitin is the ATP-dependent Proteolysis Factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 255: 7529-7532
8. Wilk S, Orlowski M (1980) Cation-sensitive neutral endopeptidase: Isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *J Neurochem* 35: 1172-1182
9. Melino G (2005) Discovery of the ubiquitin proteasome system and its involvement in apoptosis. *Cell Death Differ* 12: 1155-1157
10. Ciechanover A (2009) Tracing the history of the ubiquitin proteolytic system: The pioneering article. *Biochem Biophys. Res Commun* 387: 1-10
11. Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82: 373-428
12. Pickart CM, Cohen RE (2004) Proteasomes and their kin: Proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 177-187
13. Adams J (2002) Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends Mol Med* 8: 49-54
14. Ciechanover A (2006) The ubiquitin proteolytic system: from an idea to the patient bed. *Proc Am Thorac Soc* 3: 21-31
15. Petroski MD (2008) The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochem* 9 (Suppl 1): S7
16. Schmidt M, Finley D (2014) Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 1843: 13-25
17. Lee DH, Goldberg AL (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8: 397-403
18. Ciechanover A, Schwartz AL (2004) The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim Biophys Acta* 1695: 3-7
19. Hoeller D, Dikic I (2009) Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* 458: 438-444
20. Kisselev AF, van der Linden WA, Overkleeft HS (2012) Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol* 8: 739-758
21. Ostrowska H (2008) The ubiquitin-proteasome system: A novel target for anticancer and anti-inflammatory drug research. *Cell Mol Biol Lett* 13: 353-365
22. Colland F (2010) The therapeutic potential of deubiquitinating enzyme inhibitors. *Biochem Soc Trans* 38: 137-143
23. Mattern, MR, Wu J, Nicholson B (2012) Ubiquitin-based anticancer therapy: Carpet bombing with proteasome inhibitors vs surgical strikes with E1, E2, E3, or DUB inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1823: 2014-2021
24. Huber EM, Groll M (2012) Inhibitors for the immuno- and constitutive proteasome: current and future trends in drug development. *Angew Chem Int Ed* 51: 8708-8720
25. Zhang W, Sidhu SS (2014) Development of inhibitors in the ubiquitination cascade. *FEBS Lett* 588: 356-367
26. Bibo-Verdugo B, Jiang Z, Caffrey CR, O'Donoghue AJ (2017) Targeting proteasomes in infectious organisms to combat disease. *FEBS J* 284: 1503-1517
27. Hanna J, Finley D (2007) A proteasome for all occasions. *FEBS Lett* 581: 2854-2861
28. Coux O, Tanaka K, Goldberg, AL (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65: 801-847
29. Lupas A, Flanagan JM, Tamura T, Baumeister W (1997) Self-compartmentalizing proteases. *Trends Biochem Sci* 22: 399-404
30. Vierstra R (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* 8: 135-142
31. Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68: 1015-68
32. Wójcik C, DeMartino GN (2003) Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 579-589
33. Rechsteiner M (2005) The 26S proteasome. W: Mayer J, Ciechanover A, Rechsteiner M (red), *Protein Degradation. Ubiquitin and the Chemistry of Life*, Vol. 1, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 220-247
34. Wlodawer A (1995) Proteasome: A complex protease with a new fold and a distinct mechanism. *Structure* 3: 417-420
35. DeMartino GN, Wójcik C (2005) Proteasome regulator, PA 700 (19S Regulatory Particle). W: Mayer J, Ciechanover A, Rechsteiner M (red), *Protein Degradation. Ubiquitin and the Chemistry of Life*, Vol. 1, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 288-317
36. Eytan E, Ganoth D, Armon T, Hershko A (1989) ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7751-7755
37. Zühl F, Tamura T, Dolenc I, Cejka Z, Nagy I, De Mot R, Baumeister W (1997) Subunit topology of the *Rhodococcus* proteasome. *FEBS Lett* 400: 83-90
38. Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386: 463-471
39. Bajorek M, Glickman M (2006) The proteasome portal and regulation of proteolysis. W: Mayer J, Ciechanover A, Rechsteiner M (red) *Protein Degradation. The Ubiquitin-Proteasome System*, Vol. 2, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 111-127
40. Seemüller E, Lupas A, Stock D, Löwe J, Huber R, Baumeister W (1995) Proteasome from *Thermoplasma acidophilum* - a threonine protease. *Science* 268: 579-582
41. Kisselev AF, Songyang Z, Goldberg AL (2000) Why does threonine, not serine, function as the active site nucleophile in proteasomes? *J Biol Chem* 275: 14831-14837
42. Chen P, Hochstrasser M (1996) Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* 86: 961-972
43. Schmidtke G, Kraft R, Kostka S, Henklein P, Frömmel C, Löwe J, Huber R, Kloetzel PM, Schmidt M (1996) Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J* 15: 6887-6898
44. Dahlmann B, Kuehn L, Grziwa A, Zwickl P, Baumeister W (1992) Biochemical properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *Eur J Biochem* 208: 789-797
45. Kisselev AF, Akopian TN, Castillo V, Goldberg AL (1999) Proteasome active sites allosterically regulate each other activities, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell* 4: 395-402
46. Kisselev AF, Garcia-Calvo M, Overkleeft HS, Peterson E, Pennington MW, Ploegh HL, Thornberry NA, Goldberg AL (2003) The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem* 278: 35869-35877
47. Kloetzel PM (2001) Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 179-187
48. Kniepert A, Groettrup M (2014) The unique functions of tissue-specific proteasomes. *Trends Biochem Sci* 39: 17-24
49. Beninga J, Goldberg A (1998) Function of the proteasome in antigen presentation. W: Peters JM, Harris JR, Finley D (red), *Ubiquitin and the Biology of the Cell*. Plenum Press, New York, str. 191-222
50. Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL (2002) The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 39: 147-164
51. Groettrup M, Kirk CJ, Basler M (2010) Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol* 10: 73-78
52. Kloetzel PM, Ossendorp F (2004) Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 16: 76-81
53. Livneh I, Cohen-Kaplan V, Cohen-Rosenzweig C, Avni N, Ciechanover A (2016) The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Research* 26: 869-885

54. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19: 94-102
55. Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1: 221-226
56. Lee C, Schwartz MP, Prakash S, Iwakura M, Matouschek A (2001) ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol Cell* 7: 627-637
57. Strickland E, Hakala K, Thomas PJ, DeMartino GN (2000) Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 275: 5565-5572
58. Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7: 1062-1067
59. Köhler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, Finley D (2001) The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 7: 1143-1152
60. Glickman MH, Rubin DM, Fu H, Larsen CN, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Vierstra R, Baumeister W, Fried V, Finley D (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94: 615-623
61. Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A (2012) Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* 482: 186-191
62. Rubin DM, Glickman MH, Larsen CN, Dhruvakumar S, Finley D (1998) Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J* 17: 4909-4919
63. Baumeister W, Zwickl P (2002) The 26S proteasome: A supramolecular assembly designed for controlled proteolysis. W: Ciechanover AJ, Matusucci MG (red) *The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic System: From Classical Biochemistry to Human Diseases, Recent Advances in Human Biology*, Vol. 9, World Scientific, River Edge, NJ, str. 67-80
64. Hartmann-Petersen R, Seeger M, Gordon C (2003) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci* 28: 26-31
65. Sharon M, Taverner T, Ambroggio XI, Deshaies RJ, Robinson CV (2001) Structural organization of the 19S proteasome lid: Insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol* 4: 1314-1323
66. Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM (2002) A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416: 763-767
67. Ferrell K, Wilkinson CR, Dubiel W, Gordon C (2000) Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* 25: 83-88
68. Yao T, Cohen RE (2002) A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419: 403-407
69. Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR 3rd, Koonin EV, Deshaies RJ (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298: 611-615
70. Liu CW, Jacobson AD (2013) Functions of the 19S complex in proteasomal degradation. *Trends Biochem Sci* 38: 103-110
71. Benaroudj N, Smith D, Goldberg AL (2006) What the archaeal PAN-proteasome complex and bacterial ATP-dependent proteases can teach us about the 26S proteasome. W: Mayer J, Ciechanover A, Rechsteiner M (red), *Protein Degradation. The Ubiquitin-Proteasome System.*, Vol. 2, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 215-247
72. Pickart CM (2001) Mechanisms of ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-533
73. Coffino P (1998) Degradation of ornithine decarboxylase. W: Peters J-M, Harris JR, Finley D (red), *Ubiquitin and the Biology of the Cell*, Plenum Press, New York, str. 411-427
74. Amerik Y, Hochstrasser M (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695: 189-207
75. Swanson R, Hochstrasser M (2000) A viable ubiquitin-activating enzyme mutant for evaluating ubiquitin system function in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS* 477: 193-198
76. Herrmann J, Ciechanover A, Lerman LO, Lerman A (2004) The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases - a hypothesis extended. *Cardiovasc Res* 61: 11-21
77. Schnell JD, Hicke L (2003) Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 278: 35857-35860
78. Hochstrasser M (2009) Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458: 422-429
79. Schwartz D, Hochstrasser M (2003) A superfamily of protein tags: Ubiquitin, SUMO, and related modifiers. *Trends Biochem Sci* 28: 321-328
80. Yeh ETH, Gong L, Kamitani T (2000) Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 248: 1-14
81. Scheffner M, Smith S, Jentsch S. (1998) *The ubiquitin-conjugation system*. W: Peters J-M, Harris JR, Finley D (red), *Ubiquitin and the Biology of the Cell*, Plenum Press, New York, str. 65-98
82. Tobiasz A, Żołądek T (1997) System ubikwitynacji i jego rola u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. *Post Biochem* 43: 91-97
83. Lill JR, Wertz IE (2014) Toward understanding ubiquitin-modifying enzymes: from pharmacological targeting to proteomics. *Trends Pharmacol Sci* 35: 187-207
84. Maliński M, Cichocki M (2013) Inhibicja aktywności proteasomu jako nowa strategia w terapii i chemioprewencji nowotworów. *Post Hig Med Dosw* 67: 90-106
85. Ciechanover A, Brundin P (2003) The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg *Neuron* 40: 427-446
86. Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96: 635-644
87. Deshaies RJ, Joazeiro CAP (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78: 399-434
88. Grzelakowska-Sztabert B (2005) Zależna od ubikwityny degradacja białek - Nagroda Nobla z chemii w 2004 roku. *Kosmos* 54: 133-148
89. Zheng N, Pavletich NP (2005) The structural biology of ubiquitin-protein-ligases. W: Mayer J, Ciechanover A, Rechsteiner M (red), *Protein Degradation. Ubiquitin and the Chemistry of Life*, Vol. 1, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 156-189
90. Braten O, Livneh I, Ziv T, Admon A, Kehat I, Caspi LH, Gonen H, Bercovich B, Godzik A, Jahandideh S, Jaroszewski L, Sommer T, Kwon YT, Guharoy M, Tompa P, Ciechanover A (2016) Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: E4639-E4647
91. Orłowski M, Wilk S (2003) Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys* 415: 1-5
92. Pickart CM, VanDemark AP (2000) Opening doors into the proteasome. *Nat Struct Biol* 7: 999-1001
93. Rabl J, Smith DM, Yu Y, Chang S-C, Goldberg AL, Cheng Y (2008) Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol Cell* 30: 360-368
94. Wilkinson K (2000) Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 11: 141-148
95. Russel NS, Wilkinson KD (2005) The deubiquitinating enzymes. W: Mayer J, Ciechanover A, Rechsteiner M (red), *Protein Degradation. Ubiquitin and the Chemistry of Life*, Vol. 1, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 190-219
96. Turcu FER, Ventii KH, Wilkinson KD (2009) Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78: 363-397
97. Vierstra RD (2009) The ubiquitin-proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 385-397
98. Fischer M, Hilt W, Richter-Ruoff B, Gonen H, Ciechanover A, Wolf DH (1994) The 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 355: 69-75

99. Staszczak M (2002) Proteasomal degradation pathways in *Trametes versicolor* and *Phlebia radiata*. *Enzyme Microb Technol* 30: 537-541
100. Staszczak M (2008) The role of the ubiquitin-proteasome system in the response of the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* to nitrogen deprivation. *Fungal Genet Biol* 45: 328-337
101. McCracken AA, Brodsky JL (2003) Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD). *BioEssays* 25: 868-877
102. Dahlmann B (2007) Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem* 8 (Suppl 1): S3
103. de Bettignies G, Coux O (2010) Proteasome inhibitors: Dozens of molecules and still counting. *Biochimie* 92: 1530-1545
104. Lei H, Shan H, Wu Y (2017) Targeting deubiquitinating enzymes in cancer stem cells. *Cancer Cell Int* 17:101
105. Stein ML, Groll M (2014) Applied techniques for mining natural proteasome inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1843: 26-38
106. Kisselev A, Goldberg AL (2001) Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 8: 739-758
107. Myung J, Kim KB, Crews CM (2001) The ubiquitin-proteasome pathways and proteasome inhibitors. *Med Res Rev* 21: 245-273
108. Iqbal M, Chatterjee S, Kauer JC, Mallamo JP, Messina PA, Reiboldt A, Siman R (1996) Potent alpha-ketocarbonyl and boronic ester derived inhibitors of proteasome. *Bioorg Med Chem Lett* 6: 287-290
109. Jurczynszyn A, Skotnicki AB (2006) Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in neoplastic diseases. *Adv Clin Exp Med* 15: 309-320
110. Li H, Tsu C, Blackburn C, Li G, Hales P, Dick L, Bogyo M. (2014) Identification of potent and selective non-covalent inhibitors of the *Plasmodium falciparum* proteasome. *J Am Chem Soc* 136: 13562-13565
111. Wilk S, Orlowski M (1983) Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem* 40: 842-849
112. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78: 761-771
113. Buckley DL, Crews CM (2014) Small-molecule control of intracellular protein levels through modulation of the ubiquitin proteasome system. *Angew Chem Int Ed* 53: 2312-2330
114. Buac D, Shen M, Schmitt S, Kona FR, Deshmukh R, Zhang Z, Neslund-Dudas C, Mitra B, Dou QP (2013) From bortezomib to other inhibitors of the proteasome and beyond. *Curr Pharm Des* 19: 4025-4038
115. Jurczynszyn A, Skotnicki AB (2007) Nowe leki w terapii szpiczaka mnogiego. *Współcz Onkol* 11: 186-194
116. Romaniuk W, Ołdziej AE, Zińczuk J, Kłoczko J (2015) Inhibitory proteasomów w terapii onkologicznej. *Post Hig Med Dosw* 69: 1443-1450
117. Allegra A, Alonci A, Gerace D, Russo S, Innao V, Calabrò L, Musolino C (2014) New orally active proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Leuk Res* 38: 1-9
118. Momose I, Kawada M (2016) The therapeutic potential of microbial proteasome inhibitors. *Int Immunopharmacol* 37: 23-30
119. Perel G, Bliss J, Thomas CM (2016) Carfilzomib (Kyprolis): A novel proteasome inhibitor for relapsed and/or refractory multiple myeloma. *P T* 41: 303-307
120. Kisselev AF, Groettrup M (2014) Subunit specific inhibitors of proteasomes and their potential for immunomodulation. *Curr Opin Chem Biol* 23: 16-22
121. Huber EM, Basler M, Schwab R, Heinemeyer W, Kirk CJ, Groettrup M, Groll M (2012) Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* 148: 727-738
122. Mirabella ACI, Pletnev AA, Downey SL, Florea BI, Shabaneh TB, Britton M, Verdoes M, Filippov DV, Overkleeft HS, Kisselev AF (2011) Specific cell-permeable inhibitor of proteasome trypsin-like sites selectively sensitizes myeloma cells to bortezomib and carfilzomib. *Chem Biol* 18: 608-618
123. Omura S, Fujimoto T, Otaguro K, Matsuzaki K, Moriguchi R, Tanaka H, Sasaki Y (1991) Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neurogenesis of neuroblastoma cells. *J Antibiot* 44: 113-116
124. Omura S, Matsuzaki K, Fujimoto T, Kosuge K, Furuya T, Fujita S, Nakagawa A (1991) Structure of lactacystin, a new microbial metabolite which induces differentiation of neuroblastoma cells. *J Antibiot* 44: 117-118
125. Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL (1995) Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268: 726-731
126. Dick LR, Cruikshank AA, Grenier L, Melandri FD, Nunes SL, Stein RL (1996) Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin. A central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem* 271: 7273-7276
127. Ostrowska H, Wojcik C, Omura S, Worowski K (1997) Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A-like enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 729-732
128. Groll M, Larionov OV, Huber R, de Meijere A (2006) Inhibitor-binding mode of homobactosin C to proteasomes: new insights into class I MHC ligand generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4576-4579
129. Dudler R (2014) The role of bacterial phytotoxins in inhibiting the eukaryotic proteasome. *Trends Microbiol* 22: 28-35
130. Kronic A, Vallat A, Mo S, Lantvit DD, Swanson SM, Orjala J. (2010) Scytonemides A and B, cyclic peptides with 20S proteasome inhibitory activity from the cultured cyanobacterium *Scytonema hofmannii*. *J Nat Prod* 73: 1927-1932
131. Gaczynska M, Osmulski PA, Gao Y, Post MJ, Simons M (2003) Proline- and arginine-rich peptides constitute a novel class of allosteric inhibitors of proteasome activity. *Biochemistry* 42: 8663-8670
132. Kazi A, Lawrence H, Guida WC, McLaughlin ML, Springett GM, Berndt N, Yip RM, Sebt SM (2009) Discovery of a novel proteasome inhibitor selective for cancer cells over non-transformed cells. *Cell Cycle* 8: 1940-1951
133. Gallastegui N, Beck P, Arciniega M, Huber R, Hillebrand S, Groll M (2012) Hydroxyureas as noncovalent proteasome inhibitors. *Angew Chem Int Ed* 51: 247-249
134. Pandit B, Bhat UG, Gartel AL (2011) Proteasome inhibitory activity of thiazole antibiotics. *Cancer Biol Ther* 11: 43-47
135. Milacic V, Banerjee S, Landis-Piwowar KR, Sarkar FH, Majumdar AP, Dou QP (2008) Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 68: 7283-7292
136. Maity R, Sharma J, Jana NR (2010) Capsaicin induces apoptosis through ubiquitin-proteasome system dysfunction. *J Cell Biochem* 109: 933-942
137. Dou QP, Landis-Piwowar KR, Chen D, Huo C, Wan SB, Chan TH (2008) Green tea polyphenols as a natural tumour cell proteasome inhibitor. *Inflammopharmacology* 16: 208-212
138. Shah JJ, Kuhn DJ, Orlowski RZ (2009) Bortezomib and EGCG: no green tea for you? *Blood* 113: 5695-5696
139. Golden EB, Lam PY, Kardosh A, Gaffney KJ, Cadenas E, Louie SG, Petasis NA, Chen TC, Schönthal AH (2009) Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors. *Blood* 113: 5927-5937
140. Hewings DS, Flygare JA, Bogyo M, Wertz IE (2017) Activity-based probes for the ubiquitin conjugation-deconjugation machinery: new chemistries, new tools, and new insights. *FEBS J* 284: 1555-1576
141. Turnbull AP, Ioannidis S, Krajewski WW, Pinto-Fernandez A, Heride C, Martin ACL, Tonkin LM, Townsend EC, Buker SM, Lancia DR, Caravella JA, Toms AV, Charlton TM, Lahdenranta J, Wilker E, Follows BC, Evans NJ, Stead L, Alli C, Zarayskiy VV, Talbot AC, Buckmelter AJ, Wang M, McKinnon CL, Saab F, McGouran JF, Century H, Gersch M, Pittman MS, Marshall CG, Raynham TM, Simcox M, Stewart LMD, McLoughlin SB, Escobedo JA, Bair KW, Dinsmore CJ,

- Hammonds TR, Kim S, Urbé S, Clague MJ, Kessler BM, Komander D (2017) Molecular basis of USP7 inhibition by selective small-molecule inhibitors. *Nature* 550: 481-486
142. Kategaya L, Di Lello P, Rougé L, Pastor R, Clark KR, Drummond J, Kleinheinz T, Lin E, Upton JP, Prakash S, Heideker J, McClelland M, Ritorto M, Alessi DR, Trost M, Bainbridge TW, Kwok MCM, Ma TP, Stiffler Z, Brasher B, Tang Y, Jaishankar P, Hearn BR, Renslo AR, Arkin MR, Cohen F, Yu K, Peale F, Gnad F, Chang MT, Klijn C, Blackwood E, Martin SE, Forrest WF, Ernst JA, Ndubaku C, Wang X, Beresini MH, Tsui V, Schwerdtfeger C, Blake RA, Murray J, Maurer T, Wertz IE (2017) USP7 small-molecule inhibitors interfere with ubiquitin binding. *Nature* 550: 534-538
143. Seiberlich V, Goldbaum O, Zhukareva V, Richter-Landsberg C (2012) The small molecule inhibitor PR-619 of deubiquitinating enzymes affects the microtubule network and causes protein aggregate formation in neural cells: implications for neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1823: 2057-2068
144. Lupas A, Baumeister W (1998) The 20S proteasome. W: Peters J-M, Harris JR, Finley D (red), Ubiquitin and the Biology of the Cell, Plenum Press, New York, str. 127-146

Ubiquitin-proteasome pathway as a target for therapeutic strategies

Magdalena Staszczak[✉]

Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, 19 Akademicka St., 20-033 Lublin, Poland

[✉]e-mail: magdalena.staszczak@umcs.lublin.pl

Key words: proteasome, ubiquitin, proteasome inhibitors, inhibitors of ubiquitination/deubiquitination, cancer, pathogens

ABSTRACT

In *Eukaryota*, the majority of intracellular proteins are degraded by the ubiquitin-26S proteasome pathway. Through degradation of proteins tagged with polyubiquitin chains, the 26S proteasomes, multicatalytic proteolytic complexes, participate in regulation of key cellular processes such as cell cycle, proliferation and cell differentiation, apoptosis, transcription, signal transduction, morphogenesis, immune response, response to stress and to extracellular effectors, modulation of cell-surface receptors, antigen presentation, proteolysis of enzymes and regulatory proteins, and protein quality control in endoplasmic reticulum. Dysfunction of the ubiquitin-proteasome pathway is associated with many diseases, including cancer, neurodegeneration, autoimmune and inflammatory response, as well as infectious diseases. In recent years, besides proteasomes, the enzymes that drive ubiquitination and deubiquitination have entered clinical trials as potential therapeutic targets. Small molecular inhibitors against proteasomes have been discovered, as well as inhibitors of the ubiquitin cascade enzymes and deubiquitinating enzymes. Second generation inhibitors of proteasomes have been successfully approved for clinical application.