

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie**



**Ubiquitin-proteasomový systém u *Saccharomyces cerevisiae* a jeho úloha v dynamice proteinových agregátů**

The ubiquitin-proteasome system in *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the dynamics of protein aggregates

Bakalářská práce

**Renata Slabá**

Vedoucí práce: Ing. Jiří Hašek, CSc., MBÚ AV ČR

Praha, akademický rok 2008/2009

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů.

*Renata Slabá*  
Renata Slabá

Na prvním místě bych ráda poděkovala svému školiteli Ing. Jiřímu Haškovi, CSc. za vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Tomáši Groušlovi za pomoc při vyhledávání informací. Za pomoc a podporu děkuji také své rodině a přátelům.

# **Obsah**

<b>OBSAH .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>7</b>
<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2. PROTEASOM .....</b>	<b>10</b>
2.1 Stavba proteasomu.....	11
2.2 Lokalizace proteasomu .....	14
2.3 Proteolytická aktivita.....	16
2.4 Imunoproteasom .....	17
<b>3. UBIQUITIN .....</b>	<b>18</b>
3.1 Proces ubiquitinace .....	19
3.2 Degradační signál.....	21
3.3 Ubiquitinové receptory .....	22
3.4 Deubiquitinace.....	22
<b>4. AGREGACE PROTEINŮ.....</b>	<b>24</b>
4.1 Proteinové agregáty a inkluze .....	24
4.2 Agresom .....	26
4.3 Směrování proteinů do agresomu .....	27
4.4 Osud agregátů .....	29
4.5 Toxické působení agregátů .....	31
4.6 Protektivní úloha buněčných inkluzí.....	33
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>36</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>37</b>

## **Abstrakt**

Ubiquitin-proteasomový systém (UPS) je hlavní nelysosomální proteolytickou dráhou eukaryotických buněk. Hraje důležitou úlohu v regulaci řady buněčných procesů, jako jsou kontrola buněčného cyklu, genová transkripce a metabolický obrat proteinů. Pro degradaci většiny proteinů je nezbytná kovalentní vazba malého hydrofobního proteinu ubiquitinu. Ubiquitinace proteinových substrátů závisí na ubiquitin-aktiváčním enzymu (E1), ubiquitin-konjugačním enzymu (E2) a ubiquitin-protein ligáze (E2-E3 komplex). Polyubiquitinový řetězec je rozeznáván 19 S regulační částicí 26 S proteasomu. Zde je polyubiquitinový řetízek odstraněn pomocí deubiquitinačních enzymů (DUB) a molekuly ubiquitinu jsou recyklovány. Protein určený k degradaci je přemístěn do 20 S katalytického jádra proteasomu, kde je rozštěpen.

Proteasom je zodpovědný za odstranění mnoha nesprávně sbalených proteinů. Pokud však tento mechanismus, který kontroluje kvalitu proteinů, selže, proteiny mají tendenci se shlukovat a vytvářet stabilní ložiska zvaná inkluzní tělíska. Inkluzní tělíska jsou znakem řady stařeckých neurodegenerativních chorob. Jsou považována za patogenní. Tvorba inkluzních tělísek však ve skutečnosti snižuje cytotoxicitu vyvolanou proteinovými agregáty a může usnadnit jejich odstranění pomocí autofágie.

**Klíčová slova:** ubiquitin, proteasom, degradace proteinů, aggregace, inkluzní tělíska, kvasinky

## **Abstract**

The ubiquitin-proteasome system (UPS) is the major non-lysosomal proteolytic pathway in eukaryotic cells. It plays an important role in the regulation of many cellular processes like cell cycle control, gene transcription and protein turnover. For degradation of many proteins covalent conjugation of small hydrophobic polypeptide ubiquitin is necessary. Ubiquitination of protein substrates depends on ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzyme (E2) and ubiquitin-protein ligase (E2-E3 complex). Polyubiquitin chain is recognized by the 19 S regulatory particle of the 26 S proteasome. Here, polyubiquitin chain is removed by deubiquitinating enzymes (DUBs) and molecules of the ubiquitin are recycled. Protein destined to degradation is translocated to the 20 S catalytic core of the proteasome where it is digested.

The proteasome is responsible for disposal of many misfolded proteins. If this protein-quality control mechanism fails, proteins tend to aggregate and form stable deposits called inclusion bodies. Inclusion bodies are a hallmark of many age-related neurodegenerative diseases. They are thought to be pathogenic. But in fact inclusion body formation reduces cytotoxicity caused by protein aggregates and it can facilitate their clearance by autophagy.

**Keywords:** ubiquitin, proteasome, protein degradation, aggregation, inclusion bodies, yeast

## **Seznam použitých zkratek**

AAA ATPáza - ATPase asociated with various cellular ativities  
ANK1 - ankyrin-like repeat  
ATP - adenosintriphosphate  
CDC48 - cell division cycle 48  
Cys - cysteine  
DNA - deoxyribonucleic acid  
DUB - deubiquitinating enzyme  
Gly - glycin  
HDAC6 - histone deacetylase 6  
His - histidin  
Hsp - heat-shock protein  
ChT-L - chymotrypsin-like  
IFN-  $\gamma$  - interferon gamma  
IPOD - insoluble protein deposit  
IsoT - isopeptidase T  
JUNQ - juxtanuclear quality control compartment  
Lys - lysin  
MHC - major histocompatibility complex  
mRNA - messenger ribonucleic acid  
MTOC - microtubule organizing center  
p53 - protein 53  
PA28 - proteasome activator 28  
PA700 - proteasome activator 700  
PGPH - peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing  
PrP<sup>Sc</sup> - prion protein  
Pru - pleckstrin-like receptor for ubiquitin  
PSG - proteasome storage gSPB - spindle pole body  
TAP - transporter associated with antigen processing  
Thr - treonin  
T-L - trypsin-like

Uba - ubiquitin-activating enzyme

UBA doména - ubiquitin-associated domain

UBB+1 - ubiquitin B

Ubc - ubiquitin-conjugating enzyme

UBL doména - ubiquitin-like binding domain

UBP - ubiquitin specific processing protease

UIM - ubiquitin-interacting motif

UPS - ubiquitin-proteasome system

## 1. Úvod

Degradace je jednou z cest, jak regulovat množství proteinů v buňce a jak udržovat proteinovou homeostázu. Hlavním cytosolickým systémem, jenž zajišťuje štěpení proteinů, je proteasom. Proteasom ve spolupráci s ubiquitinovým systémem kontroluje poločas života řady proteinů. Substráty ubiquitin-proteasomové dráhy jsou špatně sbalené proteiny a důležité regulační proteiny s krátkou životností. Není divu, že poškození tohoto systému může být pro buňku fatální.

Selhání UPS vede k agregaci proteasomálních substrátů a proteinové agregáty funkci UPS dále zhoršují, což může ve výsledku vést až k apoptóze postižených buněk. S tvorbou proteinových agregátů a inkluzí, která často ústí v buněčnou smrt, se setkáváme mimo jiné i u neurodegenerativních chorob.

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* se používá jako modelový organismus pro objasnění buněčných a molekulárních pochodů v eukaryotických buňkách. Výjimkou není ani studium vztahu mezi proteinovou agregací, dysfunkcí UPS a cytotoxicitou. Ukázalo se, že řada mechanismů týkajících se agregace a tvorby inkluzních tělisek je evolučně konzervovaná od kvasinkových po savčí buňky. Poznatky získané při studiu kvasinek by tak bylo možné využít při hledání farmaceutických cílů v boji s neurodegenerativními chorobami.

## 2. Proteasom

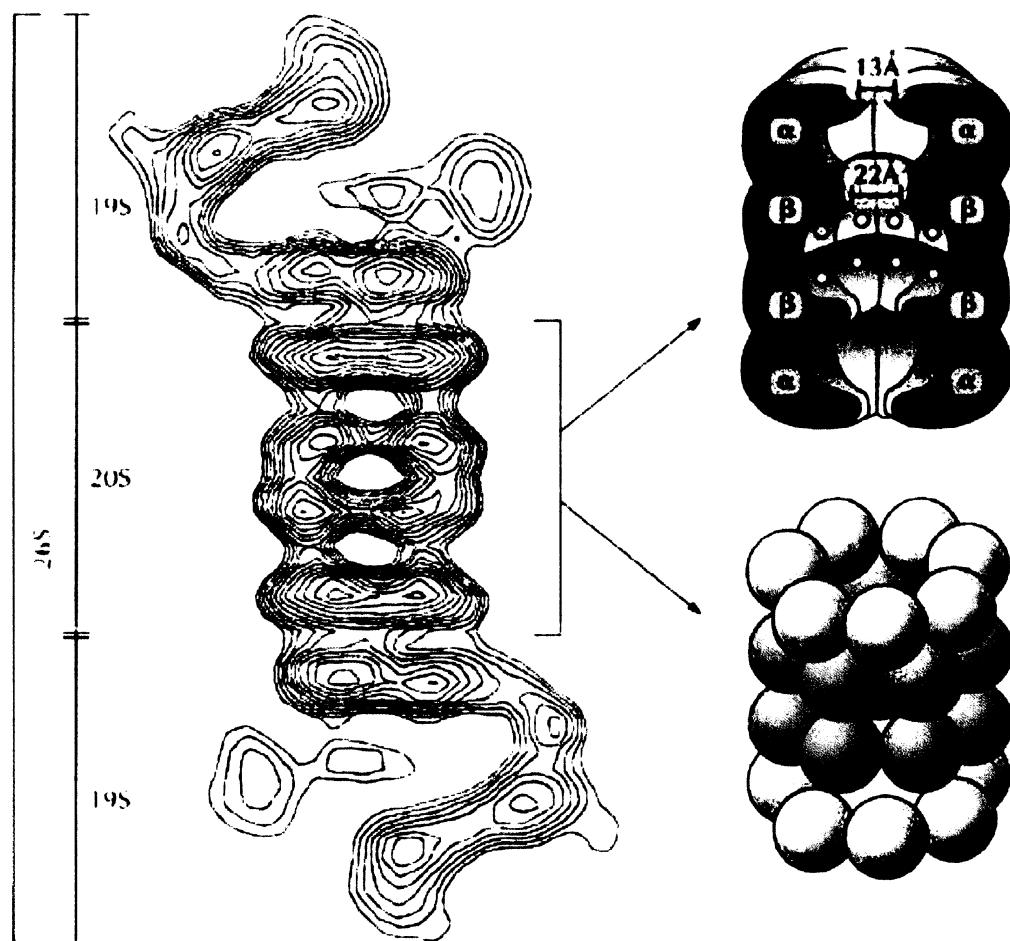
Proteasom představuje hlavní extralytosomální proteolytickou dráhu v eukaryotických buňkách. Je to vysoce uspořádaná proteinová soustava složená z minimálně 33 různých podjednotek sestavených do dvou subkomplexů, 20 S katalytického jádra a 19 S regulační částice, které dohromady tvoří 26 S holoenzym (viz obr. 1). Tento multikatalytický proteázový komplex provádí ubiquitin-dependentní (26 S) i ubiquitin-independentní (20 S) intracelulární degradaci proteinů. Samotná hydrolýza proteinů určených k degradaci není energeticky náročná a probíhá v katalytickém jádře proteasomu. Naopak 19 S částice vyžaduje energii ze štěpení ATP. Zajišťuje rozpoznávání ubiquitinovaných substrátů, rozbaluje je a přesouvá do centrální dutiny 20 S proteasomu.

Proteasom se nachází v jádře i v cytosolu, a to ve dvou hlavních formách, 20 S a 26 S. Tvoří 1 % buněčných proteinů. Podle studie Russell et al. (1999) je množství molekul proteasomu 15-30 tisíc na buňku.

Štěpení většiny buněčných proteinů u kvasinek je nevakuolární proces. Proteasom katalyzuje hydrolýzu intracelulárních proteinů, čímž kontroluje jejich poločas života. Degradace je jednou z cest jak regulovat množství cytosolických proteinů. Proteolýza hráje roli v regulaci mitotického cyklu, transkripce genů a metabolických drah. Pro tyto procesy je nezbytná rychlá degradace klíčových regulačních proteinů.

Substráty pro degradaci jsou proteiny s krátkou životností jako např. cykliny účastníci se regulace buněčného cyklu nebo transkripční faktory, dále proteiny s destabilizujícím N-koncem, nesprávně sbalené či poškozené. Buněčné proteiny s abnormální konformací jsou degradovány obzvláště rychle. V proteasomu končí též poměrně velká část nově syntetizovaných proteinů. Tyto proteiny se zhruba jednu hodinu po syntéze nacházejí ve fragilní periodě, kdy ještě nestačily zaujmout správnou finální konformaci. Jsou citlivější k oxidativnímu a termálnímu poškození, a tudíž jsou i náchylnější k degradaci vyvolané tímto stresem (Medicherla and Goldberg 2008). Kromě rozpustných proteinů cytosolu a jádra jsou v proteasomu štěpeny i špatně sbalené či poskládané proteiny syntetizované do endoplazmatického retikula. Takovéto translační produkty jsou translokovány do cytosolu a označeny pro okamžitou degradaci. Dalšími proteasomálními substráty mohou být proteiny cytoplasmatické membrány. U savců jsou v proteasomu degradovány proteiny s krátkou i dlouhou životností, zatímco u kvasinek pouze s krátkou. Proteiny s dlouhou životností, pokud tedy nejsou nějakým způsobem poškozené, jsou degradovány ve vakuole.

Většina proteinů potřebuje pro proteasomální degradaci značku v podobě polyubiquitinového řetízku. Není to ale pravidlem. Některé oxidované či rozbalené proteiny (bez sekundární struktury) ubiquitinový signál nevyžadují a jsou degradovány ubiquitin-a ATP-independentním způsobem samotným 20 S proteasomem bez účasti regulačního komplexu.



Obr. 1: **Stavba proteasomu** (převzato z Rubin and Finley 1995, upraveno)

## 2.1 Stavba proteasomu

Proteasom je vysoce konzervovaná struktura, která se skládá z několika komplexů. 20 S proteasom představuje katalytické jádro. V buňce se vyskytuje samostatně nebo s navázanými regulačními komplexy. Na jádro se může vázat jedna či dvě 19 S částice,

a vytvářet tak 26 S proteasom zodpovědný za ATP- a ubiquitin-dependentní degradaci proteinů. U savčích buněk se katalytické jádro může kombinovat s 11 S regulátorem a tvořit imunoproteasom, který hraje roli v sestřihu antigenů prezentovaných na MHC molekulách I. třídy.

Jádro proteasomu (20 S) představuje dutý centrální válec sestavený z 28 podjednotek ve čtyřech heptamerních kruzích. Kruhy jsou tvořeny dvěma typy podjednotek,  $\alpha$  a  $\beta$  (viz tab. 1). Každý ze dvou vnějších kruhů obsahuje 7  $\alpha$  podjednotek a vnitřní kruhy mají po 7  $\beta$  podjednotkách. 20 S proteasom je u kvasinek kódován 14 geny, 7 odlišných pro  $\alpha$  a 7 pro  $\beta$  podjednotky. Centrální oblast je tedy shodná pro všechny proteasomy v buňce. 20 S proteasom je cca 700 kDa velký komplex, jednotlivé podjednotky se svou velikostí pohybují v rozmezí 21-32 kDa. Barel měří 11 nm v průměru a jeho délka je 15 nm. Vstupní otvory do centrální dutiny 20 S proteasomu tvořené vnějšími kruhy jsou velmi úzké, v průměru mají 10-20 Å (shrnutu Orlowski and Wilk 2000). Centrální dutina obklopená dvěma vnitřními  $\beta$  kruhy je tedy oddělená od buněčného prostředí. Katalytická místa se nacházejí na  $\beta$  podjednotkách, ale ne na všech. Pouze tři z nich v každém vnitřním kruhu jsou proteolyticky aktivní a směřují do centrální komory proteasomu. Tyto tři typy  $\beta$  podjednotek jsou syntetizovány jako inaktivní prekurzory. Jejich prosekvence je odstraněna při dimerizaci  $\alpha\beta$  kruhových komplexů (Reits et al. 1997). Funkce zbylých  $\beta$  podjednotek zůstává zatím neznámá.  $\alpha$  podjednotky mají strukturní funkci, jsou důležité pro správné sestavení komplexu. Ačkoliv se  $\alpha$  podjednotky degradace přímo neúčastní, strukturní integrita je pro proteolytickou aktivitu proteasomu nezbytná. Přes  $\alpha$  podjednotky 20 S jádro interaguje s aktivátory proteasomu (19 S a 11 S) (shrnutu Orlowski and Wilk 2000).

Na konce 20 S proteasomu se mohou vázat jedna nebo dvě 19 S čepičky (PA700, proteasomový aktivátor 700). Tento regulační komplex je velký přibližně 700 kDa (Russell et al. 1999, shrnutu Orlowski and Wilk 2000). Role 19 S regulační částice je rozpoznávání polyubiquitinového řetězce a jeho odstranění ze substrátových proteinů, rozbalení proteinů určených k degradaci a jejich přemístění do 20 S válce. 19 S čepička má ATPázovou aktivitu a receptory pro rozpoznávání polyubiquitinového řetězce.

19 S regulátor je asymetrický komplex, který se skládá ze dvou subkomplexů, báze a zátky. Bázi tvoří šest ATPázových podjednotek, Rpt1-Rpt6, a čtyři bez ATPázové aktivity, Rpn1, Rpn2, Rpn10 a Rpn13. Zátna je složena z devíti podjednotek, Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12 a Sem1. Podjednotky Rpn5, 6, 8 a 9 vytvářejí nezávislý heterotetramerní subkomplex, podjednotky Rpn6, 9 a 12 jsou lokalizovány na okraji zátky. Rpn6 podjednotka

je nezbytná pro správné sestavení zátky. Když je funkční komplex sestaven, Rpn6 se uvolní a odkrývá aktivní místo na podjednotce Rpn11, která slouží jako deubiquitinační enzym ( $Zn^{2+}$  dependentní metaloproteáza). Ostatní podjednotky zátky katalytickou aktivitu nemají. Funkcí zátky 19 S komplexu je tedy deubiquitinace proteinových substrátů (Sharon et al. 2006).

Systematický název	Kvasinky	Člověk	Aktivita
$\alpha 1$	PRS2	Iota/PRS2	
$\alpha 2$	PRS4/Y7	C3	
$\alpha 3$	PRS5/Y13	C9	
$\alpha 4$	PRE6	C6/XAPC7	
$\alpha 5$	PUP2	ZETA	
$\alpha 6$	PRE5	C2(PROS-30)	
$\alpha 7$	PRS1	C8	
$\beta 1$	PRE3	Y/delta/	PGPH
$\beta 1-i$	-	LMP2-i	ChT-L
$\beta 2$	PUP1	Z	T-L
$\beta 2-i$	-	LMP10/MECL-1-i	T-L
$\beta 3$	PUP3	C10-II	
$\beta 4$	PRE1	C7-I	
$\beta 5$	PRE2	X/MB1	ChT-L
$\beta 5-i$	-	LMP7-i	ChT-L
$\beta 6$	PRS3	C5	
$\beta 7$	PRE4	N3	

Tab. 1: **Podjednotky 20 S proteasomu** (převzato z Orlowski and Wilk 2000, upraveno)

Otázkou je, jak jsou proteiny označené polyubiquitinovým řetízkem rozpoznávané. 19 S komplex obsahuje receptory, které takto značené proteiny váží. Jedním z receptorů je Rpn 10, cytosolický protein, který může fungovat jako podjednotka 19 S aktivátoru (Medicherla and Goldberg 2008). Rpn 10 má na svém C-konci UIM doménu (ubiquitin-interacting motif), na kterou se váže polyubiquitinový řetězec. Další podjednotkou 19 S regulačního komplexu sloužící jako polyubiquitinový receptor je Rpn 13. Na N-konci tohoto proteinu je Pru doména (pleckstrin-like receptor for ubiquitin) s velmi vysokou afinitou k ubiquitinu. Rpn 10 a Rpn 13 jsou nejdůležitější ubiquitinové receptory 26 S proteasomu.

Jak již bylo zmíněno, ATPázovou aktivitu vykazuje šest spojených podjednotek báze 19 S komplexu uspořádaných do kruhu. Tyto proteiny patří do rodiny AAA ATPáz (ATPase associated with various cellular activities), rozbalovacích enzymů (Thrower et al. 2000).

Energie z hydrolýzy ATP je využita na rozbalení proteinových substrátů, otevření kanálu do dutiny a přesun rozbalených proteinů do katalytického jádra, kde jsou degradovány. Dalším členem AAA rodiny hexamerních ATPáz je protein CDC48. Tento extraproteasomální chaperon napomáhá degradaci rozbalováním polyubiquitinovaných proteinů (Thrower et al. 2000, Medicherla and Goldberg 2008).

Jednou z funkcí proteasomu v savčích buňkách je štěpení antigenních peptidů. 20 S proteasom v kombinaci s 11 S regulační částicí (PA28) vytváří imunoproteasom. U kvasinek zatím nebyl objeven žádny homolog PA28. V imunoproteasomu dochází k nahrazení tří typů katalytických  $\beta$  podjednotek 20 S jádra. Místo X ( $\beta$ 5), Y ( $\beta$ 1) a Z ( $\beta$ 2) podjednotek obsahuje podjednotky LMP7 ( $\beta$ 5-i), LMP2 ( $\beta$ 1-i) a LMP10/MECL-1 ( $\beta$ 2-i). Exprese PA28 regulátoru a těchto podjednotek je stejně jako jejich zabudovávání do proteasomu indukováno interferonem  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) (Reits et al. 1997, shrnuto Orlowski and Wilk 2000).

## 2.2 Lokalizace proteasomu

Proteasom se nachází v jádře i v cytosolu eukaryotických buněk. Je to velmi pohyblivá struktura a jeho rozmístění v buňce se mění. V proliferujících kvasinkových buňkách je nejpočetnější formou 26 S proteasom, která odpovídá mimo jiné za degradaci polyubiquitinovaných proteinů s krátkým poločasem rozpadu zahrnutých v kontrole buněčného cyklu. Na rozdíl od mnohobuněčných organismů je u kvasinek v exponenciální fázi růstu většina proteasomů lokalizována v jádře (Laporte et al. 2008), kde jsou v průběhu celého cyklu, u buněk s pupenem, bez pupenu i u buněk mitotických (Russell et al. 1999). V těchto buňkách můžeme proteasom najít po celém jádře kromě jadérka. Část proteasomů je též rozptýlena v cytosolu. Tyto proteolytické komplexy se nacházejí u okraje jádra na vnitřní straně jaderné membrány (Wilkinson et al. 1998). Tato studie byla prováděna na kvasinkách *Schizosaccharomyces pombe*, které nepučí, ale dělí se, a na rozdíl od *Saccharomyces cerevisiae* se při mitóze jejich jaderný obal nerozpadá. Během mitózy těchto buněk proteasomy zůstávají u jaderného okraje. Při oddálení vznikajících jader tvoří proteasomy stopu mezi oběma novými jádry a po čase zůstávají jako tečka přesně uprostřed mezi jádry. Tato tečka by mohla představovat zbytkový „pool“ proteasomů, který zůstává přítomen po rozdelení jaderných obalů. Při meióze proteasomy disociují od okraje a rozprostírají se po celém jádře mimo jadérko. V první profázi mají jádra protažený tvar. Na opačném konci

jádra než je konec vedoucí se objevuje tečka, kde je koncentrace proteasomů vyšší než jinde v jádře. Během meiózy I je rozložení proteasomů podobné jako při mitóze (v pozdní anafázi se tvoří tečka mezi jádry), ale při meióze II dochází k přesunu proteasomů z celého jádra do omezené oblasti uprostřed jádra mezi separující se chromozomy. Na konci meiózy z této oblasti zmizejí a opět se rozprostírají po celém jádře, dokud se nevytvorí spory. Poté se přesunou opět na okraj jádra. Rozmístění proteasomů na jaderné periferii není kontinuální, ale přerušované. Je možné, že přemístění během meiózy II hraje kontrolní roli v procesu tvorby spor (Wilkinson et al. 1998).

Po vstupu buňky do klidové fáze klesá proteolytická aktivita, ale množství proteasomových podjednotek se nesnižuje. V nedělících se buňkách *Saccharomyces cerevisiae* dochází k přemístění proteasomů. Když se buňky přestanou dělit a přejdou do klidové fáze, proteasomy se začnou přesouvat na okraj jádra k jaderné membráně. Vytvářejí buď ostré nepohyblivé tečky blízko jaderného okraje, anebo, což je případ většiny buněk, se nacházejí v cytosolu jako jedna nebo dvě granule, které jsou vysoce pohyblivé. Tyto struktury se označují jako PSG (proteasome storage granules). V jedné PSG se společně nacházejí podjednotky 20 S i 19 S subkomplexu, za inaktivaci proteasomu tedy není zodpovědná odlišná lokalizace proteasomových podjednotek. Rychlosť pohybu granulí postupem času klesá, ale zvyšuje se množství proteasomových podjednotek uložených v PSG. PSG slouží jako cytoplasmatické rezervy a po ukončení klidové fáze odtud mohou být tyto podjednotky rychle mobilizovány. Po výstupu z klidové fáze buňky potřebují degradovat poškozené proteiny a syntéza nových podjednotek proteasomu by způsobila zdržení návratu do buněčného cyklu, proto nejsou proteasomy v klidu degradovány. Po ukončení klidové fáze se proteasomy přesunují opět na jaderný okraj a následně dovnitř jádra. U kvasinek *Schizosaccharomyces pombe* dochází ke stejnemu přemístění proteasomu při vstupu do klidové fáze či po návratu do dělení (Laporte et al. 2008).

U savčích buněk je situace poněkud odlišná. Proteasomy se nacházejí v cytosolu, v jádře kromě jadérka a asociované s membránou endoplasmatického retikula. Proteasomy jsou vysoce mobilní struktury, volně difundují cytoplasmou nebo jádrem ATP-nezávislým způsobem. Jaderná membrána tvoří selektivní bariéru, která pohyb proteasomů omezuje. Ukázalo se, že propouští proteasomy z cytosolu do jádra, ale obráceně ne. Tento způsob přenosu je velmi pomalý. Velikost jaderného póru (260 Å v průměru) dovoluje proteasomu projít, aniž by byla nějakým způsobem poškozena jeho struktura. Velikost 20 S jádra u kvasinek se udává 113 x 114 Å (Reits et al. 1997, Wilkinson et al. 1998). Další možnost vstupu dovnitř jádra je během buněčného dělení. Při mitóze se rozpouští jaderný obal

a proteasomy mohou bez omezení cestovat skrz celou dělící se buňku. Po rozdelení se jaderná membrána sestaví a opět brání výměně proteasomů. Jelikož se tyto proteolytické komplexy pohybují velice rychle, je pravděpodobné, že proteiny určené k degradaci nepotřebují žádný signál pro nasměrování do proteasomu, protože dříve nebo později dojde ke kolizi proteasomu a jeho substrátu (Reits et al. 1997).

## 2.3 Proteolytická aktivita

Proteasom je multikatalytický proteázový komplex. Centrální jádro proteasomu vykazuje tři klasické enzymatické aktivity: chymotrypsinovou (ChT-L, chymotrypsin-like), trypsinovou (T-L, trypsin-like) a peptidylglutamylpeptidhydrolyzující (PGPH) aktivitu. Tyto katalytické aktivity jsou spojené s různými podjednotkami 20 S válce. Proteolyticky aktivní jsou tři  $\beta$  podjednotky v každém vnitřním kruhu. Pro správnou funkci je nezbytná přítomnost threoninu na N-konci těchto podjednotek. Thr 1 obsahuje nukleofilní hydroxylovou skupinu, proto proteasom řadíme do třídy N-terminální nukleofilní hydrolázy. N-koncový threonin je nezbytný pro degradaci, ale není dostačující. Další nukleofilní skupina, která hraje roli ve fungování proteolytické aktivity, je na lysinovém zbytku na pozici 33 (Lys 33). Čtyři  $\beta$  podjednotky, Pre3 ( $\beta$ 1), Pup1 ( $\beta$ 2), Pre2 ( $\beta$ 5) a Pre4 ( $\beta$ 7) obsahují na svém N-konci treonin. Funkční jsou pouze  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 a  $\beta$ 5, protože katalýzy se kromě N-terminálního Thr účastní ještě Lys 33. Katalyticky aktivní podjednotky jsou syntetizovány jako propeptidy s prodlouženým řetězcem na N-konci, který je autokatalyticky odštěpen mezi Thr 1 a posledním Gly prosekvence po té, co dojde ke spojení podjednotek proteasomového jádra. Thr 1 je důležitý pro samotný sestřih.

Nejdůležitější aktivitou v proteasomu je ChT-L. Je též ze všech tří nejvíce citlivá k inhibitorům, které se váží na OH skupinu Thr. Nachází se na podjednotce  $\beta$ 5 (Pre2, X u savců, LMP7 u imunoproteasomu). ChT-L aktivitu vykazuje též podjednotka imunoproteasomu LMP2. Podjednotky s touto aktivitou štěpí polypeptidy za hydrofobními aminokyselinami. Další enzymatickou aktivitou je T-L na podjednotce  $\beta$ 2 (Pup1, Z, MECL-1), která zajišťuje štěpení proteinů za argininem. Poslední aktivitou jádra proteasomu je PGPH, kdy jsou substráty štěpeny za glutamátem. Je lokalizována na podjednotce  $\beta$ 1 (Pre3, Y). V imunoproteasomu tuto aktivitu nenaalezneme, protože podjednotka LMP2, která nahrazuje Pre3, má aktivitu ChT-L.

Pro správnou funkci proteasomu jsou potřeba i další podjednotky, které se sice samy neúčastní katalytického procesu, ale ovlivňují aktivní podjednotky tím, že s nimi interagují. Na T-L aktivitě se tedy kromě Pup1 podílí i  $\beta$ 3 (Pup3, 10C-II), na ChT-L  $\beta$ 4 (Pre1, C7) a na PGPH  $\beta$ 7 (Pre4, N3) (shrnutu Orlowski and Wilk 2000).

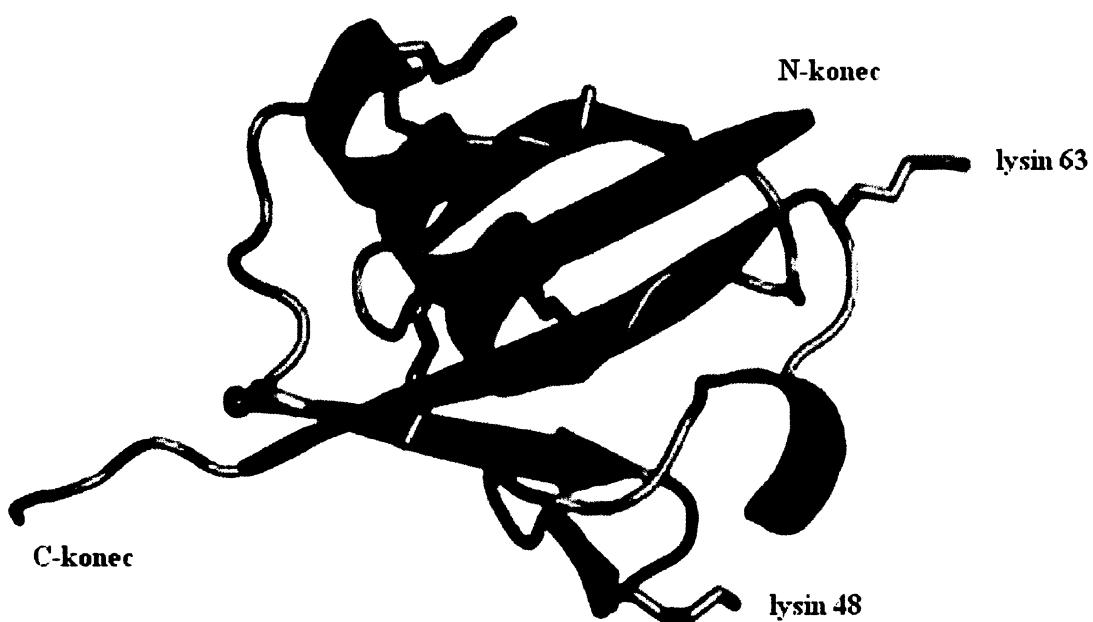
## 2.4 Imunoproteasom

Jak již bylo zmíněno dříve, v savčích buňkách ovlivněných IFN- $\gamma$  může dojít k záměně šesti katalytických  $\beta$  podjednotek za jiné, k 20 S jádru se připojí PA28 (11 S regulační částice) a vytváří se imunoproteasom. Jeho funkcí je generovat peptidy prezentované na MHC molekulách I. třídy imunitních buněk. Dvě nové  $\beta$  podjednotky imunoproteasomu jsou kódovány přímo v MHC lokusu a jejich exprese je indukována IFN- $\gamma$ . Výměna podjednotek nemá vliv na lokalizaci proteasomu v buňce, ale dochází ke změně proteolytické specificity způsobem, který přispívá k tvorbě peptidových fragmentů, jež se mohou vázat na MHC I molekuly. Imunoproteasom nevykazuje PGPH aktivitu, ale je u něj zvýšena aktivita ChT-L a T-L. Roli v procesu tvorby antigenních peptidů může hrát asociace proteasomu s membránou endoplasmatického retikula, kdy uvolňované peptidy jdou přímo k TAP transportéru (transporter associated with antigen processing) v membráně a jsou translokovány do lumen endoplasmatického retikula, kde se váží na MHC I molekuly.

### 3. Ubiquitin

Většina proteinů určených k degradaci v proteasomu musí být nějakým způsobem označena. Degradační signál představuje kovalentně navázaný ubiquitinový řetězec. Tato značka není nezbytně nutná, např. oxidované proteiny zřejmě ubiquitinaci nevyžadují. Tyto proteiny jsou ale rozpoznávány a degradovány 20 S proteasomem, nikoli 26 S (Shringarpure et al. 2003).

Ubiquitin (viz obr. 2) je malý vysoce konzervovaný polypeptid tvořený 76 aminokyselinami. Lidský a kvasinkový ubiquitin se liší pouze ve třech aminokyselinových zbytcích. Je také velmi stabilní, nepodléhá denaturaci způsobené teplem nebo změnou pH. Nachází se ve všech eukaryotických buňkách buď volný ve formě monomerů či polyubiquitinových řetízků nebo kovalentně vázaný na proteinové substráty. Posttranslační modifikace navázáním ubiquitinu mění vlastnosti označených proteinů, mění jejich povrch, stabilitu, aktivitu i schopnost interagovat s dalšími proteiny. Takto modifikované proteiny končí v proteasomu.



Obr. 2: Molekula ubiquitinu (převzato z <http://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin>, upraveno)

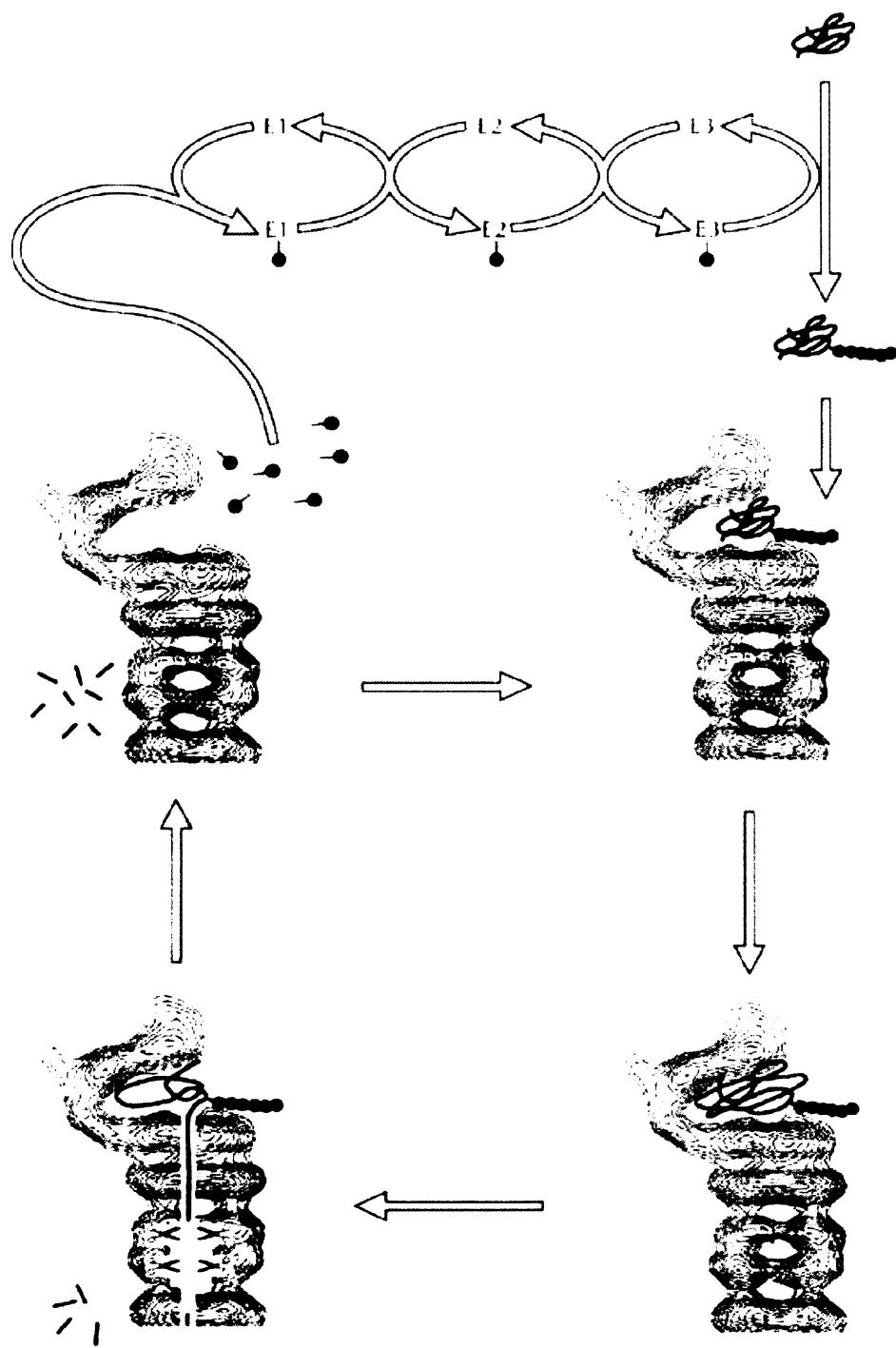
### 3.1 Proces ubiquitinace

Ubiquitinace proteinů je reverzibilní, deubiquitinační enzymy značku odštěpí a molekuly ubiquitinu jsou recyklovány. Proces navázání ubiquitinu na substrát probíhá ve třech krocích a vyžaduje tři odlišné trídy enzymů, E1 (ubiquitin-aktivaciční enzym, Uba), E2 (ubiquitin-konjugační enzym, Ubc) a E3 (enzym rozpoznávající proteinové substráty). E2 a E3 enzymy bývají spojeny a vytváří E2-E3 komplex označovaný jako ubiquitin-ligáza.

Prvním krokem procesu je ATP-dependentní aktivace C-konce ubiquitinu a je katalyzován E1 enzymem. Mezi reaktivním Cys zbytkem E1 a C-koncem ubiquitinu vzniká thiolesterová vazba. Ve druhém kroku je aktivovaný ubiquitin přenesen na Cys E2 enzymu. E3 se váže na specifický degradační signál cílového proteinu. Ubiquitin-konjugační enzym s navázaným ubiquitinem se dostane do blízkosti substrátu, čímž je umožněn třetí krok, přenos ubiquitinu na Lys proteinu určeného k degradaci (viz obr. 3). Ubiquitin je k proteinu vázán izopeptidovou vazbou mezi COOH skupinou C-koncového Gly ubiquitinu (Gly 76) a  $\epsilon$ -aminoskupinou Lys substrátu. Pokud proteinový řetězec neobsahuje žádný Lys zbytek, na který by se mohl ubiquitin navázat, může se vytvořit klasická peptidová vazba mezi C-koncem ubiquitinu a N-koncem proteinu. Tento proces proběhne několikrát dokola. Každá další molekula ubiquitinu v polyubiquitinovém řetízku se svým C-koncem váže na Lys předcházejícího ubiquitinu.

Přidání polyubiquitinového řetízku na substrát zahrnuje dva kroky s odlišnými požadavky. Zdá se, že jeden ubiquitin-konjugační enzym není schopen navázat první molekulu ubiquitinu a zároveň pak řetězec prodlužovat. Existují tedy dvě odlišné trídy E2 enzymů. Jedna provádí monoubiquitinaci. Takové enzymy postrádají specifitu ke konkrétnímu Lys zbytku, nerozlišují mezi ubiquitinem a jinými proteiny, proto by při elongaci mohly tvořit ubiquitinové řetězce s nevhodnou topologií nebo řetězce větvené. Druhá třída, která má na starosti elongaci, je naopak velmi specifická. Zajišťuje, že ubiquitin bude navázán pouze na jeden určitý Lys na předcházející molekule ubiquitinu a žádný jiný. Přidání polyubiquitinového řetízku je závislé na přítomnosti obou E2 enzymů, E3 enzym může zůstat stejný nebo se měnit spolu s E2 (Windheim et al. 2008).

Existuje mnoho izoforů E2 a E3 enzymů s různou specifitou. Jejich vzájemným kombinováním se vytváří spektrum ubiquitin ligáz, jež rozeznávají různé degradační signály. Výsledkem je řada ubiquitinačních druhů s vysokou substrátovou specifitou a širokým spektrem ubiquitinace.



Obr. 3: Proces ubiquitinace a degradace v proteasomu (převzato z Rubin and Finley 1995, upraveno)

### 3.2 Degradační signál

Na povrchu špatně sbalených nebo denaturovaných proteinů jsou vystavovány neobvyklé sekvence, které jsou rozeznávány E3 enzymy. Degradační signál může obsahovat poškozené aminokyseliny nebo sekvence, jež jsou za normálních okolností schované uvnitř proteinu (např. hydrofobní oblasti). Degradační signál se může vytvářet i na proteinech správně sbalených např. fosforylací určitého místa či disociací proteinové podjednotky. Další možností vzniku degradačního signálu je proteolytické štěpení peptidové vazby za vzniku destabilizujícího N-konce. Dle N-koncového pravidla aminokyselina na N-konci proteinu určuje poločas jeho života. Některé aminokyseliny protein stabilizují, jiné jsou naopak destabilizující, a právě tyto jsou rozeznávány ubiquitin-ligázou.

Ubiquitinový signál hraje roli v řadě buněčných procesů, nejdůležitější je jeho funkce v obratu proteinů, kdy polyubiquitinový řetězec označuje proteiny k degradaci v 26 S proteasomu. Ovlivňuje ale i neproteolytické procesy. Účastní se např. aktivace enzymů, transkripčních regulátorů, transdukce signálů, endocytózy, DNA reparace nebo vezikulárního transportu. Význam polyubiquitinového signálu závisí na způsobu spojení jednotlivých molekul v řetězci a na jeho délce. Molekula ubiquitinu obsahuje sedm lysinových zbytků a zdá se, že u kvasinek mohou být pro tvorbu izopeptidového řetězce použity všechny (Windheim et al. 2008). Jsou to Lys v pozicích 6, 11, 27, 29, 33, 48 a 63 (Olzmann et al. 2007, citováno z Pickart and Fushman 2004). Řetězce spojené vazbou Gly 76-Lys 48 hrají roli ve směrování ubiquitinovaného substrátu do 26 S proteasomu. Řetězce, kdy se na vazbě podílí Lys 63, fungují např. v signální transdukci, postreplikační opravě DNA nebo endocytóze. Připojení jedné molekuly ubiquitinu na substrát může vést k jeho degradaci ve vakuole (u živočišných buněk v lysozomu).

Jak již bylo zmíněno, ubiquitinové molekuly v řetízku navázaném na proteinech určených k degradaci ve 26 S proteasomu jsou spojené přes lysin na pozici 48. Afinita polyubiquitinového řetězce k proteasomu je závislá na jeho délce. Minimálním signálem jsou čtyři spojené molekuly ubiquitinu. S rostoucí délkou se afinita zvyšuje. Rozeznán může být ubiquitinový tetramer Ub<sub>4</sub> v jakékoli pozici v řetězci. Delší řetězce mají tedy vyšší afinitu, protože obsahují více možných tetramerů, které se mohou vázat na receptory 19 S subkomplexu. V experimentu s chimerními ubiquitinovými tetramery bylo zjištěno, že čtyři molekuly v Ub<sub>4</sub> signálu nejsou rovnocenné. Každý ubiquitin v tetrameru s proteasem interaguje jinak, a Ub<sub>4</sub> signál proto nemůže být dále dělen (Thrower et al. 2000).

### **3.3 Ubiquitinové receptory**

Výsledný polyubiquitinový přívěsek je rozpoznáván specifickými receptory 26 S proteasomu, následně je od proteinu odštěpen a protein podléhá degradaci.

Proteasom obsahuje minimálně dva ubiquitinové receptory přímo zabudované v 19 S regulační částici. Jsou jimi Rpn10 a Rpn13 podjednotky báze 19 S proteasomu (Sharon et al. 2006). Tyto receptory mají ve své struktuře oblasti odpovědné za schopnost vázat polyubiquitinový řetězec. U Rpn10 podjednotky to je UIM (ubiquitin-interacting motif) a u Rpn13 Prů doména (pleckstrin-like receptor for ubiquitin). Kromě těchto dvou vnitřních ubiquitinových receptorů existují ještě vnější receptory Rad23, Dsk2 a Ddi1. Ve svých strukturách obsahují UBL doménu (ubiquitin-like binding domain) a UBA doménu (ubiquitin-associated domain), které zajišťují vazbu ubiquitinové značky. Zprostředkovávají kontakt s proteasomem, a dovolují tak těmto proteinům fungovat jako vnější ubiquitinové receptory (Saeki and Tanaka 2008).

### **3.4 Deubiquitinace**

Ubiquitinace je reverzibilní. Po vazbě substrátu na proteasom dochází k odstranění ubiquitinového signálu a k jeho recyklaci (viz obr. 3). Tento proces zajišťují specializované protézy, deubiquitinační enzymy (DUB), které katalyzují hydrolyzu vazby mezi Gly 76 ubiquitinu a Lys substrátu či mezi jednotlivými ubiquitinovými molekulami. Existuje několik konzervovaných rodin DUB enzymů, z nichž největší je třída UBP (ubiquitin specific processing protease). Pro enzymy této rodiny jsou charakteristické krátké konzervativní sekvence, cysteinové a histidinové boxy, které osahují vysoce konzervované Cys a His zbytky důležité pro katalytickou aktivitu UBP enzymů.

Některé deubiquitinační enzymy jsou přímo součástí proteasomu jako např. Rpn11 nebo Uch2 (lidským homologem je Uch37). Jiné jsou s proteasomem spojené volněji, např. Doa4 (Ubp4), Ubp6 (lidský Usp14). Enzymy, které nejsou integrálními podjednotkami proteasomu, obsahují ve své struktuře UBL doménu, jež vazbu na tento multikatalytický komplex umožňuje. Ubp6 a jeho funkční homolog Usp14 jsou v rodině UBP enzymů zvláštní tím, že jsou aktivovány až po vazbě k proteasomu (Hu et al. 2005). Asociace DUB enzymů s 26 S proteasomem hraje roli při časovém sladění deubiquitinace a degradace proteinových

substrátů. Deubiquitinační enzymy jsou zodpovědné za uvolňování polyubiquitinového řetězce z označených proteinů. V dělících se kvasinkách *Schizosaccharomyces pombe* je hlavním DUB enzymem Uch2, Ubp6 má roli spíše v regulaci aktivity 26 S proteasomu. U pučících kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* nebyl homolog Uch2 enzymu nalezen a hlavními DUB enzymy jsou zde Ubp6 a Rpn11 (Stone et al. 2004).

Při deubiquitinaci jsou uvolněny polyubiquitinové řetízky, které je potřeba rozložit na jednotlivé molekuly ubiquitinu. Enzymem zajišťujícím štěpení takovýchto neukotvených polyubiquitinových řetězců je Ubp14 (homolog savčí isopeptidázy T, IsoT) z rodiny UBP. Volné ubiquitinové řetězce vznikají při odstraňování ubiquitinu ze substrátu, touto cestou vznikají tetramery nebo delší oligomerní řetězce. Mohou být ale též syntetizovány *de novo*, převážně dimery a trimery. Ubp14 i IsoT štěpí řetězce od volného C-konce, a předchází tak jejich akumulaci v buňce. Pokud je enzym nefunkční, dochází k hromadění neukotvených řetězců, které se mohou vázat na proteasomové receptory a bránit vazbě ubiquitinovaných proteinů, které mají být degradovány. Vysoké hladiny nerozložených ubiquitinových řetězců mohou inhibovat proteasom-dependentní proteolýzu (Amerik et al. 1997). Akumulace oligo- a polyubiquitinových řetězců ale neznamená inhibici štěpení všech proteinů. Záleží na konkrétním substrátu. Proteasomální degradace některých proteinů není v buňkách s defektním Ubp14 nijak ovlivněna (Eisele et al. 2006).

Některé enzymy štěpí ubiquitinový řetízek od distálního N-konce, čímž mohou degradaci regulovat. Pokud totiž izopeptidáza odštěpí ubiquitinový řetízek dříve, než je zahájena degradace proteinu, substrátový protein ztrácí afinitu k proteasomu a je uvolněn (Thrower et al. 2000). Ukázalo se, že jedním z enzymů, který upřednostňuje zkracování polyubiquitinových řetězců od distálního konce, je lidský Usp14 (homolog kvasinkového Ubp6) (Hu et al. 2005).

## 4. Agregace proteinů

Funkční UPS (ubiquitin-proteasomový systém) je důležitý pro udržení proteinové homeostáze. Při balení nově nasyntetizovaného proteinu získává lineární řetězec aminokyselin jedinečnou trojrozměrnou strukturu. Protein se snaží najít svou nativní konformaci s nejvhodnějším energetickým stavem. Tomuto procesu v buňce pomáhají molekulární chaperony bránící nesprávnému sbalení či poskládání. Nicméně se může stát, že protein zaujme konformaci stabilní, ale nesprávnou a nefunkční. Mohou za to genetické mutace, chyby v transkripci, sestřihu mRNA nebo v translaci. Svoji roli hrají i vnější faktory jako oxidační stres související s aerobním životem buňky. Proteiny rovněž denaturují tepelný či osmotický stres. Proto se v buňce nachází řada špatně sbalených proteinů, které jsou substrátem pro proteasomální degradaci.

Aberantní proteiny na svém povrchu vystavují sekvence, které by za normálních okolností byly schované uvnitř struktury proteinu a které jim umožňují tvořit nepřirozené vazby, vzájemně interagovat a utvářet stabilní shluky. Ubiquitin-proteasomový systém má za úkol takovéto aberantní proteiny degradovat. Pokud je ale tato proteolytická dráha poškozena a její funkce je snížena, nebo inhibována, anebo pokud mutantní proteiny vznikají ve vysokém množství a degradační kapacita proteasomu je překročena, proteiny se shlukují.

### 4.1 Proteinové agregáty a inkluze

Dysfunkce proteasomu tedy může vést k agregaci proteasomových substrátů, tím spíš, že těmito substráty jsou často aberantní proteiny náchylné ke shlukování. Například proteotoxický stres vyvolaný tepelným šokem poškozuje ubiquitin-proteasomový systém. Vytvářejí se dva typy agregátů. Jedním typem jsou mobilní solubilní agregáty, které se rozpouštějí po obnovení funkce proteasomu, protože jsou z nich proteiny odbourávány. Druhý typ představují velké nepohyblivé shluky. Ty bývají nerozpustné a přetrvávají v buňce i poté, co je zdroj proteotoxického stresu odstraněn a UPS je zcela funkční (Salomons et al. 2009).

Při selhání UPS jakožto jednoho z mechanismů zodpovědných za kontrolu kvality proteinů se polypeptidy shlukují a mohou v buňce i mimo ni vytvářet stabilní ložiska agregovaných proteinů (inkluze, inkluzní tělíska) (Johnston et al. 1998, Kaganovich et al. 2008, Salomons et al. 2009). Většinou se objevuje jedno nebo několik málo inkluzních tělisek

na buňku. Vznikají různé typy bezmembránových inkluze, které se odlišují svými vlastnostmi, lokalizací či mechanismem vzniku. Tvorba inkluzních tělisek není pouze náhodné nahromadění poškozených polypeptidů, ale organizovaný aktivní proces. Kromě agregovaných proteinů se v inkluzích nachází i molekulární chaperony (např. Hsp70) a složky UPS (ubiquitin, 19 S i 20 S proteasom) (shrnuto Kopito 2000), což může přispívat k jejich rozpouštění. Inkluze by tak mohly představovat proteolytická centra.

Špatně sbalené proteiny se hromadí ve viditelných intracelulárních inkluzních těliskách. Rozdelení mezi různé inkluze závisí na řadě faktorů, mimo jiné na jejich rozpustnosti a stavu ubiquitinace. Dle studie Kaganovich et al. (2008) jsou potenciálně toxické polypeptidy náchylné k agregaci rozdeleny do dvou definovaných inkluzí. Jedné v blízkosti jádra, JUNQ (juxtanuclear quality control compartment) a druhé zvané IPOD (insoluble protein deposit) na periferii buňky v blízkosti vakuoly. Ve stresovaných buňkách se juxtanukleární inkluze vytváří dříve a je běžnější i za normálních podmínek. Pokud stresové podmínky přetrvávají a dochází k inhibici proteasomu, vytváří se druhé perivakuolární inkluzní tělisko na okraji buňky. I toto ale může být vytvořeno v nestresových podmínkách a za přítomnosti funkčního proteasomového systému. Záleží na typu substrátových proteinů, kam špatně sbalené polypeptidy půjdou. Amyloidogenní proteiny, jako např. priony nebo huntingtin (způsobující Huntingtonovu chorobu), putují do perivakuolární inkluze, a to i bez působení stresu. V juxtanukleární inkluzi se hromadí především rozpustné proteasomové substráty. Značná část těchto proteinů je solubilní a může volně přecházet mezi inkluzním těliskem a cytosolem. Proteiny agregované v periferní perivakuolární inkluzi nemohou difundovat a vyměňovat se se zásobami v cytosolu, jsou to nerozpustné proteasomové substráty a amyloidogenní proteiny.

Solubilní nesprávně sbalené proteiny způsobují redistribuci 26 S proteasomů v buňce. Proteasomy jsou odvedeny do JUNQ, nekolokalizují však s IPOD. Ze zvýšené koncentrace proteasomů v juxtanukleární inkluzi je možné předpokládat, že tento kompartment hraje roli v degradaci aberantních proteinů (Kaganovich et al. 2008).

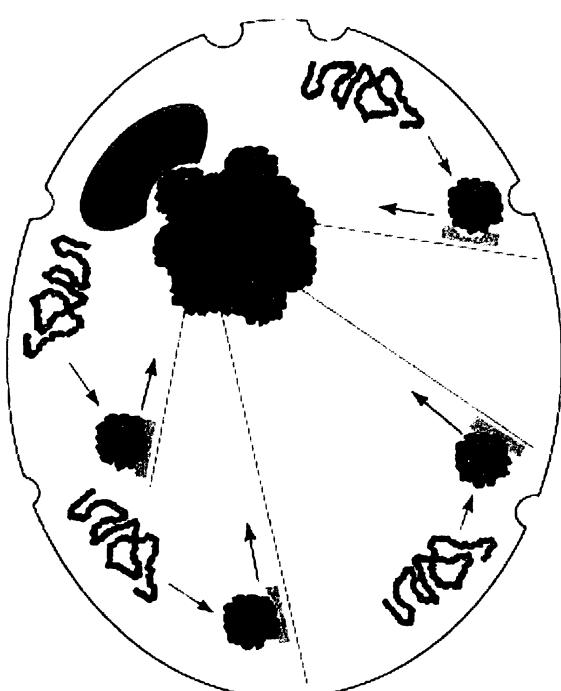
Pro udržení rozpustnosti špatně sbalených polypeptidů je důležitá ubiquitinace. Ubiquitin-dependentní substráty pro svou degradaci v proteasomu připojení ubiquitinu vyžadují. Pokud je ale ubiquitinový systém poškozen, tyto proteiny se stávají nerozpustnými a místo v JUNQ se shromažďují v IPOD inkluzi, a to i za normálních podmínek a absence inhibice proteasomu. A naopak, polyubiquitinace proteinů se sklonem k agregaci, které se akumulují v periferní perivakuolární inkluzi, je dostačující pro jejich přesměrování a uložení

v JUNQ (Kaganovich et al. 2008). Tento mechanismus rozdelení poškozených proteinů mezi JUNQ a IPOD inkluze je konzervován od kvasinek po savčí buňky.

## 4.2 Agresom

Dalším typem intracelulární inkluze konzervované v evoluci je agresom. Agresom představuje obecnou odpověď buňky na přítomnost nedegradovatelných nebo pomalu degradovaných proteinových agregátů (Johnston et al. 1998). Nesprávně sbalené proteiny se shlukují do malých agregátů, které jsou rozptýlené v cytosolu. Když je proteasom inhibován, nebo když dojde k překročení jeho kapacity, agregáty se slučují do jedné stabilní inkluze. Je to tedy agregát složený z agregátů (viz obr. 4). Agresom vzniká v juxtanukleární oblasti, ruší

obrys jaderného obalu a vytváří v něm důlek, ve kterém je umístěný. Charakteristickým rysem agresomu je, že kolokalizuje s MTOC (microtubule organizing center, u kvasinek nazývané spindle pole body, SPB, u savčích buněk centrosom). Tvorba agresomu je závislá na mikrotubulech. Malé agregáty jsou do SPB oblasti dopravované retrográdním transportem po mikrotubulech prostřednictvím molekulového motoru dyneinu (viz obr. 4). Po použití inhibitorů polymerizace mikrotubulů (např. nokodazolu, benomylu) se



Obr. 4: Agresom – tvorba a lokalizace (převzato z Kopito 2000, upraveno)

agresom netvoří a agregáty zůstávají rozprostřené po cytosolu. Na již vytvořené agresomy ale depolymerizace mikrotubulů žádný vliv nemá (Johnston et al. 1998, Zaarur et al. 2008, Wang et al. 2009).

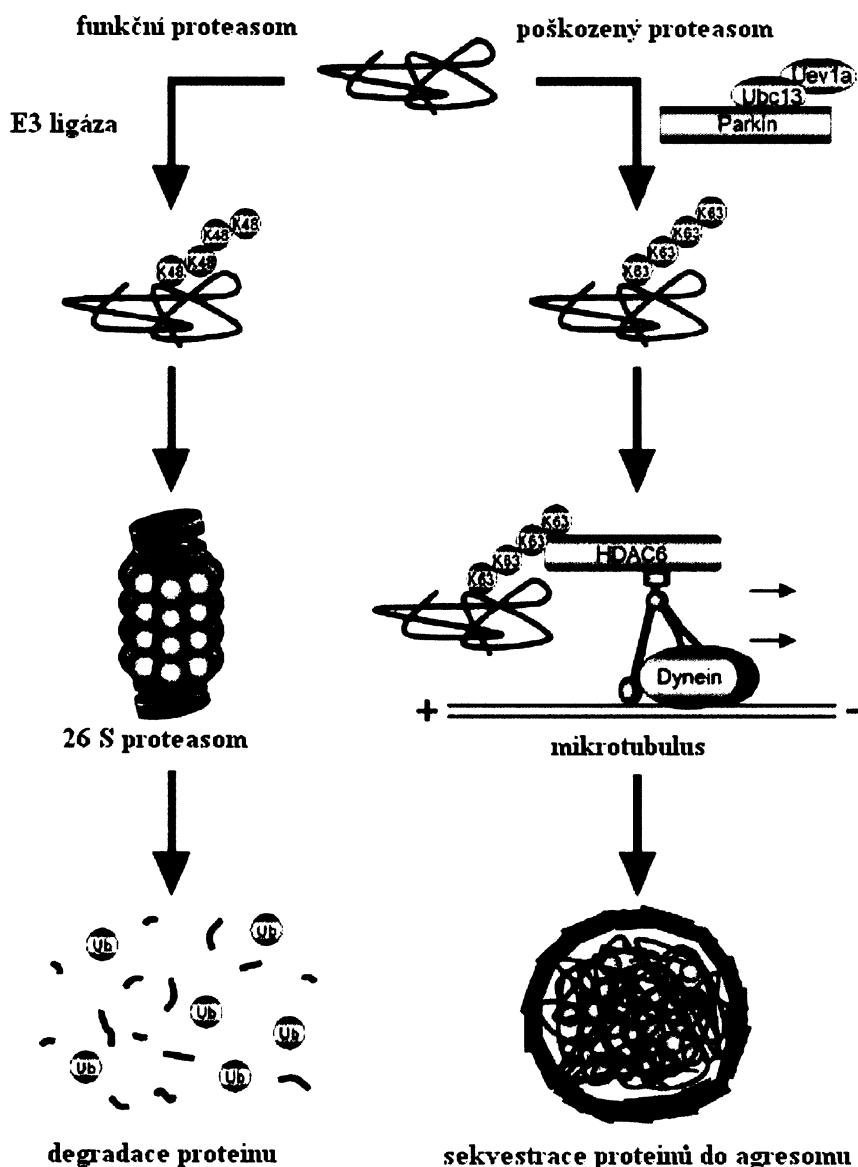
Znakem typickým nejen pro agresom, ale i pro další inkluzní tělíska, je reorganizace intermediárních filament, která doprovází formování těchto inkluzí. Za normálních podmínek je vimentin (typ intermediárních filament) v buňce přítomen ve formě dlouhých vláken. Při inhibici proteasomu, která spouští tvorbu agresomu, dochází k masivnímu přemístění intermediárních filament. Vimentin je kompletně přesunut do oblasti MTOC, kde tvoří klec okolo agresomu. Pozorované obklopení inkluzního tělíska vlákny vimentinu pravděpodobně brání difúzi jeho složek, a přispívá tak k jeho stabilitě (Johnston et al. 1998).

### 4.3 Směrování proteinů do agresomu

Tvorba agresomu je aktivní buněčný proces. Proteiny vyžadují signál, který zajistí jejich nasměrování do těchto inkluzních tělísek. Některé proteiny, jejichž mutantní formy se podílejí na vzniku neurodegenerativních chorob, mají ve své struktuře dvě sekvence. Jedna je zodpovědná za tendenci shlukovat se, druhá sekvence funguje jako směrový (cílový) signál do agresomu. Exon 1 huntingtinu obsahuje mimo jiné polyglutaminovou doménu (polyQ). Pokud dojde k mutaci a polyQ doména expanduje, huntingtin vytváří v cytosolu postižených buněk mnohočetné agregáty. PolyQ je tedy aggregační doména. P-region (oblast bohatá na aminokyselinu prolin) v huntingtinu zodpovídá za to, že agregáty nezůstanou rozptýlené v cytoplasmě, ale soustředí se do jedné perinukleární inkluze. P-region představuje směrový signál do agresomu (Wang et al. 2009). Synphilin 1 (protein, který hraje roli v patogenezi Parkinsonovy choroby) také vytváří pravé agresomy. Cílovou sekvencí je zde ANK1 doména (ankyrin-like repeat) (Zaarur et al. 2008). Tyto směrové signály jsou přenosné. Jejich vzájemná výměna mezi huntingtinem a synphilinem 1 či připojení na polypeptid, který sám o sobě tvoří agregáty, vede k tvorbě agresomu. Ve všech případech je vznik agresomu spouštěn inhibicí proteasomu (Zaarur et al. 2008, Wang et al. 2009).

Na cílení aberantních proteinů do agresomu se podílí další protein, parkin, jehož mutantní forma způsobuje Parkinsonovu chorobu. Parkin je ubiquitin-ligáza, která spolupracuje s heterodimerním E2 enzymem UbcH13/Uev1a. Polyubiquitinace substrátů řízená parkinem nemá degradativní roli. Parkin vytváří na proteinech polyubiquitinový řetězec, kde jsou jednotlivé molekuly ubiquitinu spojeny přes aminoskupinu na Lys 63. K této polyubiquitinaci dochází ještě dříve, než se substráty dostanou do agresomu, z čehož můžeme usuzovat, že ubiquitinace není důsledkem přítomnosti daných proteinů v agresomu.

Polyubiquitinový řetězec spojený pomocí Lys 63 se váže na histon deacetylázu 6 (HDAC6). HDAC6 je dyneinový adaptorový protein, váže ubiquitinový řetězec a zároveň má doménu pro asociaci s dyneinem. Připojení na mikrotubulární molekulový motor dynein zajišťuje retrográdní transport nákladu k minus konci mikrotubulů a dopravení proteinů do agresomu (viz obr. 5). Parkin a Lys 63 polyubiquitinace hrají důležitou roli ve směrování mutantních proteinů, které nemohou být degradovány v proteasomu, do agresomu. Způsob, jakým jsou tyto proteiny parkinem rozeznávané, zatím není známý (Olzmann et al. 2007).



Obr. 5: **Parkin a HDAC6 dependentní doprava aberantních proteinů do agresomu** (převzato z Olzmann 2007, upraveno)

## 4.4 Osud agregátů

Jak bude s proteinovými agregáty naloženo, závisí na jejich vlastnostech, stabilitě či rozpustnosti ve vodě a v detergentech. Vliv na jejich osud má i typ polypeptidů, z nichž jsou agregáty tvořeny, a další proteiny a buněčné struktury, které s agregáty kolokalizují. V řadě agregátů a inkluze můžeme najít kromě substrátových proteinů i chaperony (Taylor et al. 2003, Zietkiewicz et al. 2004, Kristiansen et al. 2007, Olzmann et al. 2007, Kaganovich et al. 2008), složky ubiquitin-proteasomové dráhy (Taylor et al. 2003, Holmberg et al. 2004, Olzmann et al. 2007) či indikátory poukazující na spojitost s autofágií (Olzmann et al. 2007, Kaganovich et al. 2008). Všechny zmíněné složky mohou mít vliv na rozpouštění a degradaci proteinových agregátů.

Molekulární chaperony vykonávají v buňkách různé funkce. Kromě pomáhání při zaujetí nativní konformace proteinů mají vliv i na dynamiku proteinových agregátů. Mohou aggregaci předcházet nebo napomáhat rozpouštění. Ve studii Krobitsch and Lindquist (2000) byl zkoumán vliv molekulárních chaperonů na distribuci proteinů s expandovanou polyglutaminovou doménou. Bylo zjištěno, že nadprodukce chaperonů z rodin Hsp40, Hsp70 a Hsp100 vede ke snížené aggregaci polyQ-proteinů. Tyto chaperony často kolokalizují s buněčnými inkluzem, s agresomy, JUNQ, IPOD nebo inkluzem z polyQ-agregátů. Hsp104 (z rodiny Hsp100) nalezený v IPOD slouží k disaggregaci nebo fragmentaci agregátů prionových proteinů, v JUNQ inkluzi udržuje rozpustnost proteinů, aby mohly být rozbaleny a znova sbalené nebo degradovány (Kaganovich et al. 2008).

Důležitou úlohu v disaggregaci hraje bi-chaperonový systém Hsp70-Hsp100. Tyto dvě rodiny chaperonů se společně podílejí na uvolňování aberantních polypeptidů z agregátů. Rozbalují je a umožňují jim nové sbalení nebo degradaci. K rozpouštění malých agregátů (zhruba do 100 kDa) stačí samotný Hsp70 systém, u větších agregátů je ale potřeba spolupráce obou rodin. Hsp70 se svými kofaktory asociouje s agregáty a vytváří s nimi stabilní komplex. Řídí přeusporydání proteinů v agregátu a umožňuje jejich uvolnění. Uvolněné polypeptidy jsou soukány do kanálu Hsp100 chaperonu. Při průchodu skrz Hsp100 se proteiny rozbalí. Po opuštění kanálu mohou zaujmout svou nativní konformaci, v čemž jim pravděpodobně pomáhá opět Hsp70 (Zietkiewicz et al. 2004).

V buněčných inkluzích se často nachází i ubiquitin, enzymy polyubiquitinační kaskády a podjednotky proteasomu (26 S, 20 S, PA700 a v savčích buňkách i PA28 aktivátor). Ubiquitinace polypeptidů v JUNQ inkluzích udržuje substráty rozpustné, a přispívá

tak k jejich rozbalení a znovusbalení (Kaganovich et al. 2008). Ubiquitin-ligáza parkin ve spolupráci s heterodimerním UbcH13/Uev1a nemá degradativní roli, ale řídí sekvestraci proteinových agregátů do agresomu, čímž pravděpodobně usnadňuje odklízení nedegradovatelných cytosolických proteinových substrátů pomocí autofágie (Zietkiewicz et al. 2004, Olzmann et al. 2007). V jádře autofagickou dráhu nenajdeme. Mechanismem, který zde kontroluje kvalitu proteinů, je UPS. Jaderná ubiquitin-ligáza San1 (savčím ortologem je UHRF-2) napomáhá ubiquitinaci proteinů s expandovanou polyQ doménou, a urychluje tím jejich degradaci. UHRF-2 asociuje s inkluzními tělisky polyQ-proteinů zahrnutých v patogenezi některých neurodegenerativních chorob. Urychlením degradace těchto proteinů chrání buňku před toxicitou, kterou způsobují jejich aberantní formy (Iwata et al. 2009).

JUNQ řídí redistribuci 26 S proteasomů do těchto juxtanukleárních inkluzí. JUNQ inkluze vytvořené v buňce představují hlavní místo koncentrace proteasomů a degradace aberantních solubilních proteinových substrátů (Kaganovich et al. 2008). Také proteiny náchylné k agregaci (proteiny s rozšířenou polyQ doménou) řídí ireverzibilní přesun proteasomů do cytosolických i jaderných aggregačních ohnisek, která tyto proteiny vytvářejí. Proteasomy jsou v inkluzích pevně vázané a ztrácí svou mobilitu. Proteiny s polyQ expanzí ale nejsou kompletně hydrolyzovány, ačkoliv mají značku pro štěpení. Degradace těchto proteinů je velice pomalá, nebo je zcela blokována, což může přispívat ke zhoršené proteolýze dalších substrátů. Navíc se z proteasomu mohou uvolňovat neúplné degradační produkty polyQ-substrátů, které se mohou hromadit a mít škodlivý vliv na buňku (Holmberg et al. 2004).

Tvorba agresomu a jiných stabilních inkluzí sice většinou nevede k jejich rozpuštění, ale hraje roli v odklízení aberantních polypeptidů a jejich agregátů z cytosolu, kde by mohly interferovat s životně důležitými buněčnými procesy a působit škodlivě. Soustředění aggregátů do jednoho místa může navíc přispívat k jejich odstranění pomocí autofágie. V řadě aggregátů byla prokázána kolokalizace s indikátory autofagických vakuol (Kaganovich et al. 2008), nebo s lysosomálními strukturami (Taylor et al. 2003, Olzmann et al. 2007). Částice určené k odstranění autofágií jsou nejprve obaleny membránou. Vzniká multilamelární autofagosom, který fúzuje s vakuolou, nebo lysosolem, a obsah je za účasti proteolytických enzymů rozštěpen (shrnutu Kopito 2000). Autofágie je považována za nespecifický masový proces degradace. E3 parkin vybírá substráty, které půjdou do agresomu a následně budou odstraněny autofágií. Je tedy možné, že parkin tímto způsobem pomáhá odstranění aberantních proteinů pomocí autofagosomální dráhy a přispívá k její selektivitě (Olzmann and Chin 2008). Navíc některé buněčné inkluze mají zamezený přístup do dceřiné buňky. Při

buněčném dělení, kdy jsou v buňce přítomny dvě SPB, agresom kolokalizuje pouze s jedním z nich. Při dělení je agresom zadržen v buňce mateřské, což může být mechanismem pro postupné odstranění inkluzí z populace (Kaganovich et al. 2008, Wang et al. 2009).

#### 4.5 Toxické působení agregátů

Agregace aberantních proteinů a dysfunkce UPS spolu souvisí. Agregáty mohou být příčinou poškození a zároveň produkty nefunkční proteolytické dráhy. Tak jako tak, akumulace agregovaných proteinů způsobuje globální poškození ubiquitin-proteasomového systému (Bence et al. 2001, Bennett et al. 2005), ačkoliv mechanismus toxického působení není zcela jasný.

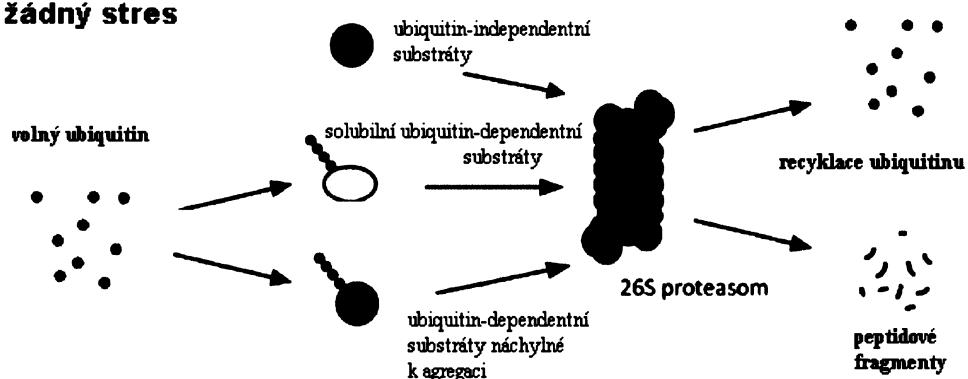
Jednou z možností je, že proteinové agregáty přímo interferují s proteasem. Například stabilní agregáty prionových PrP<sup>Sc</sup> (prion protein) oligomerů jsou příliš velké, aby prošly kanálem 20 S jádra proteasomu. Mohou ucpávat otvor do proteasomu a interferovat se vstupem dalších proteasomových substrátů, což ve výsledku vede k patologickému poškození postižených savčích nervových buněk (Kristiansen et al. 2007). Agregáty proteinů s expandovanou polyglutaminovou doménou (např. mutantní huntingtin) mohou též přímo interferovat s funkcí 26 S proteasomu. PolyQ proteiny jsou v proteasomu kineticky chyceny a jejich degradace je blokována nebo probíhá velmi pomalu. Proteiny s polyglutaminovou expanzí tak zaměstnávají tento proteolytický systém na delší dobu než jiné substráty, a tím nepřímo inhibují proteasomovou aktivitu. Navíc se částečně degradované intermediáty mohou z proteasomu uvolnit a hromadit v buňce, což může vést k dalšímu poškození způsobenému proteinovou agregací (Holmberg et al. 2004).

Prionové proteiny v savčích neuronech specificky inhibují katalytické  $\beta$  podjednotky v 20 S jádře proteasomu. Poškozují všechny tři proteolytické aktivity, nejvíce však ChT-L a PGPH ( $\beta$ 5 a  $\beta$ 1 podjednotky), vliv na T-L aktivitu je slabší (Kristiansen et al. 2007).

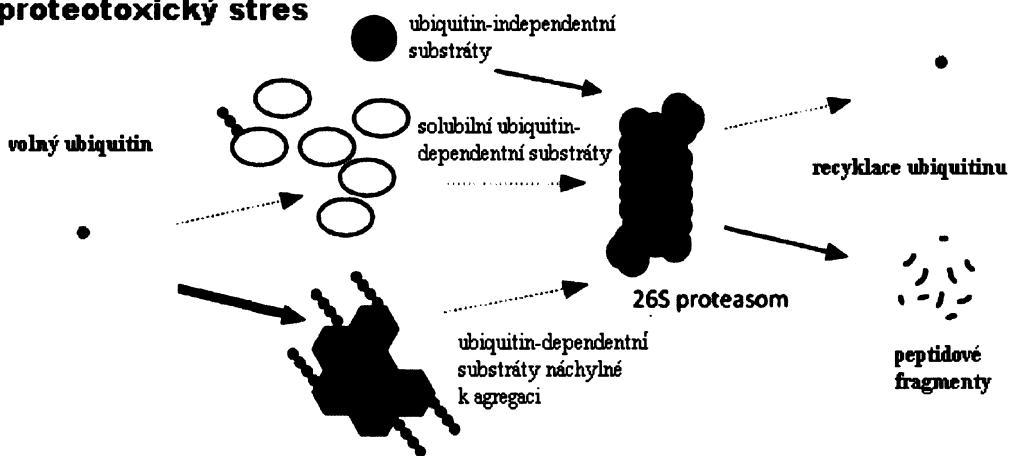
Ne vždy aggregace proteinů interferuje přímo s UPS. Vysvětlením nepříznivého vlivu agregátů by mohlo být uložení složek ubiquitin-proteasomové dráhy do jaderných a cytosolických inkluzí. Bennett et al. (2005) však uvádí, že sekvestrace limitujícího množství komponent UPS není hlavním důvodem inhibice systému, protože ani v jádře, ani v cytosolu jejich množství významně neklesá. Taktéž Bence et al. (2001) uvádí, že aggregace nevede k vyčerpání zásob volného ubiquitinu. Navíc se poškození projevuje ještě dříve, než se

proteiny do inkluzních tělisek shluknou (Bennett et al. 2005). Na druhou stranu, výsledky studie Salomon et al. (2009) ukazují, že proteotoxicický stres indukovaný tepelným šokem porušuje rovnováhu volného ubiquitinu. Ubiquitin je připojen na nerozpustné proteasomové substráty uložené v imobilních proteinových inkluzích, což vede k poklesu jeho hladiny (viz obr. 6). Nedostatek tohoto polypeptidu znemožňuje ubiquitin-dependentní proteolýzu solubilních substrátů. Nadprodukce ubiquitinu vede k obnovení degradace rozpustných proteinů, na nerozpustné agregáty však vliv nemá. Za dysfunkci UPS je zde tedy zodpovědná redukce ubiquitinu potřebného k ubiquitinem řízené proteasomální degradaci (Salomons et al. 2009).

### A žádný stres



### B proteotoxicický stres



Obr. 6: Poškození UPS způsobené tepelným proteotoxicickým stresem. Model fungování UPS za nepřítomnosti stresu (A) a během působení proteotoxicického stresu (B) (převzato z Salomons et al. 2009, upraveno)

Mutantní forma ubiquitinu B (UBB+1) také ovlivňuje funkci UPS. UBB+1 je substrátem proteasomu, jeho vysoké hladiny v buňce však tento systém poškozují. Neblokuje ubiquitinaci jiných proteinů ani přímo neinhibuje proteasom. Ale mění ubiquitinační vzory na některých UPS substrátech, čímž ovlivňuje jejich schopnost být štěpené v proteasomu. Navíc snižuje toleranci k toxickej agregátům přítomným v buňce. Samotný UBB+1 agregaci nezpůsobuje, ale zvyšuje toxickej projev polyglutaminových agregátů. Poškození UPS a změny v ubiquitinaci díky přítomnosti velkého množství UBB+1 pravděpodobně vedou ke špatnému zacházení s některými toxickej amyloidogenními proteiny. Brání jejich efektivní sekvestraci do velkých nerozpustných agregátů, což může být pro buňku fatální. Tento mutantní ubiquitin můžeme najít v inkluzích typických pro Alzheimerovu chorobu (Tank and True 2009).

Agregace a poškození UPS je klíčovou událostí v iniciaci buněčné smrti v patogenezi neurodegenerativních chorob. Kromě akumulace proteinů je výsledkem agregace i zastavení buněčného cyklu v G2 fázi (Bence et al. 2001). Buňky s poškozenou ubiquitin-proteasomovou dráhou mají sníženou schopnost degradovat další proteasomové substráty, které jsou důležité pro správné fungování buňky a její přežití, jako např. tumor supresorový protein p53. Hypofunkce proteasomu může způsobit uvolnění cytochromu c z mitochondrií do cytosolu, a aktivovat tak kaspázovou kaskádu, která vede k apoptóze postižených buněk (Jana et al. 2001).

## 4.6 Protektivní úloha buněčných inkluzí

Je zřejmé, že produkce mutantních či jinak poškozených proteinů náchylných k agregaci a tvorba buněčných inkluzí souvisí s cytotoxicitou. Ta ve výsledku ústí ve zhoršené přežívání postižených buněk. Ložiska agregovaných proteinů můžeme najít v řadě konformačních neurodegenerativních chorob. Proto jsou považována za toxicá a patologická. Ve skutečnosti však může mít tvorba velkých stabilních agregátů protektivní účinky. Co je tedy opravdu toxickej agens v postižených buňkách? Jsou inkluzní tělíska škodlivá, nebo naopak blahodárná?

Nadprodukce aberantních proteinů vede k jejich akumulaci a inhibice proteasomu indukuje jejich shlukování do inkluzních tělisek. V buňkách exprimujících mutantní formy

synphilinu 1 či huntingtinu se po použití proteasomového inhibitoru MG132 vytvořily agresomy a buňky nevykazovaly známky proteotoxického poškození. Pokud ale byla tvorba agresomu znemožněna odstraněním cílové značky směrující proteiny do agresomu (Wang et al. 2009) nebo depolymerizací mikrotubulů (např. Zaarur et al. 2008), vznikaly mnohočetné mobilní agregáty, které byly pro buňku škodlivé (Zaarur et al. 2008, Wang et al. 2009). Stejný vliv měla ztráta funkce ubiquitin-ligázy parkinu. Neschopnost efektivně oddělit toxicé aberantní proteiny ústila ve zvýšenou vnímavost k buněčné dysfunkci indukované aggregovanými proteiny (Olzmann et al. 2007). Spíše než velké inkluze jsou tedy toxicé méně aggregované oligomerní intermediáty vznikající během procesu agregace (Arrasate et al. 2004). Poškození UPS a pozměněná ubiquitinace substrátů v důsledku zvýšené exprese mutantní formy ubiquitinu UBB+1 může bránit rychlému odvodu amyloidogenních proteinů do velkých nerozpustných inkluzí. To vede ke zvýšení množství rozpustných či oligomerních forem těchto proteinů a ke zvýšení toxicity (Tank and True 2009). Taktéž prionová toxicita pozorovaná v neuronech souvisí spíše s kritickou hladinou oligomerů PrP<sup>Sc</sup>, které mohou být biologicky více aktivní než uspořádaná amyloidogenní vlákna (Kristiansen et al. 2007). Mutantní protein Sup35 způsobuje prionový fenotyp kvasinek bez ohledu na přítomnost pozorovatelných ohnisek tohoto proteinu. Viditelná ohniska nejsou nutná ani pro propagaci prionů. Do dceřiných buněk jsou přenášeny oligomery mutantního Sup35, které způsobují prionový fenotyp jak v mateřské buňce, tak v buňkách dceřiných (Kawai-Noma et al. 2006). Rozhodující vliv na přežití mají tedy hladiny difúzních aberantních proteinů (Arrasate et al. 2004).

Globální poškození UPS způsobené agregáty je nezávislé na sekvestraci agregátů do inkluzních tělisek a projevuje se ještě dříve, než se proteiny do inkluzí shluknou. Tvorbě inkluzních tělisek předchází poškození ubiquitin-proteasomového systému. Poškození této proteolytické dráhy bylo větší u buněk, které inkluzní tělíska následně tvořily, než u těch, které je netvořily. Po objevení inkluzí se funkce ubiquitin-proteasomového systému zlepšila a jeho poškození bylo menší v neuronech s inkuzemi než v neuronech bez nich. Z toho lze usoudit, že tvorba inkluzních tělisek je protektivní a zlepšuje přežívání postižených neuronů (Mitra et al. 2009).

Cytoprotektivní účinek velkých inkluzí může být způsoben tím, že tvorba inkluzí vede ke snížení hladiny difúzních forem aberantních proteinů (např. huntingtinu s polyQ expanzí), které jsou považovány za toxické agens (Arrasate et al. 2004). Vyčlenění toxických polypeptidů do nerozpustných buněčných inkluzí pomáhá také v tom, že odklízí tyto polypeptidy z míst, kde by mohly interferovat s chodem buňky. Redukuje jejich interakce

s jinými proteiny (Krobitsch and Lindquist 2000) a usnadňuje odstranění těchto agregátů pomocí autofágie (Kaganovich et al. 2008). Jestliže agregáty mutantních proteinů poškozují funkci UPS, pak jejich sekvestrace do inkluze a přesměrování do jiných proteolytických drah může zlepšit degradaci ostatních proteasomálních substrátů, a celkově tak snížit zátěž na buňku. Navíc přechodná inhibice proteasomu by mohla vyvolat adaptivní odpověď, která by buňku chránila před dalším poškozením. Tato odpověď by zahrnovala např. změny exprese chaperonů a složek dráhy obratu proteinů (Mitra et al. 2009). Ať už je mechanismus působení jakýkoliv, vše nasvědčuje tomu, že tvorba inkluzních tělisek představuje cytoprotektivní odpověď na poškození vyvolané nahromaděním aberantních proteinů.

## 5. Závěr

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se ukázaly jako vhodný modelový organismus pro studium jak ubiquitin-proteasomové dráhy, tak proteinových agregátů a inkluze. Jsou vhodné také pro studium vztahu mezi agregací, degradací a toxicitou spojenou s poškozením buněk. Ačkoliv ne vždy dosahuje poškození kvasinek takové závažnosti jako u neuronů (Sharma et al. 2006), s úspěchem se používají jako model pro objasnění toxického působení proteinů asociovaných s neurodegenerací.

Toto téma je atraktivní zejména proto, že v lidských nervových buňkách je poškození UPS a depozice ložisek agregovaných mutantních proteinů průvodním jevem řady konformačních neurodegenerativních chorob. Mezi nejzávažnější patří například Alzheimerova choroba, prionová onemocnění anebo choroby způsobené proteiny s expandovanou polyglutaminovou doménou – Parkinsonismus, Huntingtonova chorea, spinocerebellární ataxie a další. Proteiny indukující tyto choroby jsou navzájem nepříbuzné. Pro všechny je však společná ochota shlukovat se a tvořit patogenní agregáty.

Jak tyto toxické proteiny na neurony působí? Jak se buňky poškození brání? Jakou roli v procesu neurodegenerace hraje UPS a tvorba stabilních inkluzních tělisek typických pro tyto choroby? Objasnění těchto mechanismů může pomoci při hledání nových terapeutických strategií, díky kterým by bylo možné zmíněné poruchy léčit nebo jim předcházet.

## 6. Literatura

- Amerik, A., S. Swaminathan, B. A. Krantz, K. D. Wilkinson, and M. Hochstrasser. 1997.** In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J* 16: 4826-38.
- Arrasate, M., S. Mitra, E. S. Schweitzer, M. R. Segal, and S. Finkbeiner. 2004.** Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431: 805-10.
- Bence, N. F., R. M. Sampat, and R. R. Kopito. 2001.** Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292: 1552-5.
- Bennett, E. J., N. F. Bence, R. Jayakumar, and R. R. Kopito. 2005.** Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell* 17: 351-65.
- Eisele, F., B. Braun, T. Pfirrmann, and D. H. Wolf. 2006.** Mutants of the deubiquitinating enzyme Ubp14 decipher pathway diversity of ubiquitin-proteasome linked protein degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 350: 329-33.
- Holmberg, C. I., K. E. Staniszewski, K. N. Mensah, A. Matouschek, and R. I. Morimoto. 2004.** Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. *EMBO J* 23: 4307-18.
- Hu, M., P. Li, L. Song, P. D. Jeffrey, T. A. Cheno, K. D. Wilkinson, R. E. Cohen, and Y. Shi. 2005.** Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J* 24: 3747-56.
- Iwata, A., Y. Nagashima, L. Matsumoto, T. Suzuki, T. Yamanaka, H. Date, K. Deoka, N. Nukina, and S. Tsuji. 2009.** Intracellular degradation of polyglutamine aggregates by the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem* 284: 9796-803.
- Jana, N. R., E. A. Zemskov, G. Wang, and N. Nukina. 2001.** Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 10: 1049-59.
- Johnston, J. A., C. L. Ward, and R. R. Kopito. 1998.** Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143: 1883-98.
- Kaganovich, D., R. Kopito, and J. Frydman. 2008.** Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 454: 1088-95.
- Kawai-Noma, S., S. Ayano, C. G. Pack, M. Kinjo, M. Yoshida, K. Yasuda, and H. Taguchi. 2006.** Dynamics of yeast prion aggregates in single living cells. *Genes Cells* 11: 1085-96.
- Kopito, R. R. 2000.** Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10: 524-30.
- Kristiansen, M., P. Deriziotis, D. E. Dimcheff, G. S. Jackson, H. Ovaa, H. Naumann, A. R. Clarke, F. W. van Leeuwen, V. Menendez-Benito, N. P. Dantuma, J. L. Portis, J. Collinge, and S. J. Tabrizi. 2007.** Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. *Mol Cell* 26: 175-88.
- Krobitsch, S., and S. Lindquist. 2000.** Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1589-94.
- Laporte, D., B. Salin, B. Daignan-Fornier, and I. Sagot. 2008.** Reversible cytoplasmic localization of the proteasome in quiescent yeast cells. *J Cell Biol* 181: 737-45.

- Medicherla, B., and A. L. Goldberg.** 2008. Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *J Cell Biol* 182: 663-73.
- Mitra, S., A. S. Tsvetkov, and S. Finkbeiner.** 2009. Single neuron ubiquitin-proteasome dynamics accompanying inclusion body formation in huntington disease. *J Biol Chem* 284: 4398-403.
- Olzmann, J. A., and L. S. Chin.** 2008. Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination: a signal for targeting misfolded proteins to the aggresome-autophagy pathway. *Autophagy* 4: 85-7.
- Olzmann, J. A., L. Li, M. V. Chudaev, J. Chen, F. A. Perez, R. D. Palmiter, and L. S. Chin.** 2007. Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. *J Cell Biol* 178: 1025-38.
- Orlowski, M., and S. Wilk.** 2000. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys* 383: 1-16.
- Reits, E. A., A. M. Benham, B. Plougastel, J. Neefjes, and J. Trowsdale.** 1997. Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J* 16: 6087-94.
- Russell, S. J., K. A. Steger, and S. A. Johnston.** 1999. Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26 S proteasome subunits in yeast. *J Biol Chem* 274: 21943-52.
- Rubin, D. M., and D. Finley.** 1995. Proteolysis. The proteasome: a protein-degrading organelle? *Curr Biol* 5: 854-8.
- Saeki, Y., and K. Tanaka.** 2008. Cell biology: two hands for degradation. *Nature* 453: 460-1.
- Salomons, F. A., V. Menendez-Benito, C. Bottcher, B. A. McCray, J. P. Taylor, and N. P. Dantuma.** 2009. Selective accumulation of aggregation-prone proteasome substrates in response to proteotoxic stress. *Mol Cell Biol* 29: 1774-85.
- Sharma, N., K. A. Brandis, S. K. Herrera, B. E. Johnson, T. Vaidya, R. Shrestha, and S. K. Debburman.** 2006. alpha-Synuclein budding yeast model: toxicity enhanced by impaired proteasome and oxidative stress. *J Mol Neurosci* 28: 161-78.
- Sharon, M., T. Taverner, X. I. Ambroggio, R. J. Deshaies, and C. V. Robinson.** 2006. Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol* 4: e267.
- Shringarpure, R., T. Grune, J. Mehlhase, and K. J. Davies.** 2003. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem* 278: 311-8.
- Stone, M., R. Hartmann-Petersen, M. Seeger, D. Bech-Otschir, M. Wallace, and C. Gordon.** 2004. Uch2/Uch37 is the major deubiquitinating enzyme associated with the 26S proteasome in fission yeast. *J Mol Biol* 344: 697-706.
- Tank, E. M., and H. L. True.** 2009. Disease-associated mutant ubiquitin causes proteasomal impairment and enhances the toxicity of protein aggregates. *PLoS Genet* 5: e1000382.
- Taylor, J. P., F. Tanaka, J. Robitschek, C. M. Sandoval, A. Taye, S. Markovic-Plese, and K. H. Fischbeck.** 2003. Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum Mol Genet* 12: 749-57.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, M. Rechsteiner, and C. M. Pickart.** 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19: 94-102.
- Wang, Y., A. B. Meriin, N. Zaarur, N. V. Romanova, Y. O. Chernoff, C. E. Costello, and M. Y. Sherman.** 2009. Abnormal proteins can form aggresome in yeast: aggresome-targeting signals and components of the machinery. *FASEB J* 23: 451-63.
- Wilkinson, C. R., M. Wallace, M. Morphew, P. Perry, R. Allshire, J. P. Javerzat, J. R. McIntosh, and C. Gordon.** 1998. Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast. *EMBO J* 17: 6465-76.

- Windheim, M., M. Peggie, and P. Cohen. 2008.** Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochem J* 409: 723-9.
- Zaarur, N., A. B. Meriin, V. L. Gabai, and M. Y. Sherman. 2008.** Triggering aggresome formation. Dissecting aggresome-targeting and aggregation signals in synphilin 1. *J Biol Chem* 283: 27575-84.
- Zietkiewicz, S., J. Krzewska, and K. Liberek. 2004.** Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *J Biol Chem* 279: 44376-83.