

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT

Zakład Biochemii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail b.grzelakowska@nencki.gov.pl

ZALEŻNA OD UBIKWITYNY DEGRADACJA BIAŁEK NAGRODA NOBLA Z CHEMII W 2004 ROKU*

Metabolizm komórki ściśle zależy od poziomu i aktywności wielu różnych białek, które podlegają regulacji na poziomie transkrypcji, translacji, modyfikacji potranslacyjnych, a także zależą w bardzo dużym stopniu od efektywności ich proteolizy nieodwracalnie degradującej białka. W komórkach eukariotycznych występują dwa podstawowe systemy degradacyjne - lizosomalny i pozalizosomalny. W systemie lizosomalnym degradowane są przede wszystkim białka zewnętrzkomórkowe dostające się do komórek na przykład podczas endocytozy, czy też białka wewnątrzkomórkowe, jeśli komórka poddana jest silnemu stresowi, np. podczas głodzenia. Natomiast pozalizosomalny układ proteolityczny, to zależny od ATP szlak ubikwityna/proteasom, którego badania rozpoczęły się w końcu lat 70. XX w. W układzie tym, jak obecnie wiadomo, są degradowane, oprócz białek strukturalnych i konstytutywnych, tak ważne dla prawidłowego funkcjonowania komórek enzymy regulujące szlaki biosyntetyczne, białka regulujące przebieg cyklu komórkowego, wiele czynników transkrypcyjnych, białek kodowanych przez onkogeny i geny supresorowe czy też białek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej. Szczególnie duże zainteresowanie pozalizosomalnym układem proteolitycznym rozpoczęło się w połowie lat 80. minionego wieku, a jego kulminacją jest przyznanie w 2004 r. jego odkrywcom nagrody Nobla z dziedziny chemii.

Laureatami nagrody Nobla *„for the discovery of ubiquitin-mediated protein degrada-*

tion”, jak głosi werdykt Królewskiej Szwedzkiej Akademii Nauk, zostali:

Irwin Rose urodzony w Nowym Yorku (1926), biochemik (PhD 1952), ponad 30 lat pracujący w Fox Case Cancer Center w Filadelfii, od 1995 r. kontynuujący pracę naukową na Uniwersytecie Kalifornijskim w Irvine, członek National Academy of Sciences USA.

Avram Hershko, urodzony w Karcag, Węgry (1937), od 1950 r. obywatel Izraela, doktor medycyny (MD 1965) i biochemii (PhD 1969), od 1972 r. profesor w Instytucie Badawczym Nauk Medycznych im. Rodziny Rappaportów w Izraelskim Instytucie Technologii (Technion) w Hajfie, laureat nagrody Weizmana, nagrody Izraela, razem z A. Varshavskim i A. Ciechanoverem nagrody im. Alberta Laskera (2000), członek National Academy of Sciences USA.

Aaron Ciechanover, urodzony w Hajfie (1947), obywatel Izraela, doktor medycyny (MD 1981), od początku lat 80. minionego wieku profesor w Zakładzie Biochemii i dyrektor Instytutu Badawczego Nauk Medycznych im. Rodziny Rappaportów w Izraelskim Instytucie Technologii w Hajfie, laureat nagrody Izraela oraz, wraz z A. Hershko i A. Varshavskim, nagrody im. A. Laskera (2000).

Zasługą powyższych badaczy jest odkrycie i opisanie podstaw działania zależnej od ubikwityny (i ATP) proteolizy białek, procesu precyzyjnie regulowanego i specyficznego w stosunku do białkowego substratu, jego lokalizacji komórkowej i momentu, w którym ma nastąpić jego degradacja. Za-

*patrz także art.: B. GRZELAKOWSKA-SZTABERT, Nagroda Nobla z chemii za 2004 rok – docenienie kontrolowanej, zależnej od ubikwityny, proteolitycznej degradacji białek. Post. Biol. Kom. 32, 3-12, 2005.

interesowania badawcze każdego z laureatów odzwierciedlają tytuły ich wykładów noblowskich:

Irwin Rose „How ubiquitin chains are made and unmade” (Jak powstaje i rozpada się łańcuch poliubikwitylowy),

Avram Herskho „The ubiquitin system for protein degradation and its roles in the control of cell division” (Udział ubikwityny w degradacji białek i jej rola w kontroli podziału komórki),

Aaron Ciechanover „Intracellular proteolysis – from a vague idea into the patient bed” (Wewnątrzkomórkowa proteoliza – od idei do łóżka pacjenta).

Obecnie I. Rose pracuje naukowo w dziedzinie nie dotyczącej proteolizy białek. A. Herskho kontynuuje badania degradacji takich istotnych regulatorów cyklu komórkowego jak cyklina B i inhibitor cyklu białko p27 oraz interesuje się mechanizmem działania enzymów przeprowadzających ubikwitylację białek. Badania A. Ciechanovera dotyczą przede wszystkim regulacji stabilności przez układ ubikwityna/proteasom czynników transkrypcyjnych p53, c-Myc, NFκB i MyoD oraz powiązań pomiędzy proteolizą białek w omawianym układzie a apoptozą komórek.

UBIKWITYLACJA BIAŁEK – HISTORIA I TERAŻNIEJSZOŚĆ

Początki badań tego problemu sięgają do świadczeń A. Herskho z końca lat 70. XX w. i dotyczących degradacji enzymu – aminotransferazy tyrozynowej oraz udziału w tym procesie ATP. Konsekwencja i determinacja A. Herskho w wyjaśnianiu, jak się wówczas wydawało, paradoksu – konieczności udziału energii w wewnątrzkomórkowej degradacji białek – doprowadziła do jego ścisłej współpracy z A. Rose, a następnie z A. Ciechanoverem. Pracując wspólnie w laboratorium kierowanym przez Rose nad proteolizą różnych białkowych substratów zachodzącą w bezkomórkowych lizatach z retikulocytów królika, badacze Ci zaproponowali w 1980 r. model czteroetapowej degradacji białek (HERSHKO i współaut. 1980). Etap I to dołączenie do białka przeznaczonego do degradacji niewielkiego globularnego białka nazwanego APF-1 (ang. ATP-dependent proteolytic factor) przez enzym – syntetazę, w procesie wymagającym ATP. Etap II to korekcja „błędnie” oznakowanego substratu poprzez usunięcie APF-1 przez enzym izopeptydazę. Etap III polegać miał na degradacji białka oznakowanego APF-1 pod działaniem endopeptydazy (wielo-katalitycznej i wielo-funkcyjnej proteazy) do peptydów połączonych z APF. W ostatnim etapie IV, dochodziłoby do odszczepienia na drodze enzymatycznej APF-1 i dalszego rozkładu peptydów.

W latach 1981–1983 Rose, Herskho i Ciechanover prowadzili intensywne badania zmierzające do udowodnienia słuszności zaproponowanego wcześniej modelu, który, co prawda w postaci mocno rozbudowanej, obo-

wiązuje do dzisiaj. Przede wszystkim wykazał, że białko APF-1 jest identyczne z odkrytą w 1975 r. ubikwityną, niewielkim, zbudowanym z 76 aminokwasów białkiem globularnym. Stosując szereg metod biochemicznych, w tym frakcjonowanie lizatów białkowych i oznakowaną izotopem ubikwitynę, wykluczyli jej działanie jako aktywatora syntetazy, a opracowaną w laboratorium metodą immunochemiczną pokazali dołączanie ubikwityny do białkowego substratu (HERSHKO i współaut. 2000). Obecnie wiadomo, że ubikwityna jest jednym z najbardziej konserwatywnych białek komórkowych, które występuje w formie wolnej lub związanej we wszystkich organizmach eukariotycznych (PIOTROWSKA 1993). Centrum aktywne ubikwityny stanowią reszty Leu-Arg-Gly-Gly obecne na karboksylowym końcu łańcucha. W procesie kowalencyjnego dołączenia ubikwityny do białka mającego ulec degradacji C-końcowa glicyna ubikwityny łączy się wiązaniem izopeptydowym z grupą ε-aminową lizyny koniugowanego białka, możliwe jest również enzymatyczne przenoszenie jednej cząsteczki wolnej ubikwityny na drugą. W cząsteczce ubikwityny występują cztery reszty lizyny, na których mogą formować się łańcuchy poliubikwitylowe. Obecnie wiadomo, że tylko utworzenie łańcucha w połączeniu z lizyną w pozycji 48 ubikwityny skierowuje białko do degradacji, zaś monoubikwitylacja białka lub tworzenie łańcuchów poliubikwitylowych poprzez lizyny obecne w innych miejscach cząsteczki ubikwityny ma przede wszystkim znaczenie regulacyjne (WEISSMAN 2001).

W etapie I pierwotnego modelu, katalizowanym przez syntetazę, działają, jak to udowodnili Nobliści, nie jeden, a aż trzy enzymy, których sekwencyjne działanie doprowadza do ubikwitylacji białka (Ryc. 1). Są to enzym aktywujący ubikwitynę (E1), enzym koniugujący i przenoszący zaktywowaną ubikwitynę (E2) oraz enzym zwany ligazą ubikwitylową (E3), który bierze udział w rozpoznawaniu substratu mającego ulec degradacji i dołączeniu do niego ubikwityny. Do dzisiaj poznano zaledwie kilka enzymów E1, około dwudziestu enzymów E2 i kilka klas ligaz ubikwitylowych, do których zalicza się już blisko 1000 białek. Należy podkreślić, że w etapie I tylko reakcja katalizowana przez E1, w którym tworzy się wysokoenergetyczne wiązanie pomiędzy glicyną na C-końcu ubikwityny a cysteiną obecną w centrum aktywnym E1, wymaga energii pochodzącej z hydrolizy ATP do AMP i pirofosforanu. Kolejny etap to przeniesienie zaktywowanej w powyższy sposób ubikwityny na enzym E2, z którego następnie, bezpośrednio lub najczęściej przy udziale ligaz ubikwitylowych E3, cząsteczka ubikwityny zostaje przeniesiona na właściwy białkowy substrat, a kilkukrotne powtórzenie tej kaskady enzymatycznej prowadzi do utworzenia łańcucha zbudowanego z co najmniej czterech reszt ubikwityny, rozpoznawanego przez kompleks proteasomu. Deubikwitylację substratu, także w przypadku jego błędnego oznakowania (etap II) przeprowadzają zaś, jak opisano poniżej, enzymy deubikwitylujące należące do coraz bardziej powiększającej się rodziny hydrolaz i izopeptydaz (CHUNG i BAEK 1999, WING 2003, GUTERMAN i GLICKMAN 2004).

Rozszyfrowano już obecnie endopeptydazy degradujące białka oznakowane ubikwityną (etap III). Proces ten zachodzi w proteasomie 26S, kompleksie białkowym złożonym z wielu podjednostek, charakteryzującym się szerokim spektrum aktywności proteolitycznej. Zbudowany jest z dwóch podstawowych subkompleksów: cylindrycznego rdzenia 20S o aktywności proteolitycznej (podjednostki α i β) oraz dwóch podjednostek regulatorowych 19S (VOGES i współaut. 1999, ZWICKL i współaut. 2001, FÖRSTER i HILL 2003, PICKART i COHEN 2004). Przed dostaniem się do wnętrza proteasomu 26S, ale już po rozpoznaniu przez określone białka tworzące podjednostkę 19S bądź inne białka współdziałające (ang. shuttle proteins) (HARTMAN-PETERSEN i GORDON 2004, MADURA 2004, VERMA i współaut. 2004a), enzymy deubikwitylu-

jące odszczepiają łańcuch poliubikwitylowy od białkowego substratu. Dzięki temu staje się możliwe jego rozfałdowanie (przy udziale ATP-az podjednostki 19S) i proteolityczna degradacja w proteasomie do krótkich peptydów i aminokwasów (VERMA i współaut. 2002). Odłączony łańcuch ubikwitylowy jest następnie degradowany, a uwolnione cząsteczki ubikwityny ponownie wprowadzone do obiegu.

Trzeba jednak zauważyć, że w proteasomie 26S mogą także niekiedy być degradowane białka nieoznakowane uprzednio ubikwityną. Klasycznym przykładem jest enzym – dekarboksylaza ornitynowa, kluczowy enzym w biosyntezie polikationów komórkowych, poliamin (MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA 1996), także w pewnych warunkach białko p21, jeden z inhibitorów cyklu komórkowego (TOUITOU i współaut. 2001, BORNSTEIN i współaut. 2003), a także prawdopodobnie i inne białka. Tak w uproszczonej postaci przedstawia się schemat ubikwitylacji białek przedstawiany od szeregu lat w licznych opracowaniach przeglądowych (np. CIECHANOWER i współaut. 2000, WEISSMAN 2001, PICKART 2001, WILKINSON 2004), także w polskich czasopismach biologicznych (PIOTROWSKA 1993; WÓJCIK 1995; GRZELAKOWSKA-SZTABERT 2002a, b).

Klasyczna, najwcześniej poznana rola ubikwitylacji polega na miejscowo- i czasowo-specyficznym oznakowywaniu białek przeznaczonych do degradacji. Należy sobie jednak zdawać sprawę, że ubikwitylacja białka nie zawsze musi przesądzać o jego degradacji. Mono-lub multiubikwitylacja (bez tworzenia łańcucha) białek, a także tworzenie łańcuchów na lizynie innej niż w pozycji 48, może być sygnałem do endocytozy białek, ich transportu do lizosomów lub wakuoli, może regulować przemieszczanie się białek pomiędzy jądrem a cytoplazmą, jak również regulować działanie wielu białek uczestniczących w różnych procesach metabolicznych (HAGLUND i współaut. 2003, SCHNELL i HICKE 2003, SHCHERBIK i HAINES 2004). Omówienie tych zagadnień przekracza ramy tego opracowania, już jednak ich wyliczenie wskazuje, że proces ubikwitylacji może dorównywać pod względem znaczenia procesowi fosforylacji. Ubikwitylacja jest bowiem, podobnie jak fosforylacja, procesem szybkim, do pewnego momentu odwracalnym, podlega niezmiennie precyzyjnej regulacji i dotyczy bardzo wielu białek biorących udział we wszystkich praktycznie procesach istotnych dla prawidłowe-

go funkcjonowania komórek. Zdaniem wielu biologów ubikwitynę można zatem traktować jako jeden z podstawowych regulatorów metabolizmu komórkowego (FINLEY i współaut. 2004). Należy dodać, że w komórkach zidentyfikowano już także wiele białek pokrewnych ubikwitynie, które również biorą udział w wielu procesach regulacyjnych, a ich dołączanie do białek jest równie złożone jak dołączanie ubikwityny (SCHWARTZ i HOCHSTRASSER 2003).

Jak już wspomniano, ostatni etap ubikwitylacji białek – rozpoznanie białka przeznaczonego do degradacji i zbudowanie na nim łańcucha poliubikwitylowego – odbywa się przy udziale ligaz ubikwitylowych, które stanowią najliczniejszą grupę spośród enzymów uczestniczących w ubikwitylacji białek. W dalszej części tego opracowania skoncentruję się na krótkim omówieniu budowy i regulacji działania ligaz ubikwitylowych, biorących udział w regulacji cyklu komórkowego. Moją arbitralną decyzję o przedstawieniu tej wła-

śnie grupy enzymów uczestniczących w ubikwitylacji usprawiedliwia fakt, że stosunkowo najwcześniej poznano ich podstawową budowę i degradowane substraty, którymi są przede wszystkim białka regulatorowe cyklu komórkowego (VEW 2001, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 2002a), a w badaniach mechanizmów ich degradacji nadal bardzo aktywnie uczestniczy Noblista A. Hershko. Złożoność mechanizmów prowadzących do degradacji regulatorów cyklu omówię na przykładach degradacji kilku białek: białka p27 – inhibitora kinaz cyklino-zależnych (Cdk), fosfatazy Cdc25 – enzymu decydującego o aktywności wszystkich kinaz cyklino-zależnych (za opisanie i udokumentowanie udziału kinaz Cdk w regulacji cyklu komórkowego L. Hartwell, P. Nurse i T. Hunt otrzymali nagrodę Nobla w 2001 r.) oraz sekuryiny – białka decydującego o kohezji chromatyd. Wskażę także na konsekwencje zaburzeń funkcjonowania układu ubikwityna/proteasom w patogenezie wielu schorzeń.

LIGAZY UBIKWITYLOWE – BUDOWA, REGULACJA DZIAŁANIA, SUBSTRATY

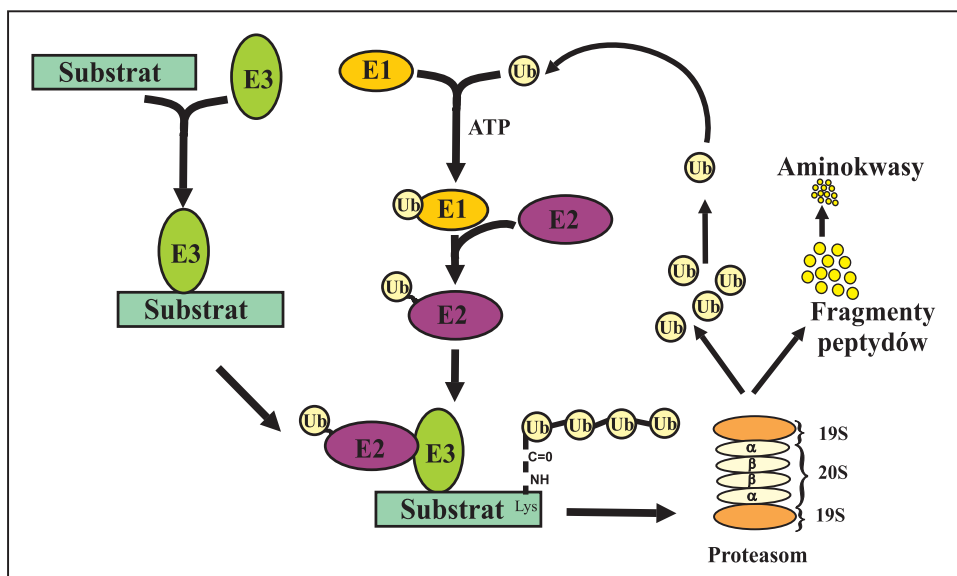
BUDOWA LIGAZ UBIKWITYLOWYCH

Ligazy ubikwitylowe są bądź wielopodjednostkowymi kompleksami białkowymi, w których określone podjednostki biorą udział w rozpoznaniu substratu i dołączaniu do niego łańcucha poliubikwitylowego (dzięki interakcji z enzymem E2) bądź też są pojedynczymi polipeptydami, w których specyficzne fragmenty cząsteczki pełnią tę funkcję. Wyróżnia się obecnie dwie podstawowe klasy tych enzymów – ligazy z domeną RING finger (ang. really interesting new gene), katalizujące bezpośrednie przeniesienie na substrat zaktywowanej i powiązanej z enzymem E2 ubikwityny oraz ligazy z domeną HECT (ang. homologous to the E6-AP C-terminus), w których przed ostatecznym dołączeniem ubikwityny do właściwego substratu dochodzi do przeniesienia zaktywowanej ubikwityny z enzymu E2 na ligazę ubikwitylową E3. W proteolizie regulatorów cyklu komórkowego biorą udział przede wszystkim ligazy E3 z domeną RING finger (Ryc. 2). Są nimi wielopodjednostkowe ligazy SCF i APC oraz monomeryczna ligaza CHFR, których budowę i działanie ostatnio omówiono na łamach polskich czasopism (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 2002a, 2004). Dlatego teraz przypomnę tylko podstawowe informacje o tych enzymach,

a szerzej omówię poznane ostatnio mechanizmy regulacji ich działania.

Ligazy typu SCF (ang. Skp1-cullin-F-box-ROC1) zbudowane są z co najmniej 4 podjednostek (Ryc. 2A). Największą podjednostką jest jedno z białek z rodziny kullin (Cul 1–7), tworzące pomost, na którym dochodzi do współdziałania z innymi podjednostkami kompleksu. Końcowa globularna domena kulliny wiąże się z podjednostką zawierającą domenę RING finger, białkiem Rbx1/ROC1 (ang. regulator of cullin), o strukturze zbliżonej do struktury palca cynkowego, zaangażowanym w rekrutację enzymu E2 skonjugowanego z ubikwityną, i, jak się obecnie przypuszcza, w hydrolizę wysokoenergetycznego wiązania tioestrowego pomiędzy E2 a ubikwityną. N-końcowy fragment kulliny 1, a także kulliny 7, wiąże podjednostkę Skp1 (ang. S-phase kinase associated protein 1), stanowiącą łącznik pomiędzy kulliną a białkami Fbp (ang. F-box proteins). W przypadku ligaz typu SCF z kullinami innymi niż kullina 1, zamiast białek Skp 1 i białek Fbp, występują białka pokrewne pełniące podobne funkcje (KREK 2003, GUARDAVACCARO i PAGANO 2004).

Białka Fbp rozpoznają i wiążą białka mające ulec ubikwitylacji, charakteryzuje je za-

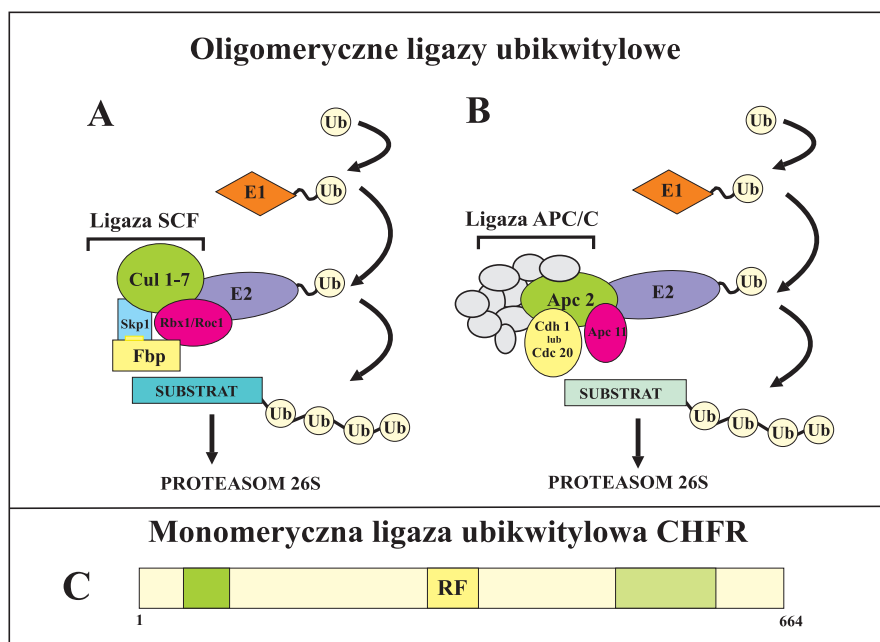


Ryc. 1. Schemat działania układu ubikwityna/proteasom.

E1 – enzym aktywujący ubikwitynę, E2 – enzym konjugujący i przenoszący ubikwitynę, E3 – ligaza ubikwitylowa.

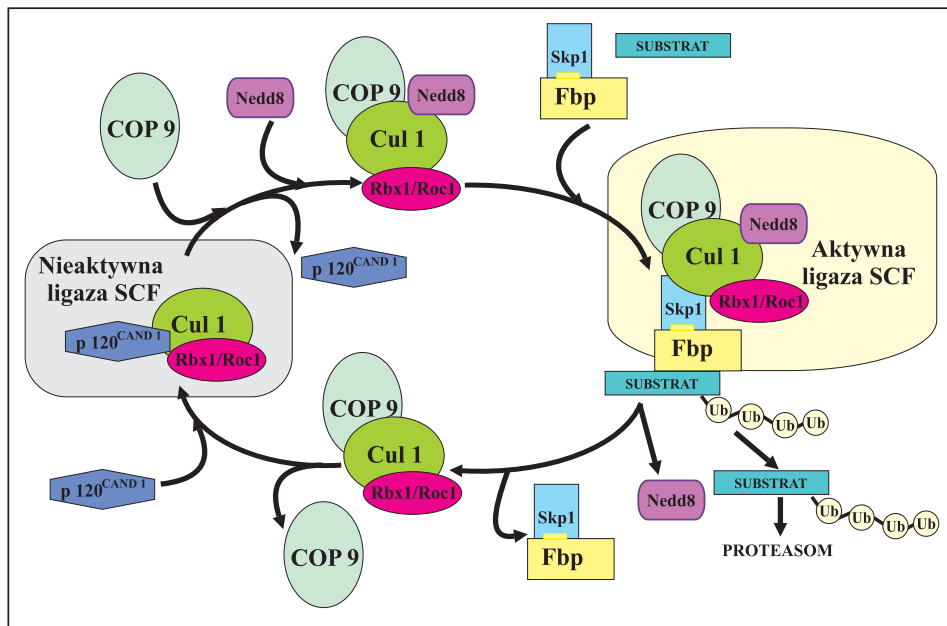
wsze obecność 40-aminokwasowej sekwencji tzw. „F-box” oraz specyficznych sekwencji takich jak WD40 czy też LRR (ang. leucine rich repeat), które biorą udział w interakcjach białko-białko (CRAIG i TYERS 1999, CARDOZO i PAGANO 2004). Mutacje i/lub amplifikacje kodujących je genów spotykane są w wielu komórkach nowotworowych, jak również w mięśniach ulegających atrofii. Białka te są

wysoce niestabilne, a degradacja przynajmniej niektórych z nich następuje w proteasomie 26S. Białka Fbp występują praktycznie we wszystkich badanych organizmach, w komórkach ssaków jest ich prawdopodobnie kilkaset. Powszechność i liczebność podjednostek w ligazach typu SCF powoduje, że mogą być tworzone różne kompleksy tych enzymów o wybiórczej specyficzności w sto-



Ryc. 2. Przykłady ligaz ubikwitylowych z domeną RING finger (RF).

Oligomeryczne ligazy typu SCF (A) i APC/C (B). C – monomeryczna ligaza CHFR; zaznaczono podstawowe podjednostki lub domeny, których działanie opisano w tekście.

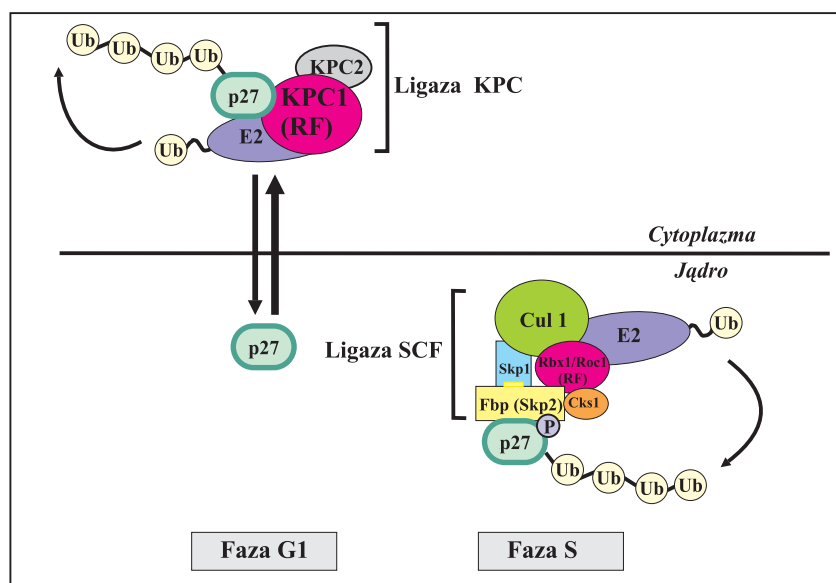


Ryc. 3. Regulacja działania ligaz typu SCF przez białka p120^{CAND1}, Nedd8 i kompleks sygnałowy COP 9 (wg PETROSKIEGO i DESHAESA 2005, SCHWECHHEINERA 2004).

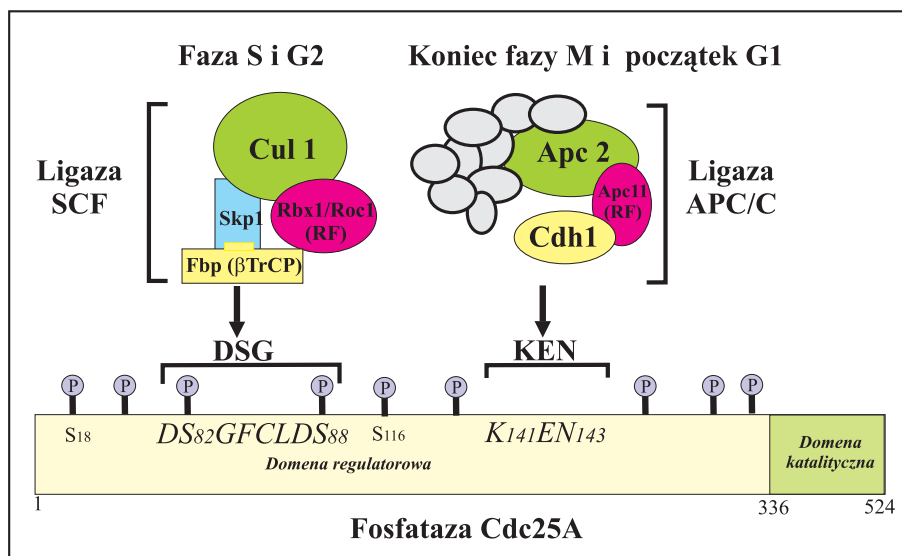
sunku do określonych białek. Sprawia to, że ligazy SCF mogą ubikwitylować i skierowywać na drogę degradacji bardzo różne białka. W cyklu komórkowym kompleks ligazy SCF działa od połowy fazy G1, poprzez fazę syntezy DNA (faza S) do połowy fazy G2. Jego podstawowymi substratami są cykliny D i E, podjednostki regulatorowe kinaz Cdk, białkowe inhibitory powyższych kinaz, a także niektóre czynniki transkrypcyjne, np. E2F, re-

gulujące ekspresję genów kodujących białka niezbędne do rozpoczęcia syntezy DNA.

Ligaza APC/C (ang. anaphase promoting complex/cyclosome) jest drugim kompleksem ligazowym działającym w cyklu komórkowym od połowy fazy G2, podczas mitozy i na początku fazy G1 (Ryc. 2 B). Tworzy go aż kilkanaście podjednostek, w którym białka APC 2 i APC 11 są homologiczne z kulliną i białkiem Rbx1/ROC1 w ligazie SCF i pełnią,



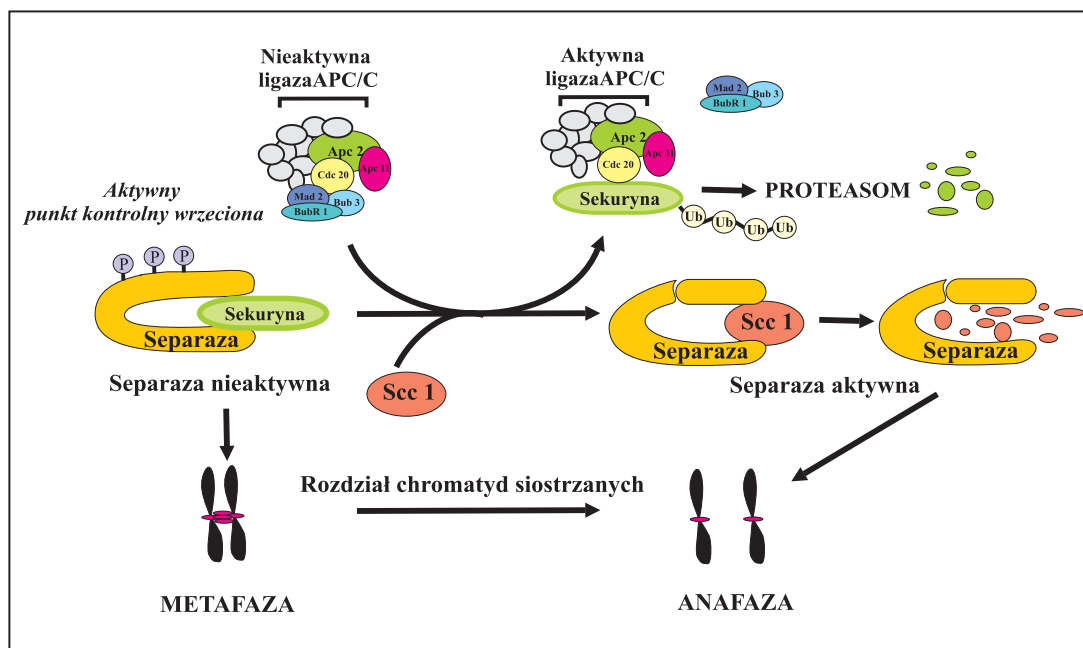
Ryc. 4. Dwie ligazy ubikwitylowe z domeną RING finger o różnej lokalizacji wewnątrzkomórkowej uczestniczą w degradacji inhibitora p27 w różnych fazach cyklu (wg HENGSTA 2004, KAMURY i współaut. 2004).



Ryc. 5. Ubikwitylację fosfatazy Cdc25A przeprowadzają w różnych fazach cyklu komórkowego dwie różne ligazy ubikwitylowe (wg BUSINO i współaut. 2004).

jak się wydaje, podobne funkcje – pomostu, na którym dochodzi do współdziałania podjednostek (APC 2) i białka pośredniczącego w interakcji SCF z enzymem E2 przenoszącym ubiquitynę (APC 11). Znaczenie funkcjonalne większości pozostałych podjednostek kompleksu APC nie jest dotychczas w pełni wyjaśnione, ale obecność w nich określonych sekwencji aminokwasowych (motywy WD40, WD7, TPR, DOC) wskazuje

na ich prawdopodobny udział w interakcjach białko-białko, a także w wiązaniu cukrów, fosfolipidów czy nukleotydów. Podjednostki te nie uczestniczą jednak w wiązaniu i rozpoznaniu białek mających ulec ubikwitylacji. Funkcje te pełnią dwie różne podjednostki regulatorowe – białka Cdc20/Fizzy i Cdh1/Hct1/fizzy-related, w których nie występuje motyw F-box. Co więcej, w różnych fazach cyklu występują różne kompleksy APC/C z



Ryc. 6. Ubikwitylacja sekuryiny przez ligazę ubikwitylową APC/C (po „wyłączeniu” działania punktu kontrolnego wrzeczona) prowadzi do degradacji kohezyny Scc1 przez proteazę – septynę i do rozdziału chromatyd w anafazie (wg HORNIGA i współaut. 2002, WAIZENEGGERA i współaut. 2002).

białkami regulatorowymi, a mianowicie kompleks APC/C z białkiem Cdc20 aktywny jest w mitozie podczas metafazy i na początku anafazy, natomiast kompleks APC/C z białkiem Cdh1 zaczyna działać w anafazie i kończy w fazie G1 następnego cyklu (PAGE i HIETHER 1999, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 2004).

Ligaza APC/C zależnie od momentu, w którym wchodzi w interakcje z określoną podjednostką regulatorową, ubikwityluje różne substraty i współdziała nie z jednym lecz z dwoma enzymami E2. Jej substratami są przede wszystkim białka bezpośrednio decydujące o przebiegu mitozy jak cykliny A i B (stanowiące podjednostki regulatorowe kinaz cyklicznych), sekuryna, inhibitor rozdziału chromatyd i w konsekwencji anafazy. Przy jej udziale degradowane są też jej własne białka regulatorowe Cdc20, Cdh1, kinaza Polo, białko Ase1 wiążące się z mikrotubulami oraz białko Cdc6 i geminina biorące udział w regulacji syntezy DNA.

Ligaza CHFR. W 2002 r. wykazano, że aktywność ligazy ubikwitylowej wykazuje także białko CHFR (ang. checkpoint with FHA and RING finger), które działa w punkcie kontrolnym cyklu komórkowego w profazie podziału mitotycznego i monitoruje kondensację chromosomów i ruch centrosomów ku biegunom komórki (Ryc. 2C) (KANG i współaut. 2002). Jej podstawowym substratem jest kinaza Plk1, decydująca między innymi o poziomie ufosforylowania fosfatazy Cdc25, enzymu niezbędnego do aktywacji kinaz Cdk. *In vitro* ligaza CHFR katalizuje także własną ubikwitylację.

Należy sobie zdawać sprawę, że nie są to jedyne ligazy ubikwitylowe, które decydują o wewnątrzkomórkowym poziomie regulatorów cyklu komórkowego. Szereg innych ligaz ma wpływ pośredni, przede wszystkim poprzez regulację poziomu białek onkogennych i supresorowych, ale ich omówienie wymaga osobnego opracowania.

MECHANIZMY REGULUJĄCE DZIAŁANIE LIGAZ UBIKWITYLOWYCH

Bardzo wiele uwagi poświęca się wyjaśnianiu mechanizmów biorących udział w regulacji działania ligaz ubikwitylowych. Aktywność ligaz typu SCF regulowana jest przede wszystkim na poziomie tworzenia podstawowego funkcjonalnego kompleksu (Ryc. 3). Rozpoczyna się ono od połączenia jednej z kullin z białkiem Rbx1/ROC1 oraz z białkiem p120^{CAND1} (ang. cullin-associated and neddylation-dissociated), przy czym jest

to kompleks nieaktywny. Następnie do białek tych dołącza się inny wielopodjednostkowy kompleks sygnalizacyjny, COP9, zwany także sygnałosomem (SCHWECHHEIMER 2004), powodując odłączenie od nich białka p120^{CAND1}. Etapem następnym jest modyfikacja kulliny poprzez dołączenie do niej pokrewnego ubikwityny białka Nedd8 (KAWAKAMI i współaut. 2001, PETROSKI i DESHAIES 2000, PAN i współaut. 2004). Dopiero z tym kompleksem (kullina z dołączonym białkiem Nedd8, białko Rbx1/ROC1, kompleks sygnalizacyjny COP9) łączy się podjednostka Skp1 oraz białko Fbp wraz z substratem mającym ulec ubikwitylacji. Uważa się obecnie, że białko p120^{CAND1} współzawodniczy z podjednostką Skp1 o wiązanie z kulliną, ale tylko wówczas, gdy nie jest ona połączona z białkiem Nedd8 (LIU i współaut. 2002). Proces ubikwitylacji substratu zostaje przerwany w momencie odłączenia od kulliny białka Nedd8, w wyniku działania jednej z podjednostek kompleksu COP9 (deneddyllacja) i kolejno podjednostki Skp1, białka Fbp, po czym następuje odłączenie kompleksu COP9 i dołączenie do pozostałych podjednostek białka p120^{CAND1} i w rezultacie powstaje nieaktywny kompleks ligazowy.

Tak więc, powstawanie aktywnego kompleksu ligazy typu SCF jest bardzo precyzyjnie regulowane przez cykliczne dołączanie i odłączanie różnych białek regulatorowych i z pewnością nie wszystkie aspekty tej regulacji zostały dotąd poznane. Wydaje się, że oprócz białek p120^{CAND1} i Nedd8 również i inne białka mogą wpływać na aktywność ligaz typu SCF. Podejrzewane jest o to na przykład białko Sgt1, wiążące się bezpośrednio z podjednostką Skp1, ale także z białkiem szoku cieplnego Hsp90, co może sprzyjać utrzymywaniu podjednostek ligazy w odpowiedniej konfiguracji (PETROSKI i DESHAIES 2005). Z pewnością najbliższe lata przyniosą informacje jeszcze o innych możliwych mechanizmach regulacyjnych.

Jeszcze bardziej złożona wydaje się być regulacja aktywności ligaz typu APC/C. Najwcześniej poznany mechanizm jest fosforylacja poszczególnych podjednostek, która może prowadzić zarówno do aktywacji, jak i hamowania działania ligazy APC/C (PAGE i HIETHER 1999). Utrzymywanie właściwego poziomu ufosforylowania podjednostek jest wynikiem współpracy licznych kinaz białkowych (w tym kinaz Cdk, kinaz z rodziny Polo, kinazy A) i fosfataz (typu PP1). Należy przypomnieć, że cyklina B, podjednostka re-

gulatorowa kinazy Cdk, jest ubikwitylowana przez ligazę APC/C, a więc dochodzi tu do sprzężenia zwrotnego pomiędzy poziomem aktywnej kinazy fosforylującej ligazę APC/C i aktywnością samej ligazy. Jakie jest fizjologiczne znaczenie fosforylacji ligazy APC/C nie jest w pełni wyjaśnione, nie wydaje się, aby było konieczne do utworzenia i utrzymania aktywnego kompleksu. Przypuszcza się, że jest ono raczej niezbędne do wiązania się kompleksu z podjednostkami regulatorowymi, Cdc20 i Cdh1 (PAGE i HIETHER 1999).

Innym mechanizmem regulującym jest kontrola aktywności ligazy APC/C przez białka działające w punkcie kontrolnym wrzeciona mitotycznego, zwłaszcza przez białka z rodzin MAD i BUB (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 2002b, PAGE i HIETHER 1999, JACKSON 2004). Ich działanie podczas prometafazy i metafazy polega przede wszystkim na uniemożliwieniu połączenia podjednostek regulatorowych z ligazą APC/C w aktywnie działający kompleks, zanim nie zostanie właściwie uformowane wrzeciono kariokinetyczne i ułożone chromosomy w płycie metafazalnej. Natomiast od początku fazy S aż do wczesnej profazy działanie ligazy wyłącza białko inhibitorowe Emi1 (ang. early mitotic inhibitor 1), które, podobnie jak białka punktu kontrolnego

wrzeciona, uniemożliwia, poprzez wiązanie podjednostek regulatorowych, powstanie aktywnej ligazy (JACKSON 2004). Poziom białka Emi1 oscyluje w cyklu komórkowym – jest on najwyższy w fazie S, po czym gwałtownie spada podczas prometafazy na skutek ubikwitylacji przez ligazę SCF, a następnie degradacji. Obecna w cząsteczce inhibitora Emi1 sekwencja DSG (tzw. degron, patrz niżej) musi, przed rozpoznaniem przez białko Fbp(β -TrCP), zostać ufosforylowana przez kinazę Plk1 z rodziny Polo (MOSHE i współaut. 2004).

Ubikwitylacja białka Emi1, inhibitora ligazy APC/C, przez ligazę SCF nie wyczerpuje wzajemnych powiązań tych dwóch kompleksów regulujących przebieg cyklu komórkowego. Wiadomo bowiem, że liczne białka Fbp (Skp2, β -TrCP, Met30) są ubikwitylowane i skierowywane do degradacji właśnie przez ligazę APC/C (BASHIR i współaut. 2004, VODERMAIER 2004, WEI i współaut. 2004). Przedstawione przykłady wskazują na różne możliwości regulacji działania ligaz SCF i APC/C i dokumentują jak wiele precyzyjnych mechanizmów zapewnia, że te kompleksy enzymatyczne mogą działać wybiórczo w stosunku do określonych białek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

PROTEOLIZA WYBRANYCH REGULATORÓW CYKLU KOMÓRKOWEGO

Od lat pojawia się pytanie, czym charakteryzują się białka rozpoznawane przez określone ligazy ubikwitylowe. Szczególne zasługi w wyjaśnianiu tego problemu ma A. Varshavsky, jeden z pionierów badań procesów ubikwitylacji. Zwrócił on uwagę na związek różnej podatności białek na proteolizę od składu aminokwasowego N-końca ich cząsteczki. Zawdzięcza się mu opracowanie tzw. reguły N-końca i wprowadzenie pojęcia degronów, określonych sekwencji aminokwasowych decydujących o stabilności białek (VARSHAVSKY 1996). Substraty ligaz typu SCF, rozpoznawane przez białka Fbp, na ogół muszą być uprzednio fosforylowane i to często w wielu miejscach, a klasycznym przykładem jest inhibitor kinaz Cdk w komórkach drożdży, białko Sic1, fosforylowane przed ubikwitylacją i degradacją aż w sześciu miejscach (NASH i współaut. 2001). Fosforylacji dokonują różne kinazy, w tym często kinazy cyklino-zależne, kinazy MAP czy też kinazy aktywowane w wyniku stresu i działające

w różnych punktach kontrolnych cyklu komórkowego. Inną modyfikacją potranslacyjną białek rozpoznawanych przez białka Fbp (lub pokrewne) jest także hydroksylacja ich reszt prolinowych (WENGER 2002). Tak więc, poprzez fosforylację i hydroksylację białek proces ich degradacji jest ściśle powiązany z różnymi szlakami sygnalizacyjnymi (SUN i CHEN 2004).

W przypadku ligazy APC/C w rozpoznaniu substratów biorą udział jej podjednostki regulatorowe. Pozostaje sprawą dyskusyjną, czy zawsze dochodzi wówczas do bezpośredniej interakcji podjednostki z przeznaczonym do degradacji substratem, chociaż jest to wielce prawdopodobne (VODERMAIER 2004, YAMANO i współaut. 2004). W substratach ligaz APC/C najlepiej opisanymi degronami jest kaseta destrukcyjna (ang. D-box) występująca w cyklinach mitotycznych (GLOTZER i współaut. 1991, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1993) oraz kaseta KEN (ang. KEN box) (PFLEGER i KIRSCHNER 2000, PFLEGER i współaut.

2001)), znajdowana między innymi w fosfatyzie Cdc25 i sekuryinie. W ekstraktach z jaj *Xenopus* może także dochodzić, jak doniesiono ostatnio (YAMANO i współaut. 2004), do względnie stabilnej interakcji degronu D-box obecnego w cyklinie B z jednym z białek kompleksu APC/C, a nie z podjednostką regulatorową. W dalszej części tego artykułu przedstawie degradację wybranych regulatorów cyklu komórkowego – białka p27, fosfatazy Cdc25A oraz sekuryiny.

BIAŁKO P27

Białko p27, jeden z głównych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1995), negatywnie reguluje przebieg cyklu komórkowego. Spadek jego wewnątrzkomórkowego poziomu jest niezbędny, aby komórki pod wpływem stymulacji mitogennej mogły rozpocząć w fazie S syntezę DNA. Fakt, że p27 jest degradowany w proteasomie 26S znany jest od połowy lat 90. ubiegłego wieku. Zidentyfikowano wówczas ligazę przeprowadzającą ubikwitylację tego białka w fazie S, którą okazała się być ligaza SCF z podjednostką Skp2, białkiem z motywem F-box (Ryc. 4). Do ubikwitylacji p27 przez tę ligazę, procesu mającego miejsce w jądrze komórkowym, niezbędne jest ufosforylowanie treoniny w pozycji 187 tego białka, której dokonuje kinaza Cdk2, z cykliną E jako podjednostką regulatorową. Należy podkreślić, że jest to kinaza, której aktywność w fazie G1 hamuje właśnie białko p27. Występuje tu więc pozytywne sprzężenie zwrotne, które zapewnia utrzymywanie się niskiego poziomu inhibitora po aktywacji kinazy Cdk2 i nieodwracalność przejścia komórek z fazy G1 w fazę S. Do efektywnej ubikwitylacji p27 przez ligazę SCF konieczna jest także obecność w kompleksie białka Cks1 (ang. Cdc2-protein kinase regulatory subunit 1), wiążącego się z podjednostką Skp2 i zwiększającego znacząco jego zdolność rozpoznawania i wiązania ufosforylowanego p27 (CARDOZO i PAGANO 2004). Jak wykazano ostatnio, istotny udział w regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu p27 i proliferacji ludzkich komórek ma również enzym E2 (Cdc34) konjugujący ubikwitynę. Obniżenie jego ekspresji przez zastosowanie antysensownego RNA hamuje degradację p27 i prawidłowy przebieg cyklu komórkowego (BUTZ i współaut. 2005).

Proteoliza p27 zachodzi jednak także w fazie G1 cyklu, regulując w znacznym stopniu, niezależnie od procesów transkrypcyjnych i translacyjnych, wewnątrzkomórko-

wy poziom tego inhibitora. Badania ostatnich lat wykazały, że ma ona miejsce także w komórkach nie zawierających białka Skp2, co sugerowało istnienie innego niż ligaza SCF układu ubikwitylującego (Ryc. 4). W 2004 r. zidentyfikowano kompleks dwóch białek, nazywany ligazą KPC (ang. Kip ubiquitylation promoting complex), zdolny do ubikwitylowania p27 po jego wytransportowaniu z jądra do cytoplazmy, co więcej, bez konieczności uprzedniej fosforylacji (KAMURA i współaut. 2004, HENGST 2004). Jedno z białek tworzących ten kompleks, podjednostka KPC1, zawiera domenę RING-finger i bierze udział w rozpoznawaniu p27 oraz w rekrutacji enzymu E2 niosącego zaktywowaną ubikwitynę, drugie białko, KPC2, odpowiedzialne jest za skierowywanie ubikwitylowanego p27 do proteasomu. Tak więc, regulacja poziomu p27 staje się coraz bardziej złożona i widać wyraźnie, że zależnie od lokalizacji tego białka wewnątrz komórki w jego degradacji biorą udział różne kompleksy białkowe.

FOSFATAZA CDC25

Równie istotny dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego, jak poziom białkowych inhibitorów kinaz Cdk, w tym omówionego już białka p27, jest poziom tyrozynowo-treoninowych fosfataz Cdc25A, B i C (DONZELLI i DRAETTA 2003). Enzymy te, kodowane przez gen będący jednym z genów docelowych czynnika transkrypcyjnego c-Myc, przeprowadzają defosforylację ufosforylowanych aminokwasów (Tyr15 i Thr14) znajdujących się w kinazach Cdk we fragmencie odpowiedzialnym za wiązanie ATP (ang. T-loop) i w efekcie powodują aktywację tych enzymów. W regulacji cyklu komórkowego największe znaczenie ma fosfataza Cdc25A działająca przede wszystkim w komórkach będących w fazach S, G2 oraz w końcowych etapach mitozy i we wczesnej mitozie. Fosfatazy Cdc25B i Cdc25C działają zaś w komórkach w fazie G2 i we wczesnej mitozie. O aktywności fosfatazy Cdc25A decyduje w znacznym stopniu poziom ufosforylowania jej domeny regulatorowej przez liczne kinazy białkowe, w tym kinazy Cdk czy kinazy Chk1 i Chk2, aktywowane w warunkach stresu, zwłaszcza po uszkodzeniach DNA (Ryc. 5). Podobnie jak aktywność, wewnątrzkomórkowy poziom fosfatazy Cdc25A podlega precyzyjnej regulacji, zwłaszcza w wyniku degradacji zachodzącej w proteasomie 26S, po ubikwitylacji przeprowadzanej przez ligazy SCF i APC/C (DONZELLI i współaut. 2002,

2003; BUSINO i współaut. 2004). W cząsteczce Cdc25A występują dwa degrony: degron DSG rozpoznawany w fazie S i G2 przez ligazę SCF z białkiem Fbp (β -TrCP) oraz degron KEN, rozpoznawany w końcu mitozy i na początku fazy G1 przez ligazę APC/C z białkiem regulatorowym Cdh1 (BUSINO i współaut. 2004). Dla ubikwitylacji Cdc25A przez ligazę SCF niezbędne jest ufosforylowanie nie tylko reszt serynowych w degronie DSG (kinazy jeszcze nieznane), lecz także następująca wcześniej fosforylacja seryny w przyległym do niego regionie, która wydaje się wpływać na interakcję Cdc25A z białkiem β -TrCP.

Tak precyzyjna regulacja wewnątrzkomórkowego poziomu fosfatazy Cdc25A jest konieczna dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego. Często występująca nadekspresja tego enzymu (na poziomie mRNA i białka) w wielu nowotworach, a także obecność w nich zmutowanych form enzymu o podwyższonej stabilności i w efekcie konstytutywnej aktywności, może w konsekwencji wywoływać niestabilność genomową komórek i stwarzać warunki do powstawania nowotworów. Ostatnio publikowane badania wskazują, że różne związki przeciwnowotworowe w odmienny sposób wpływają na szybkość i intensywność degradacji fosfatazy Cdc25A, czego dalszym efektem jest ich zróżnicowany wpływ między innymi na intensywność syntezy DNA (AGNER i współaut. 2005).

SEKURYNA

Degradacja sekuryny jest kluczowym wydarzeniem w mitozie (Ryc. 6). Białko to jest inhibitorem enzymu – separazy, proteazy cysteinowej degradującej jedno z białek kom-

pleksu kohezyjnego (białko Scc1), które spaja chromatydy aż do momentu ich rozdzielenia w anafazie (NASMYTH i współaut. 2000, WAIZENEGGER 2002). Proteoliza sekuryny, która przesłania centrum aktywne separazy i utrudnia dostęp do niego substratu, rozpoczyna się w metafazie, natomiast masywna jej destrukcja następuje później, po inaktywacji punktu kontrolnego wrzeciona (NASMYTH 1999, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 2002b, HAGTING i współaut. 2002). Ubikwitylacji sekuryny dokonuje ligaza APC/C, której podjednostki regulatorowe Cdc20 i Cdh1 rozpoznają obecne w jej cząsteczce domeny D-box i KEN-box (Ryc. 6). Zahamowanie ekspresji sekuryny, bądź obecność jej zmutowanej, nie ulegającej degradacji formy, wywołuje w komórkach Hela bardzo poważne zaburzenia przebiegu mitozy, w tym utratę części chromosomów, nieprawidłowe anafazy, a nawet sprawia, że wszystkie chromatydy „dziedziczy” tylko jedna komórka.

Przynajmniej w komórkach ludzkich sekuryna nie tylko działa jako inhibitor separazy, lecz jest także niezbędna do powstawania aktywnej formy tego enzymu (WAIZENEGGER i współaut. 2002, HORNIG i współaut. 2002), jednakże na czym polega to działanie sekuryny nie jest jeszcze wyjaśnione. Drugim mechanizmem decydującym o hamowaniu aktywności separazy jest jej fosforylacja, przeprowadzana w metafazie prawdopodobnie przez kinazę Cdk2 (z Cykliną B1) i/lub kinazy z rodziny kinaz MAPK. Do pełnej aktywności tej proteazy w anafazie wydaje się niezbędna nie tylko degradacja jej inhibitora – sekuryny, ale także jej defosforylacja (STEMMANN i współaut. 2001). Na ile ten mechanizm jest powszechny pokażą dalsze badania.

PRZYKŁADY ZABURZEŃ UKŁADU UBIKWITYNA/PROTEASOM

Regulacja funkcjonowania układu ubikwityna/proteasom może odbywać się na poziomie procesów prowadzących do ubikwitylacji substratów i/lub aktywności proteolitycznej proteasomu. Musi być ona bardzo precyzyjna, gdyż wszelkie zakłócenia przebiegu tych procesów mają bardzo poważne konsekwencje dla komórek, są też przyczyną wielu schorzeń (CIECHANOVER i IWAI 2004, CIECHANOVER i SCHWARTZ 2004). Stany patologiczne związane z układem ubikwityna/proteasom mogą być skutkiem zarówno obniżonej, jak i przyspieszonej proteolizy substratów. Mogą one

wynikać z utraty lub spotęgowania funkcji poszczególnych enzymów biorących udział w ubikwitylacji, a także z nieprawidłowości przebiegu potranslacyjnych modyfikacji białek warunkujących ich degradację.

Oslabienie działania proteasomu następuje na ogół wraz z wiekiem i jest najprawdopodobniej wynikiem obniżonej syntezy białek tworzących podjednostki proteasomu oraz zmian ich struktury, a także pojawiania się w komórkach nieprawidłowych białek hamujących działanie proteasomu. (CARRARD i współaut. 2002). Niższą aktywność prote-

asomu i brak proteolizy wielu białek, w tym białek proapoptotycznych, stwierdza się także w komórkach ulegających apoptozie. Uaktywnione w tych komórkach kaspazy degradują bowiem określone białka podjednostki regulatorowej proteasomu, istotne w interakcjach pomiędzy białkami kompleksu regulatorowego oraz w rozpoznaniu ubiquitylowanego substratu (SUN i współaut. 2004).

Natomiast intensywne uaktywnienie działania proteasomu ma miejsce w tzw. chorobach „katabolicznych” jak kacheksja, posocznica, silne zranienia (HASSELGREN i współaut. 2002, CIECHANOVER i IWAI 2004, CIECHANOVER i SCHWARTZ 2004), w dużej mierze związane z indukcją mięśniowych ligaz ubiquitylowych. Nadmiernie aktywny układ ubiquitytyna/proteasom działa także w chorobach o podłożu immunologicznym, w chorobach układu oddechowego (mukowiscydoza), czy w różnego typu niewydolności nerek, w tym w dziedzicznym nadciśnieniu nerkowym (DEBIGARE i PRICE 2003).

Nieprawidłowe funkcjonowanie układu ubiquitytyna/proteasom występuje też w wielu chorobach neurodegeneracyjnych, w tym w chorobie Parkinsona, Alzheimerza, Huntingtona i różnego typu ataksjach rdzeniowo-mózdkowych (CIECHANOVER i IWAI 2004, CIECHANOVER i SCHWARTZ 2004, ROSS i PICKART 2004). W neuronach i neurytach mózgu osób chorych obserwuje się nagromadzanie białek o zaburzonej strukturze, zawierających wiele cząsteczek glutaminy, często w połączeniu z ubiquityną, a także agregatów białkowych w postaci złogów i płytek, które także są często ubiquitylowane. W jednej z form choroby Parkinsona (ang. autosomal recessive juvenile parkinsonism, AR-JP) obecna jest zmutowana ligaza ubiquitylowa, parkina, co powoduje nagromadzanie się w komórkach jej nieodegradowanych substratów, prawdopodobnie toksycznych dla neuronów dopaminergicznych. W chorobie Alzheimerza stwierdza się obecność w mózgu pacjentów ubiquitytyny połączonej z ufosforylowanym białkiem Tau, występowanie zmutowanej ubiquitytyny, hamującej aktywność proteolityczną proteasomu, a także obserwuje się spadek aktywności enzymów aktywujących i przenoszących ubiquitynę. Pozostaje sprawą otwartą, czy te nieprawidłowości są przyczyną czy skutkiem występowania tych schorzeń.

Bardzo wiele różnego typu zaburzeń układu ubiquitytyna/proteasom występuje w komórkach nowotworowych. Są to przede wszystkim zaburzenia działania ligaz ubiquity-

tylowych (FANG i współaut. 2003, GUARDAVACCARO i PAGANO 2004, OHTA i FUKUDA 2004). Mogą one polegać na amplifikacji genów kodujących kulliny (komórki raka wątroby, nowotworu piersi) czy też na amplifikacji i mutacjach genów kodujących białka z motywem F-box (komórki raka piersi, raka przewodu pokarmowego, różnych nowotworów jamy ustnej). W efekcie może dochodzić do zmian poziomu różnych regulatorów cyklu sprzyjających niekontrolowanej proliferacji komórek. Szczególnie dużo badań dotyczy udziału białka Skp2, bardzo często o podwyższonej ekspresji w wielu nowotworach, w regulacji poziomu inhibitora p27. Okazało się bowiem, że wysoki poziom ekspresji tego białka rozpoznającego p27 znacząco i bezpośrednio koreluje z występowaniem nowotworów i ich agresywnością, a także złym prognozowaniem na przykład w ludzkich białaczkach, raku prostaty, raku jajników i płuc (FANG i współaut. 2003, OHTA i FUKUDA 2004). Co więcej, białko Skp2 bierze także udział w ubiquitylacji białka c-Myc, która nie wywołuje jego degradacji, lecz stabilizuje to białko i zwiększa jego aktywność transkrypcyjną, co ma duże znaczenie w stymulacji proliferacji komórek (GUARDAVACCARO i PAGANO 2004). Nieprawidłowe funkcjonowanie białka „łącznikowego” Skp1 w ligazie typu SCF również może prowadzić do niestabilności genomowej i transformacji nowotworowej komórek (PIVA i współaut. 2002).

Z powstawaniem wysoce unaczynionych nowotworów ma też związek białko pVHL, pełniące w ligazie VHL (pokrewnej ligazie SCF) tę samą funkcję co białko z motywem F-box. Decyduje ono o ubiquitylacji i degradacji w proteasomie czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α (ang. hypoxia-inducible factor), który reguluje ekspresję genów indukowanych w komórkach podczas niedotlenienia, w tym czynnika wzrostu komórek endotelialnych (VEGF) oraz jego receptora, endoteliny, syntazy tlenu azotu czy też kilku enzymów biorących udział w glikolizie. W wyniku braku białka pVHL lub w obecności jego zmutowanych form, sytuacji występującej w chorobie von Hippel-Lindau, dochodzi do zaburzeń działania ligazy VHL i w efekcie konstytutywnej ekspresji czynnika transkrypcyjnego HIF- α i aktywacji transkrypcji regulowanych przez niego genów. Sprzyja to procesom angiogenezy i powstawaniu nowotworów, zwłaszcza nowotworów nerek (WENGER 2002).

W wielu nowotworach zaburzone jest również funkcjonowanie monomerycznych

ligaz ubikwitylowych, takich jak na przykład ligaza MDM2, odpowiedzialna przede wszystkim za degradację białka supresorowego p53 (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 2004), czy też wspomniana już ligaza CHFR. Jej epigenetyczna inaktywacja w wyniku wyciszania ekspresji genu *Chfr* poprzez metylację reszt cy-

tozyny i guaniny w DNA ma miejsce na przykład w ludzkich nowotworach płuc (MIZUNO i współaut. 2002). Przedstawione przykłady zaburzeń układu ubikwityna/proteasom wyraźnie dokumentują jego znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek.

CZY MOŻLIWA JEST FARMAKOLOGICZNA INTERWENCJA W DZIAŁANIE UKŁADU UBIKWITYNA/PROTEASOM?

Odpowiedź na to pytanie brzmi twierdząco, a każdy rok przynosi doniesienia o nowych związkach zdolnych do hamowania, przynajmniej w niektórych typach komórek, niepożądaną proteolizę białek. Obecnie blokowanie działania proteasomu zaczyna się nawet traktować jako nowe, niestandardowe, obiecujące podejście terapeutyczne w leczeniu wielu schorzeń (VOORHEES i współaut. 2003). Pierwszymi badanymi inhibitorami układu ubikwityna/proteasom były różnego typu analogi peptydów, odznaczające się zdolnością hamowania przede wszystkim chymotrypsynowej aktywności proteasomu, ale także aktywności proteaz lizosomalnych oraz niektórych proteaz cysteinowych i serynowych (LEE i GOLDBERG 1998). Mimo braku wybiórczej specyficzności w stosunku do proteasomu, jedna z tego typu pochodnych, bortezomib (Velcade; PS-341) znalazła już zastosowanie w leczeniu szpiczaka mnogiego (LEE i GOLDBERG 1998), a znacznie zaawansowane badania kliniczne wskazują na możliwość stosowania tego związku także w leczeniu innych chorób pochodzenia hematologicznego (RICHARDSON 2003). Są też dane wskazujące, że bortezomib może uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie tradycyjnych chemioterapeutyków czy też radioterapię.

Klasycznym, wysoce specyficznym inhibitorem działania proteasomu jest produkt pochodzenia bakteryjnego, laktacystyna (FENTANY i SCHREIBER 1998). Łączy się ona i acetyluje duże podjednostki β proteasomu i w efekcie hamuje wszystkie jego aktywności proteolityczne (nieodwracalnie aktywność chymotrypsynową i trypsynową, odwracalnie kaspazową). Ze względu na to, że laktacystyna, a zwłaszcza jej β -lakton, nie hamują proteaz cysteinowych, serynowych i lizosomalnych, związki te są niezastąpione w badaniu efektów zablokowania działania proteasomu na funkcjonowanie komórek (LEE i GOLDBERG 1998). Również 4-hydroksy nonenal, al-

dehydowa pochodna nienasyconych kwasów tłuszczowych, zdolny jest do modyfikowania jednej z podjednostek proteasomu i hamowania jego aktywności chymotrypsynowej (FERRINGTON i KAPPAHN 2004).

Ubistatyny są innego typu inhibitorami proteolizy białek w układzie ubikwityna/proteasom (VERMA i współaut. 2004b). Te niskocząsteczkowe związki wchodzą w interakcję z poliubikwitylowym łańcuchem dołączonym do białek przeznaczonych do degradacji, uniemożliwiają jego rozpoznanie i wiązanie przez podjednostkę regulatorową proteasomu i tym samym blokują rozpoczęcie degradacji białka. Na poziomie rozpoznania białkowego substratu nie przez proteasom, a przez odpowiednią ligazę ubikwitylową (białko MDM2) wydaje się natomiast działać nutlina, inhibitor degradacji białka supresorowego p53 (VASSILEV i współaut. 2004).

Obecnie myśli się też o innych niż omówione potencjalnych miejscach interwencji w działanie tego układu, jak na przykład blokowanie wiązania enzymu E2 niosącego zaktywowaną ubikwitynę do odpowiedniej ligazy, czy też hamowanie działania peptydaz odszczepiających łańcuch poliubikwitylowy od substratu jeszcze przed rozpoznaniem go przez proteasom (BELLOWS i TYERS 2004). Wydaje się, że zsyntetyzowanie związków blokujących powyższe procesy jest tylko kwestią czasu.

Niekiedy konieczne staje się nie zahamowanie proteolizy określonych białek, a wręcz jej przyspieszenie. Wówczas właściwym celem terapeutycznym stają się przede wszystkim ligazy ubikwitylowe, niezbędne do ostatniego etapu modyfikacji białka (PRAY i współaut. 2002, SUN 2003). Od kilku lat podejmowane są też próby precyzyjnego kierowania wybranych białek na drogę proteolizy przy użyciu chimerycznych białek adaptorowych typu Protac (ang. proteolysis targeting chimeric molecule) (SAKAMOTO i współaut. 2003)), czy też chimerycznych ligaz ubikwi-

tylowych zawierających dwie domeny Ring finger (OYAKE i współaut. 2002). Przy zastosowaniu tej strategii uzyskano pozytywne wyniki w badaniach proteolizy receptorów estradiolu i dihydrotestosteronu, a także jednego z inhibitorów cyklu komórkowego, białka p57. Czy metody te będą odpowiednie dla ukierunkowanej proteolizy innych białek pokażą dalsze badania.

Należy zdawać sobie sprawę, że modyfikowanie białek ubikwityną, to nie tylko „pocałunek śmierci”, jak obrazowo nazwali ten proces dziennikarze piszący o osiągnięciach laureatów nagrody Nobla. Ubikwityna uczestniczy bowiem także w regulacji transkrypcji biorąc udział w degradacji aktywatorów bądź

inhibitorów tego procesu lub składników kompleksu transkrypcyjnego, modyfikacjach histonów oraz w regulacji działania wielu czynników transkrypcyjnych. Jest też niezbędna, jak już wspomniano, w regulacji endocytozy licznych białek błonowych, w tym receptorów czynników wzrostu i podjednostek kanałów jonowych, w regulacji apoptozy, namnażaniu wirusów i ich uwalnianiu z komórek. I z pewnością nie są to wszystkie procesy, w których może uczestniczyć ubikwityna, jak również pokrewne jej białka.

Autorka bardzo serdecznie dziękuje dr Magdalenie Dudkowskiej za pomoc w opracowaniu i wykonanie rysunków.

NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY IN 2004 FOR UBIQUITIN-DEPENDENT PROTEIN DEGRADATION

Summary

In the article Nobel laureates in chemistry for 2004 – Irvine Rose, Avram Hershko and Aron Ciechanover – and their achievements in elucidating the ubiquitin-mediated protein degradation are presented and the function of ubiquitin in this process is shortly reviewed. Moreover, ubiquitin ligases involved in

the ubiquitylation of the main cell cycle regulators as well as the mechanisms regulated by their activities are described. Examples of the abnormalities of functioning of the ubiquitin/proteasome system in various diseases and possibilities of pharmacological intervention in its action are also presented.

LITERATURA

- AGNER J., FALCK J., LUKAS J., BARTEK J., 2005. *Differential impact of diverse anticancer chemotherapeutics on the Cdc25A-degradation checkpoint pathway*. Exp. Cell Res. 302, 162–169.
- BASHIR T., DORRELLO N. V., AMADOR V., GUARDAVACCARO D., PAGANO M., 2004. *Control of the SCF^{Skp2-Cks1} ubiquitin ligase by the APC/C^{Cdh1} ubiquitin ligase*. Nature 428, 190–193.
- BELLOWS D. S., TYERS M., 2004. *Chemical genetics hits „reality”*. Science 306, 67–68.
- BORNSTEIN G., BLOOM J., SITRY-SHEVAH D., NAKAYAMA K., PAGANO M., HERSHKO A., 2003. *Role of the SCF^{Skp2} ubiquitin ligase in the degradation of p21^{Cip1} in S phase*. J. Biol. Chem. 278, 25752–25757.
- BUSINO L., CHIESA M., DRAETTA G. F., DONZELLI M., 2004. *Cdc25 phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis*. Oncogene 23, 2050–2056.
- BUTZ N., REUTZ S., ATT F., HALL J., WEILER J., MESTAN J., DUCARRE M., GROSSENACHER R., HAUSER P., KEMPF D., HOFMANN F., 2005. *The human ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 controls cellular proliferation through regulation of p27^{Kip1} protein levels*. Exp. Cell Res. 303, 482–493.
- CARDOZO T., PAGANO M., 2004. *The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine*. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 5, 739–751.
- CARRARD G., BULTEAU A. L., PETROPOULOS I., FRIGUET B., 2002. *Impairment of proteasome structure and function in aging*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 34, 1461–1474.
- CHUNG C. H., BAEK S. H., 1999. *Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 266, 633–640.
- CIECHANOVER A., IWAI K., 2004. *The ubiquitin-system: from basic mechanisms to the patient bed*. IUBMB Life 56, 193–201.
- CIECHANOVER A., SCHWARTZ A. L., 2004. *The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting*. Biochim. Biophys. Acta 1695, 3–17.
- CIECHANOVER A., ORIAN A., SCHWARTZ A. L., 2000. *Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction*. BioEssays 22, 442–451.
- CRAIG K. L., TYERS M., 1999. *The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction*. Prog. Biophys. Mol. Biol. 72, 299–328.
- DEBIGARE R., PRICE S. R., 2003. *Proteolysis, the ubiquitin-proteasome system, and renal diseases*. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 285, F1–8.
- DONZELLI M., DRAETTA G. F., 2003. *Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation*. EMBO Rep. 4, 671–677.
- DONZELLI M., SQUATRITO M., GANOTH D., HERSHKO A., PAGANO M., DRAETTA G. F., 2002. *Dual mode of degradation of Cdc25A phosphatase*. EMBO J. 21, 4875–4884.
- FANG S., LORICK K. L., JENSEN J. P., WEISSMAN A. M., 2003. *RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer*. Semin. Cancer Biol. 13, 5–14.

- FENTEANY G., SCHREIBER S. L., 1998. *Lactacystin, proteasome function, and cell fate*. J. Biol. Chem. 273, 8545–8548.
- FERRINGTON D. A., KAPPAHN R. J., 2004. *Catalytic site-specific inhibition of the 20S proteasome by 4-hydroxynonenal*. FEBS Lett. 578, 217–223.
- FINLEY D., CIECHANOVER A., VARSHAVSKY A., 2004. *Ubiquitin as a central cellular regulator*. Cell 116, S29–S32.
- FÖRSTER A., HILL C. P., 2003. *Proteasome degradation: enter the substrate*. Trends Cell Biol. 13, 550–553.
- GLOTZER M., MURRAY A. W., KIRSCHER M. W., 1991. *Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway*. Nature 349, 132–138.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1993. *Degradacja cyklin jako niezbędny element regulacyjny cyklu komórkowego*. Post. Biochem. 39, 16–25.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1995. *Regulacja cyklu komórkowego – udział białkowych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych*. Post. Biochem. 41, 81–93.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 2002a. *Proteoliza białek regulujących przebieg cyklu komórkowego – udział ubikwitinacji*. Post. Biochem. 48, 34–47.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 2002b. *Punkty kontrolne cyklu komórkowego, czy znamy ich molekularne podłoże?* Post. Biol. Kom. 29, 157–175.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 2004. *Oligo- i monomeryczne ligazy ubikwitinowe E3 z domeną RING finger – budowa i działanie*. Post. Biol. Kom. 31, 373–392.
- GUARDAVACCARO D., PAGANO M., 2004. *Oncogenic aberrations of cullin-dependent ubiquitin ligases*. Oncogene 23, 2037–2049.
- GUTERMAN A., GLICKMAN M. H., 2004. *Deubiquitinating enzymes are IN/(trinsic to proteasome function)*. Curr. Protein Pept. Sci. 5, 201–211.
- HAGLUND K., DI FIORE P. P., DIKIC I., 2003. *Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis*. Trends Biochem. Sci. 28, 598–603.
- HAGTING A., DEN ELZEN N., VODERMAIER H. C., WAIZENEGGER I. C., PETERS J. M., PINES J., 2002. *Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1*. J. Cell Biol. 157, 1125–1137.
- HARTMANN-PETERSEN R., GORDON C., 2004. *Protein degradation: recognition of ubiquitinated substrates*. Curr. Biol. 14, R754–R756.
- HASSELGREN P. O., WRAY C., MAMMEN J., 2002. *Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 290, 1–10.
- HERSHKO A., CIECHANOVER A., HELLER H., HAAS A. L., ROSE I. P., 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.
- HERSHKO A., CIECHANOVER A., VARSHAVSKY A., 2000. *The ubiquitin system*. Nature Med. 6, 1073–1081.
- HENGST L., 2004. *A second RING to destroy p27^{Kip1}*. Nature Cell Biol. 6, 1153–1155.
- HORNIG N., KNOWLES P. P., McDONALD N., UHLMANN F., 2002. *The dual mechanism of separase regulation by securin*. Curr. Biol. 12, 973–982.
- JACKSON P. K., 2004. *Linking tumor suppression, DNA damage at the anaphase-promoting complex*. Trends Cell Biol. 14, 331–334.
- KAMURA T., HARA T., MATSUMOTO M., ISHIDA N., OKUMURA F., HATAKEYAMA S., YOSHIDA M., NAKAYAMA K., NAKAYAMA K. I., 2004. *Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27^{Kip1} at G1 phase*. Nat. Cell Biol. 6, 1229–1235.
- KANG D., CHEN J., WONG J., FANG G., 2002. *The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition*. J. Cell Biol. 156, 249–259.
- KAWAKAMI T., CHIBA T., SUZUKI T., IWAI K., YAMANAKA K., MINATO N., SUZUKI H., SHIMBARA N., HIDAKA Y., OSAKA F., OMATA M., TANAKA K., 2001. *NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase*. EMBO J. 20, 4003–4012.
- KREK W., 2003. *BTB proteins as henchmen of Cul3-based ubiquitin ligases*. Nature Cell Biol. 5, 950–951.
- LEE D. H., GOLDBERG A. L., 1998. *Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists*. Trends Cell Biol. 8, 397–403.
- LIU J., FURUKAWA M., MATSUMOTO T., XIONG Y., 2002. *NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120^{CAND1}, an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases*. Mol. Cell 10, 1511–1518.
- MADURA K., 2004. *Rad23 and Rpn10: perennial wall-flowers join the m  le*. Trends Biochem. Sci. 29, 637–640.
- MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA M., 1996. *Dekarboksylaza ornitynowa jedynym nieubikwitinowanym białkiem degradowanym przez 26S proteasomę?* Post. Biochem. 42, 113–119.
- MIZUNO K., OSADA H., KONISHI H., TATEMATSU Y., YATABE Y., MITSUDOMI T., FUJII Y., TAKAHASHI T., 2002. *Aberrant hypermethylation of the CHFR prophase checkpoint gene in human lung cancers*. Oncogene 21, 2328–2333.
- MOSHE Y., BOULAIRE J., PAGANO M., HERSHKO A., 2004. *Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101, 7937–7942.
- NASH P., TANG X., ORLICKY S., CHEN Q., GERTIER F. B., MENDENHALL M. D., SICHERI F., PAWSON T., TYERS M., 2001. *Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication*. Nature 414, 514–521.
- NASMYTH K., 1999. *Separating sister chromatids*. Trends Biochem. Sci. 24, 98–104.
- NASMYTH K., PETERS J. M., UHLMANN F., 2000. *Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatid*. Science 288, 1379–1385.
- OHTA T., FUKUDA M., 2004. *Ubiquitin and breast cancer*. Oncogene 23, 2079–2088.
- OYAKE D., NISHIKAWA H., KOIZUKA I., FUKUDA M., OHTA T., 2002. *Targeted substrate degradation by an engineered double RING ubiquitin ligase*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 295, 370–375.
- PAGE A. M., HIETER P., 1999. *The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators*. Annu. Rev. Biochem. 68, 583–609.
- PAN Z. Q., KENTISIS A., DIAS D. C., YAMOAH K., WU K., 2004. *Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction*. Oncogene 23, 1985–1997.
- PETROSKI M. D., DESHAIES R. J., 2005. *Function and regulation of cullin-ring ubiquitin ligases*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 9–20.
- Pfleger C. M., KIRSCHNER M. W., 2000. *The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1*. Genes Dev. 14, 655–665.
- PFLEGER C. M., LEE E., KIRSCHNER M. W., 2001. *Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex*. Genes Dev. 15, 2396–2407.
- PICKART C. M., 2001. *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu. Rev. Biochem. 70, 503–533.
- PICKART C. M., COHEN R. E., 2004. *Proteasomes and their kin: proteases in the machine age*. Nat. Rev. Mol. Cell 5, 177–187.
- PIOTROWSKA U., 1993. *Struktura i funkcja ubikwityny*. Post. Biochem. 39, 8–16.

- PIVA R., CHIARLE R., PODDA A., PAGANO M., INGHIRAMI G., 2002. *In vivo interference with Skp1 function leads to genetic instability and neoplastic transformation*. Mol. Cell. Biol. 22, 8375–8387.
- PRAY T. R., PARLATI F., HUANG J., WONG B. R., PAYAN D. G., BENNETT M. K., ISSAKANI S. D., MOLINEUX S., DEMO S. D., 2002. *Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets*. Drug Resist. Updat. 5, 249–258.
- RICHARDSON P., 2003. *Clinical update: proteasome inhibitors in hematologic malignancies*. Cancer Treat. Rev. 29, 33–39.
- ROSS C. A., PICKART C. M., 2004. *The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases*. Trends Cell Biol. 14, 703–711.
- SAKAMOTO K. M., KIM K. B., VERMA R., RANSICK A., STEIN B., CREWS C. M., DESHAIES J. R., 2003. *Development of proteact to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation*. Mol. Cell. Proteomics 2.12, 1350–1358.
- SCHNELL J. D., HICKE L., 2003. *Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins*. J. Biol. Chem. 278, 35857–35860.
- SCHWARTZ D. C., HOCHSTRASSER M., 2003. *A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers*. Trends Biochem. Sci. 8, 321–328.
- SCHWECHHEIMER C., 2004. *The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development*. Biochim. Biophys. Acta 1695, 45–54.
- SHCHERBIK N., HAINES D. S., 2004. *Ub on the move*. J. Cell. Biochem. 93, 11–19.
- STEMMANN O., ZOU H., GERBER S. A., GYGI S. P., KIRSCHNER M. W., 2001. *Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase*. Cell 107, 715–726.
- SUN Y., 2003. *Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy*. Cancer Biol. Ther. 2, 623–629.
- SUN L., CHEN Z. J., 2004. *The novel functions of ubiquitination in signaling*. Curr. Opin. Cell Biol. 16, 119–126.
- SUN X. M., BUTTERWORTH M., MAC FARLANE M., DUBIEL W., CIECHANOVER A., COHEN G. M., 2004. *Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis*. Mol. Cell 14, 81–93.
- TOUITOU R., RICHARDSON J., BOSE S., NAKANISHI M., RIVETT J., ALLDAY M. J., 2001. *A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome*. EMBO J. 20, 2367–2375.
- VARSHAVSKY A., 1996. *The N-end rule: functions, mysteries, uses*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12142–12149.
- VASSILEV L. T., VU B. T., GRAVES B., CARVAJAL D., PODLASKI F., FILIPOVIC Z., KONG N., KAMMLOTT U., LUKACS C., KLEIN C., FOTOUHI N., LIU E. A., 2004. *In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2*. Science 303, 844–848.
- VERMA R., ARAVIND L., OANIA R., MCDONALD W. H., YATES J. R. 3rd, KOONIN E. V., DESHAIES J. R., 2002. *Role of Rpn 11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome*. Science 298, 611–615.
- VERMA R., OANIA R., GRAUMANN J., DESHAIES J. R., 2004a. *Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system*. Cell 118, 99–110.
- VERMA R., PETERS N. R., D'ONOFRIO M., TOCHTROP G. P., SAKAMOTO K. M., VARADAN R., ZHANG M., COFINO P., FUSHMAN D., DESHAIES J. R., KING R. W., 2004b. *Ubistatins inhibit proteasome-dependent degradation by binding the ubiquitin chain*. Science 306, 117–120.
- VEW P. R., 2001. *Ubiquitin-mediated proteolysis of vertebrate G1- and S-phase regulators*. J. Cell Physiol. 187, 1–10.
- VODERMAIER H. C., 2004. *APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle*. Curr. Biol. 14, R787–R796.
- VOGES D., ZWICKL P., BAUMEISTER W., 1999. *The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis*. Annu. Rev. Biochem. 68, 1015–1068.
- VOORHEES P. M., DEES E. C., O'NEIL B., ORLOWSKI R. Z., 2003. *The proteasome as a target for cancer therapy*. Clin. Cancer Res. 9, 6316–6325.
- WAIZENEGGER I. C., GIMÉNEZ-ABIÁN J. F., WERNICK D., PETERS J. M., 2002. *Regulation of human separase by securin binding and autocleavage*. Curr. Biol. 12, 1368–1378.
- WEI W., AYAD N. G., WAN Y., ZHANG G. J., KIRSCHNER M. W., KAEHLIN W. G., Jr, 2004. *Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex*. Nature 428, 194–198.
- WEISSMAN A. M., 2001. *Themes and variations on ubiquitylation*. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2, 169–178.
- WENGER R. H., 2002. *Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression*. FASEB J. 16, 1151–1162.
- WILKINSON K. D., 2004. *Ubiquitin: a Nobel protein*. Cell 119, 741–745.
- WING S. S., 2003. *Deubiquitinating enzymes – the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 35, 590–605.
- WÓJCIK C., 1995. *Proteasomy i szlak degradacji białek zależny od ubikwityny*. Post. Biol. Kom. 22, 295–315.
- YAMANO H., GANNON J., MAHBUBANI H., HUNT T., 2004. *Cell cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in Xenopus egg extracts*. Mol. Cell 13, 137–147.
- ZWICKL P., SEEMULLER E., KAPELARI B., BAUMEISTER W., 2001. *The proteasome: a supramolecular assembly designed for controlled proteolysis*. Adv. Protein Chem. 59, 87–222.