

PROTEASOME

I. TỔNG QUAN VỀ PROTEASOME

- **Proteasomes** là phức hợp protein bên trong tất cả các eukaryote và cổ vi khuẩn, cũng như trong một số vi khuẩn.
- Chức năng chính của proteasome là tiêu hủy các protein không cần thiết hoặc bị hỏng qua quá trình phân giải protein.

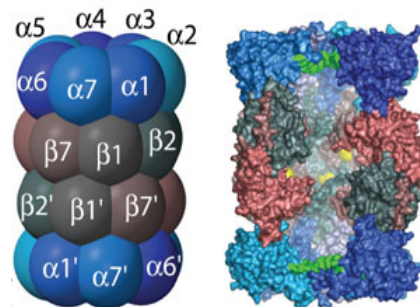
Khám phá ra proteasome

- TS Aaron Ciechanover (57 tuổi) và TS Avram Hershko (67 tuổi) thuộc Viện Công nghệ Israel và
- TS Irwin Rose (78 tuổi thuộc ĐH California Mỹ)

II. Cấu trúc của các Proteasome

1. The 20S core particle

- Tiểu phần α là 2 vòng ở phía ngoài.
- Tiểu phần β là hai vòng bên trong.
- Mỗi vòng là cấu trúc của 7 protein khác nhau xếp đối xứng.
- 4 vòng này kết dính lại với nhau.



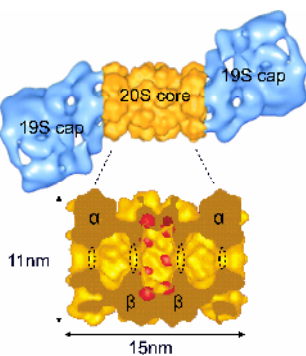
2. Chức năng của khoang 20S

- Các proteasome hiện diện 1 type protease duy nhất, đó là protease threonine. Đóng vai trò trung tâm phân giải protein.
- Khi cơ chất protein ở dạng thẳng đi vào trong khoang 20S, các liên kết peptide sẽ bị cắt đứt tạo thành các đoạn 8-9 amino acid.

2. The regulatory particle

a) 19S regulatory particle

- Có 2 phân tử giống nhau, kết hợp ở 2 phía của lõi 20S tạo thành proteasome 26S.
- Mỗi phân tử được cấu tạo từ 19 protein khác nhau.
- Trong đó có 6 phân tử là **ATPases**.
- Một vài phân tử có vị trí nhận biết các phân tử **ubiquitin**.
- Cấu trúc này còn được gọi là PA700.

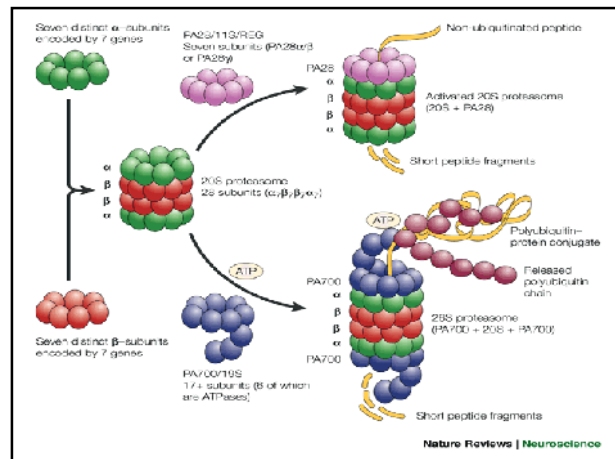


b) Tiểu phần điều hòa 11S

- Có 2 phân tử giống nhau, kết hợp ở 2 phía của lõi 20S tạo thành proteasome 20S.
- Mỗi phân tử là một vòng có cấu trúc của 7 protein khác nhau, nhưng không có ATPase.
- Proteasome 20S này có thể phân cắt các đoạn peptide ngắn không phải là protein.
- Cấu trúc này còn được gọi là PA28 hoặc REG.

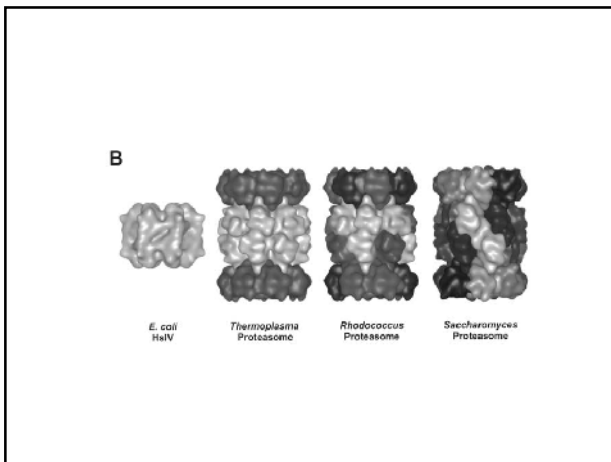
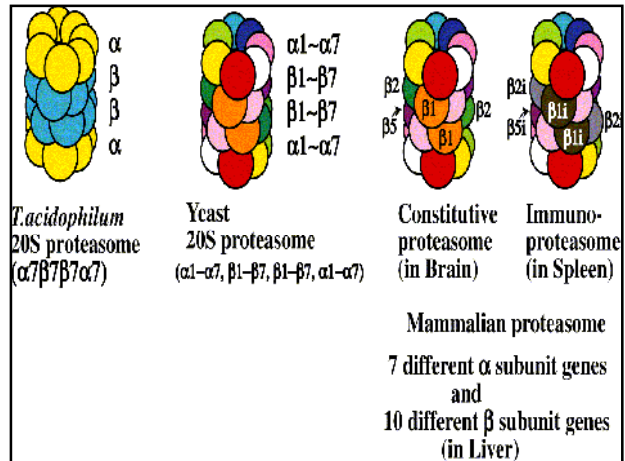
4. Phân biệt chức năng 20S và 26S

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Proteasome 20S <ul style="list-style-type: none"> – Phân cắt các đoạn peptide ngắn, không phải là protein. – Các đoạn peptide không gắn với Ubiquitin – Không phụ thuộc ATPase | <ul style="list-style-type: none"> • Proteasome 26S <ul style="list-style-type: none"> – Phân cắt các protein. – Các protein kết hợp với Ubiquitin (là một protein gồm 76 amino acid). – Có phụ thuộc ATPase |
|--|---|



c) Vai trò điều hòa của 20S do 19S

- Các 19S chịu trách nhiệm điều hòa sự phân giải protein ở 20S. Chức năng chính của 19S là điều hòa ATPases để khóa lối vào lối 20S, sau đó ngăn chặn sự đi vào trong khoang 20S của các cơ chất.



IV. Hệ thống Proteasome-Ubiquitin

- Ở eukaryotes, hầu hết quá trình phân giải protein xảy ra thông qua hệ thống ubiquitin-proteasome.
- Các chất nền đầu tiên sẽ được gắn chuỗi polyubiquitin và sau đó sẽ bị phân cắt bởi proteasome 26S.

- Protein nào cần được phân giải sẽ được biến đổi mất đi một Lysine, hay còn gọi là quá trình gắn ubiquitin và đòi hỏi sự phối hợp phản ứng của ba enzym: E1, E2, E3.
- Sau quá trình này các protein mục tiêu sẽ được gắn thêm chuỗi poly-ubiquitin, tức là nó đã được đánh dấu cho quá trình phân cắt (substrate-ubiquitin).
- Ở TV, quá trình biến đổi protein được điều hòa bởi ubiquitin/26S proteasome góp phần quan trọng cho sự phát sinh phôi, phát tín hiệu hormon và sự lão suy.

VI. Quá trình lắp ráp

- Việc gắn kết các proteasome là một quá trình phức tạp do sự kết hợp các tiểu phần. Các tiểu phần β được tổng hợp từ các propeptide đầu N và được biến đổi sau quá trình dịch mã trong quá trình lắp ráp của lối 20S để trình diện vị trí hoạt động trong Proteolysis.
- Sự kết hợp của các vòng β từ hai nửa proteasomes tạo ra quá trình tự phân giải phụ thuộc vào threonine của các propeptides để trình diện vị trí hoạt động. Các phản ứng lắp ráp vòng β chủ yếu là các liên kết muối và kỵ nước với xoắn α , nếu bị gián đoạn do đột biến có thể phá hủy khả năng gắn kết proteasome.
- Việc lắp ráp của một nửa-proteasomes, theo thứ tự, bắt đầu từ lắp ráp của các tiểu phần α tạo vòng 7, tạo khuôn tiếp theo cho các vòng pro- β . Quá trình này chưa được biết rõ.
- Nói chung, người ta chưa biết rõ về quá trình lắp ráp và trưởng thành của tiểu phần điều hòa 19S. Người ta tin rằng có sự ráp lại của hai tiểu phần phụ riêng biệt: các base có chứa ATPase và vị trí nhận diện ubiquitin. Các protein khác ATPase kết vòng lại tạo thành một bộ máy có vai trò điều hòa, ngăn chặn trình diện các vị trí hoạt động trước khi việc lắp ráp hoàn thành.

QUÁ TRÌNH THOÁI BIẾN PROTEIN Ở PROTEASOME

Thoái biến Protein

Chức năng của quá trình thoái biến hay thủy phân protein là:

- loại bỏ các protein không cần thiết
- duy trì vốn amino acid trong tế bào

Ngoài protein từ thức ăn, các protein nội bào là nguồn cung cấp các amino acid quan trọng.

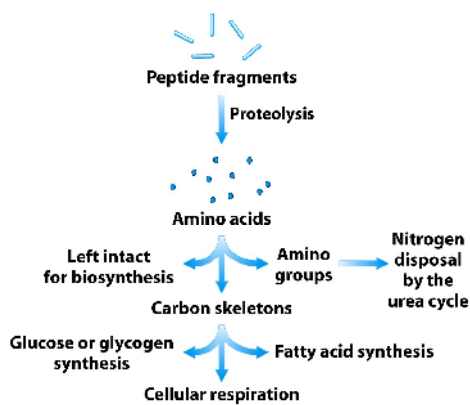


Figure 23-7 part 2
Biochemistry 7th Edition
© 2004 W. H. Freeman and Company

• **Thoái biến protein tế bào** là một quá trình gồm nhiều bước

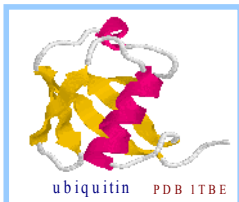
❖ **Bước 1:** đánh dấu protein sẽ được phá hủy.

- Phá vỡ những protein không cần thiết
- Tính đặc hiệu cao.
- Tiêu tốn năng lượng.
- Tác nhân đánh dấu: **ubiquitin (76 aa)**



Ubiquitin – một polypeptide tương trưng cho “nụ hôn thần chết”.

Ubiquitin:



- Đánh dấu các cấu trúc cần được thủy phân
- Một protein nhỏ, cô đặc, có tính bảo tồn cao

• Một số proteins bị phân hủy trong proteasome mà không cần gắn với Ub

3 enzyme tham gia vào quá trình này là **E1, E2 & E3**.

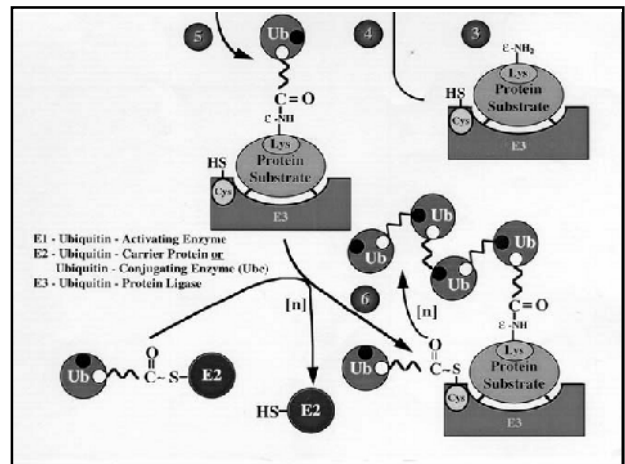
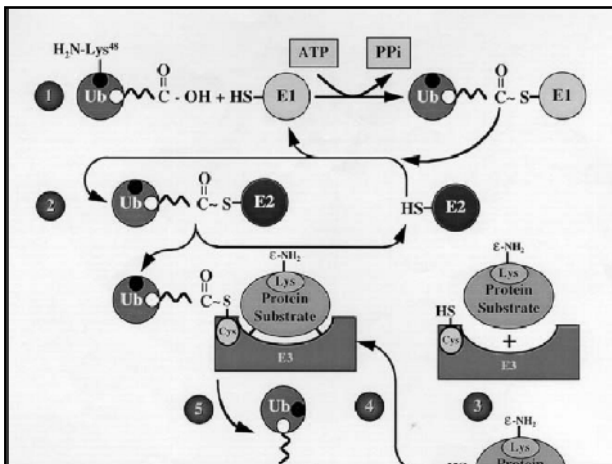
- ♦ **E1: Ubiquitin-Activating Enzyme** Khởi đầu là nhóm **terminal carboxyl** của **Ub** được gắn vào cầu nối thioester với một gốc cysteine trên **E1**. Đây là bước có tiêu tốn năng lượng ATP
- ♦ **Ubiquitin-Conjugating Enzyme (E2)**. Ub sau đó được chuyển cho một nhóm sulfua-hydryl nằm trên **E2**
- ♦ **Ubiquitin-Protein Ligase (E3)** xúc tác cho việc chuyển ubiquitin từ **E2** tới nhóm ϵ -amino của một gốc Lys của protein được nhận diện bởi **E3**, hình thành một liên kết isopeptide (nhiều loại)

Ubiquitin Ligases (E3) chủ yếu chia làm hai họ:

- ♦ Một số **E3** có một **HECT** domain chứa một gốc **Cys** bảo tồn, tham gia vào việc chuyển ubiquitin đã được hoạt hóa từ E2 tới protein mục tiêu.
- ♦ Một số **E3** chứa một **RING finger** domain chứa các gốc Cys & His là phối tử với 2 ion **Zn⁺⁺**

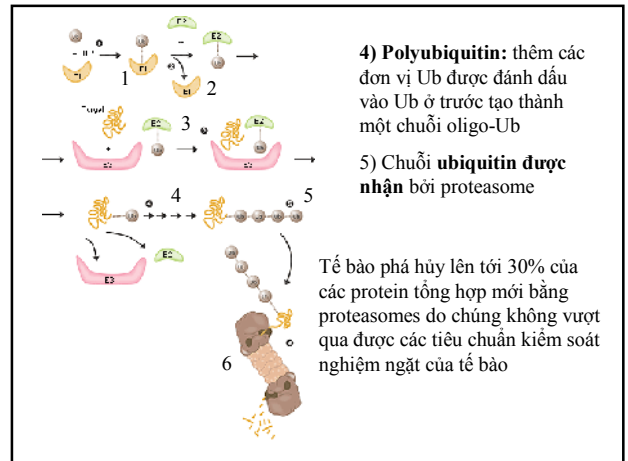
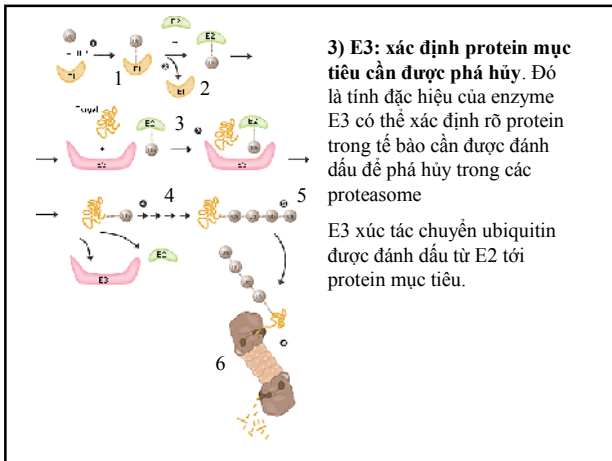
Hoạt hóa E1

- $E1 + ATP + Ub \Rightarrow E1.A MP-Ub + PPi$
- $E1.A MP-Ub \Rightarrow E1-S-Ub + AMP$



1) Ubiquitin được hoạt hóa tại đầu C-terminal bởi **ubiquitin activating enzyme**, E1.
(phản ứng này cần năng lượng ở dạng ATP)
 $Ub-COOH + ATP + E1 \rightarrow Ub-CO-S-E1 + AMP + PPi$
Một tế bào có thể chứa một hay một vài loại enzyme E1 khác nhau

2) Ubiquitin kết hợp với E2
E1 và E2 hình thành cầu nối đồng hóa trị với ubiquitin.
 $Ub-CO-E1 + E2 \rightarrow Ub-CO-E2 + E1$
Một tế bào có chứa khoảng 10 loại enzyme E2.

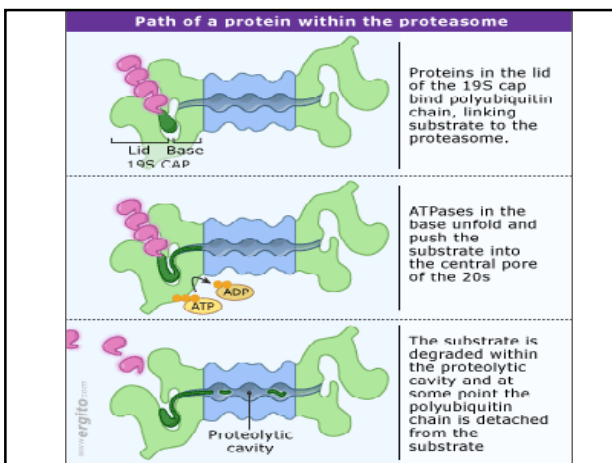


KHỬ UBIQUITIN

- Ubiquitin cần được loại bỏ khỏi protein đích trước khi chúng đi vào lõi phân giải protein của proteasome .
- Những enzym khử ubiquitin (DUBs) chủ yếu thuộc hai họ :
 - UBPs (ubiquitin processing) .
 - UCHs (ubiquitin carboxyl terminal hydrolases)
- Tiểu phần Rpn11 của phức hợp 19s có vai trò khử ubiquitin (nó là enzym ATP – dependent metalloprotease)

QUÁ TRÌNH DUỖI THẰNG VÀ CHUYỂN VỊ PROTEIN ĐÍCH

- Vì kênh trung tâm của lõi 20S rất hẹp và bị đóng bởi đuôi N – terminal của những tiểu đơn vị α nên cơ chất phải bị duỗi thẳng trước khi vào lõi .
- Phức hợp base của 19S làm nhiệm vụ duỗi thẳng protein đích bằng hoạt động ATP ase .
- Sau đó nó chuyển vị vào trong lõi 20S



HOẠT ĐỘNG PHÂN CẮT PROTEIN Ở LỖI 20S

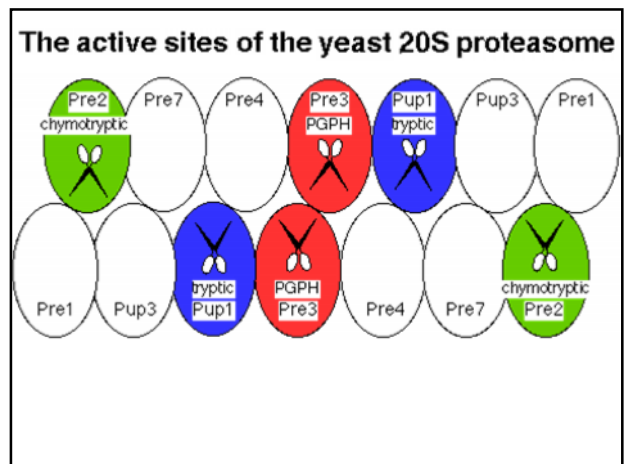
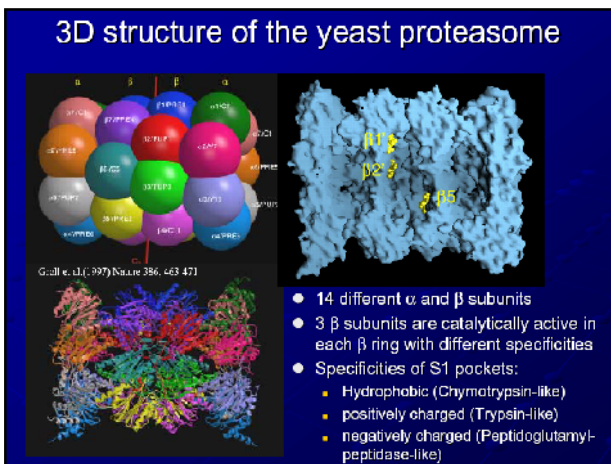
Trong lõi 20S có chứa ba vùng hoạt động peptidase

- +Vùng chymotrypsin-like activity (cắt các aa kỵ nước).
- +Vùng trypsin-like activity (cắt các aa base).
- +Vùng caspase-like activity (cắt các aa acid).

- BrAAP: cắt aa nhánh
- SNAAP cắt aa trung tính

- Những vùng này hoạt động khi pre protein được hoạt hóa bằng quá trình tự phân (cắt tại đuôi N – terminal) để lộ vùng threonine .
- Threonine được coi như thành phần quyết định của vùng hoạt động của proteasome .
- Hoạt động này xảy ra trong suốt quá trình nổi của hai nửa proteasome .

- Quá trình phân cắt protein xảy ra ở khoang trung tâm của proteasome do tiểu phần β (tiểu phần $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ ở eukaryote) của lõi 20S thực hiện .

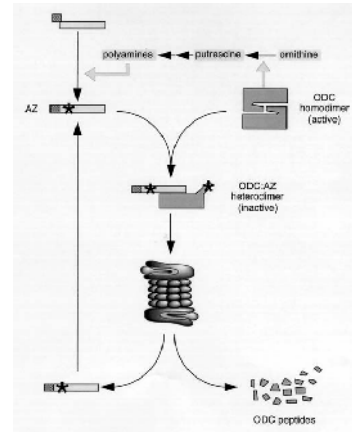


- Ở đây protein sẽ bị cắt thành từng đoạn nhỏ từ 4 đến 25 acid amin phụ thuộc vào từng loài và cơ chất ngoài ra người ta còn giả định có sự liên quan giữa chiều dài peptid và thời gian cơ chất hiện diện trong khoang phân giải .

CON ĐƯỜNG PHÂN GIẢI KHÔNG PHỤ THUỘC UBIQUITIN

- Mặc dù hầu hết cơ chất của proteasome phải được ubiquitin hóa trước khi phân hủy nhưng có một số ngoại lệ với quy luật tổng quát này.
- Một vài protein được cho là không ổn định như protein duỗi thẳng một cách tự nhiên hay protein bị rối loạn do thiếu cấu trúc bậc 3 ổn định thì được phân giải theo con đường không phụ thuộc ubiquitin .

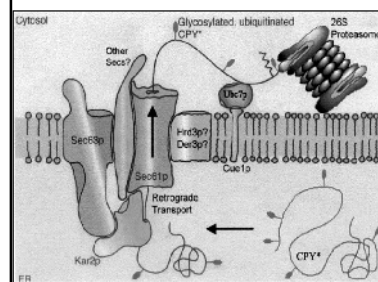
- Một ví dụ phổ biến nhất về cơ chất của quá trình này là ornithine decarboxylase (ODC).
- ODC không được đánh dấu bởi quá trình ubiquitin hóa nhưng được gắn với AZ-một antizym(heterodimer ODC gắn với AZ)
- ODC : AZ là cơ chất của proteasome



Proteasome tham gia vào nhiều quá trình trong đời sống của tế bào

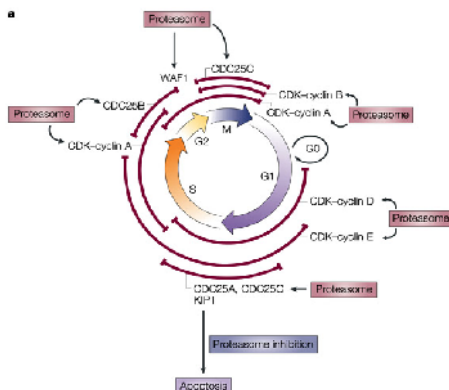
- Loại bỏ các protein không bình thường và cuộn sai khỏi tế bào.
- Liên quan đến đáp ứng stress của tế bào bằng cách phân hủy các protein điều hòa.
- Là 1 thành phần trong hệ thống Ubiquitin, chúng tham gia điều hòa chu trình tế bào.
- Liên quan đến sự biệt hóa tế bào (bằng cách phân hủy các nhân tố dịch mã và các enzyme biến dưỡng).
- Có vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch bằng cách tạo ra các peptid kháng nguyên, được trình diện bởi các phân tử MHC lớp I.

Loại bỏ protein không bình thường và cuộn sai khỏi tế bào



Protein cuộn sai CPY được nhận diện bởi hệ thống kiểm tra chất lượng trên mạng lưới nội chất nhám, giữ lại trên màng. Bộ máy phân hủy của ER vận chuyển protein vào cytosol. Sau khi được vận chuyển, phân tử cơ chất được ubiquitin hóa, sau đó protein sẽ bị proteasome phân hủy.

Vai trò của Proteasome trong điều hoà chu trình tế bào:



Cyclin là một protein điều hoà có đời sống ngắn, bị phân cắt ngay sau khi rời khỏi chu trình tế bào.

Có nhiều loại cyclin hoạt động trong các giai đoạn khác nhau của chu trình tế bào.

Phase G1 → Cyclin D và Cyclin E

Phase S → Cyclin E và Cyclin A

Mitosis → Cyclin A và Cyclin B

Tuỳ theo các giai đoạn mà Cyclin gắn vào các CDKs tương ứng nhờ vào quá trình phosphoryl hoá của các enzyme thuộc họ CDC25 phosphatase.

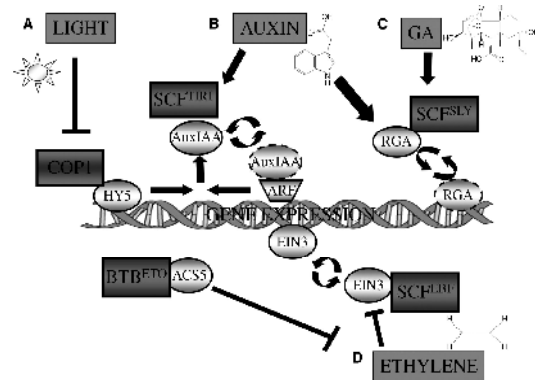
Hoạt động của các CDC25, CDK, Cyclin được điều hoà bởi các cơ chế feedback-loop và các chất ức chế hoạt động của CDK (WAF1, KIP1).

Proteasome có thể phân cắt các Cyclin, các chất ức chế hoạt động CDK.

Proteasome cũng điều hoà tính ổn định các enzym Phosphatase trong chu trình tế bào.

Sự ức chế hoạt động của proteasome có thể làm chậm hoặc dừng sự phát triển của tế bào.

Vai trò của Proteasome trong sự phát triển của Thực vật



Ví dụ: Trường hợp *S.cerevisiae*

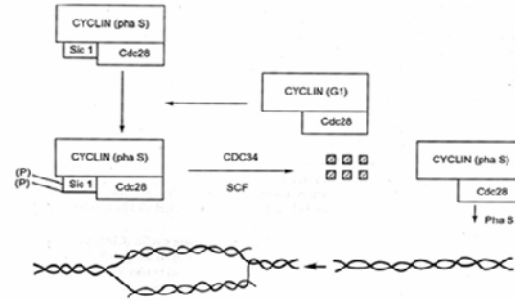
Gen mã hóa cho dạng cyclin B là CLB5 và CLB6, hai gen này mã hóa cho cyclin Clb5 và Clb6 và được biểu hiện ở cuối G1.

Các phức hệ Cdc28-Clb5 và Cdc28-Clb6 được tích lũy ở cuối G1 và bị bất hoạt do chúng liên kết với một nhân tố ức chế là Sic1.

Sic1 có mặt ở cuối mitosis và đầu G1. Sic1 đóng vai trò là nhân tố ức chế giai đoạn S, đặc biệt là ức chế phức hệ Cdc28-cyclin B.

Khi tế bào vào giai đoạn S và khi nhân tố ức chế Sic1 bị phân giải thì phức hệ Cdc28-Clb5 và Cdc28-Clb6 trở nên có hoạt tính và phát động sự tái bản ADN.

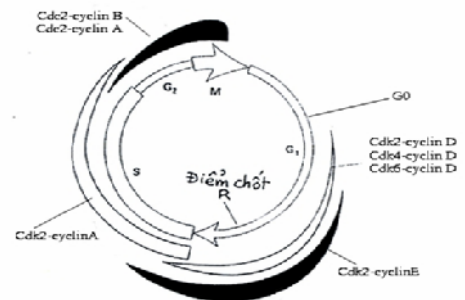
Nhân tố ức chế Sic1 bị phân giải bởi proteasome bằng con đường ubiquitin hóa bởi các enzym Cdc34 và SCF



Cơ chế kiểm tra G1 → S ở *S. cerevisiae*

Ở động vật có vú:

Cũng giống như nấm men *S. cerevisiae*, tế bào động vật có vú cũng sử dụng nhiều loại cyclin tham gia điều chỉnh hoạt tính Cdk, trong đó cyclin A và B có tác động trong giai đoạn S, G2 và mitosis sớm



Hoạt tính của phức hệ Cdk-cyclin ở tế bào động vật có vú

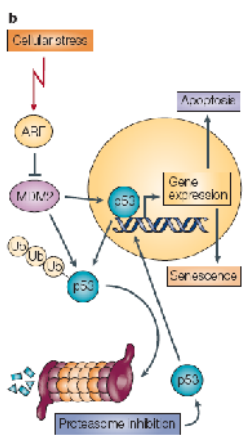
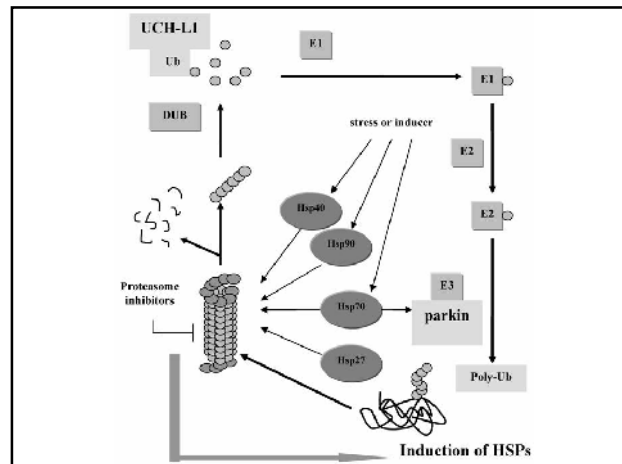
- Mitosis Promoting Factor - MPF
- Hoạt tính MPF của phức hệ Cdk1-cyclin A và Cdk2-cyclin B của động vật có vú có vai trò chuyển chu kỳ từ G2 vào M
- Cyclin A và cyclin B sẽ bị phân huỷ trong proteasome bằng con đường ubiquitin hóa nhờ phức hệ APC (Anaphase Promoting Complex) dẫn tới giảm hoạt tính của MPF cho phép tế bào hoàn thành mitosis để đi vào chu kỳ mới.
- Khi APC được photphorin hóa nhờ phức hệ Cdk-cyclin, chúng sẽ có hoạt tính và sẽ tác động hướng dẫn theo con đường ubiquitin hóa để các protein ức chế hậu kỳ bị phân giải bởi proteasome, do đó các nhiễm sắc tử tách khỏi nhau và vận động về hai cực nhờ sự giải trùng hợp các vi ống của sợi thoi.
- Khi các cyclin chưa bị phân huỷ thì phức hệ Cdk-cyclin sẽ tác động để tái tạo lại màng nhân, cũng như tác động gây co thắt eo phân bào (do tác động photphorin hóa protein miozin-actin) làm cho tế bào bị phân thành hai.
- Vào kỳ cuối, APC bằng con đường ubiquitin hóa sẽ tác động lên cyclin nhờ proteasome. Nồng độ cyclin giảm, Cdk mất hoạt tính và tế bào ra khỏi mitosis.

Vai trò proteasome trong điều hoà phát triển ở thực vật.

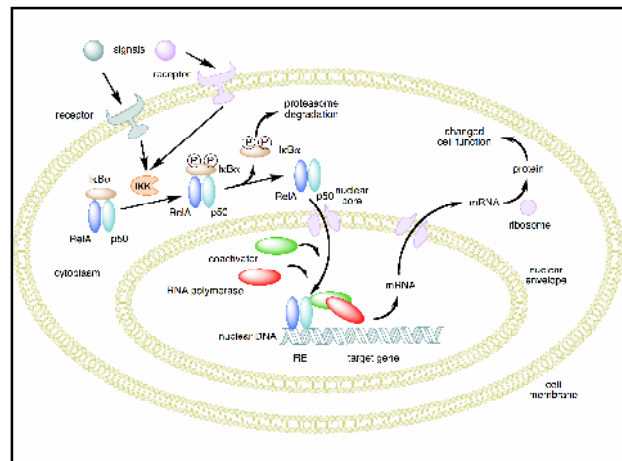
- Ở Thực vật auxin quyết định hướng và tính hướng kích thích của sự phát triển thực vật. Auxin giúp cảm ứng quá trình phân cắt protein Aux/IAA (chất kìm hãm các nhân tố phiên mã).
- Aux/IAA là nhân tố kìm hãm sự phiên mã
- Ánh sáng ngăn chặn sự phân cắt HY5 bằng COP1 tạo nên sự biểu hiện gen mã hóa protein AUX/IAA
- Auxin thúc đẩy sự phân cắt protein AUX/IAA bởi SCF tạo nên sự giải phóng sự ức chế biểu hiện gen qua trung gian ARF
- Auxin và GA thúc đẩy sự phân cắt RGA bởi SCF. RGA kìm hãm sự phiên mã.
- BTB điều hòa sự sản xuất ethylen bằng cách tạo điều kiện phân cắt ACS5. Ethylen ngăn chặn sự phân cắt sự phân cắt EIN3 bằng SCF, giúp sự biểu hiện gen.

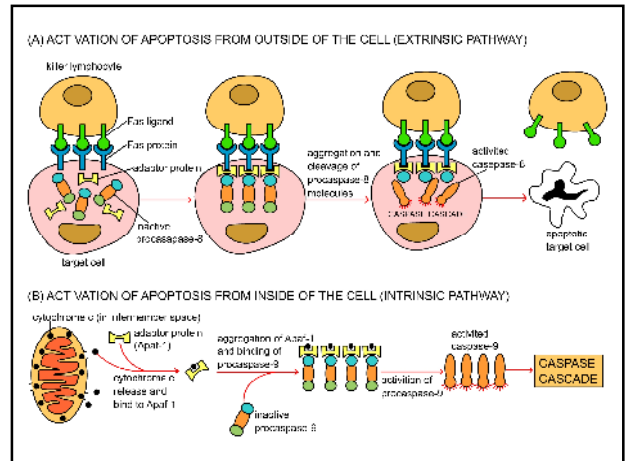
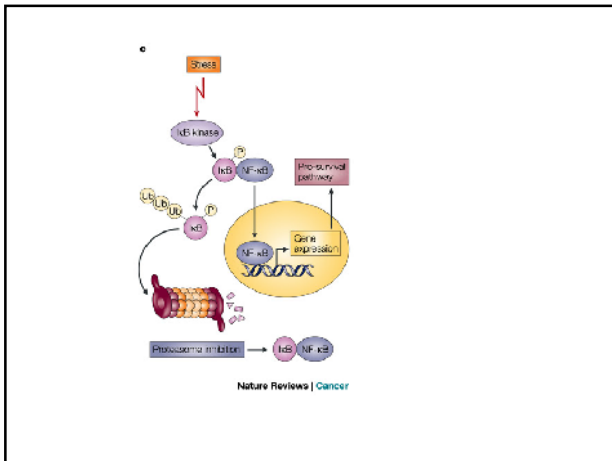
Vai trò trong đáp ứng stress của tế bào

- Trong đáp ứng stress tế bào – bị nhiễm, shock nhiệt hay bị phá hỏng do oxy hoá- các protein shock nhiệt được hệ thống proteasom nhận diện và phân huỷ.
- Một số chaperone giúp tăng hoạt tính proteasome nhưng không trực tiếp tham gia vào quá trình. Một số khác gắn với phần không ưa nước đưa ra ngoài của protein có cấu hình cuộn sai, thu hút E3 để bắt đầu quá trình phân cắt protein.
- Các proteasome trong nhân hoạt động trên protein histone không được oxy hoá chính xác. Các protein này hình thành một tập hợp không định hình trong tế bào. Phần lõi 20S của proteasome có thể phân huỷ trực tiếp các protein này mà không cần sự trợ giúp của cap 19S, thay thế ATP hay sự ubiquitin hoá protein đích. Tuy nhiên, khi tế bào già, xuất hiện rất nhiều protein bị hư hỏng. Chúng liên kết các phân mảnh lại, tạo tính kháng với quá trình thủy phân protein của proteasome.
- Sự suy giảm hoạt tính của proteasome gây ra sự kết cụm và hình thành thể Lewy ở người bệnh Parkinson.



ARF là nhân tố ức chế khối u, có vai trò hoạt hoá con đường p53. Những tế bào bị stress có hiện tượng tích lũy ARF. MDM2: là tiểu phần E3 của proteasome, có cơ chất tác động là p53. Trong điều kiện bình thường MDM2 sẽ hỗ trợ mang p53 ra ngoài tế bào chất, và bị phân giải bởi proteasome. Khi proteasome bị bất hoạt p53 sẽ được hoạt hoá, thực hiện chức năng hỗ trợ phiên mã gen gây chết hoặc lão hóa.





Apoptosis

- Sự co rút thể tích tế bào
- Plasma membrane blebbing
- Cô đặc nhiễm sắc chất
- Sự tập hợp lõi nhân
- Sự phá vỡ lamins nhân
 - Tế bào bị bóc vỏ hoàn toàn và gọn nhẹ mà không gây ảnh hưởng đến các tế bào xung quanh
- Quá trình apoptosis phụ thuộc rất lớn vào sự phân cắt các protein

Apoptosis

- Quá trình này phụ thuộc vào hoạt động của các interleukin-1 β -converting enzyme (ICE): cysteine protease
- ICE là một thành viên của các cysteine protease, gọi tắt là enzyme caspase, đóng vai trò lớn trong các sự kiện phân cắt protein trong quá trình apoptosis.
- Cơ chất của enzyme caspase:
 - Protein cấu trúc
 - Protein truyền tin
 - Các chất điều hòa dịch mã
 - Các protein liên quan đến biến dưỡng DNA/RNA

Apoptosis

- Proteasome đóng vai trò quan trọng và đa dạng trong quá trình apoptosis. Trong quá trình này, proteasome có liên quan đến
 - Sự gia tăng protein được ubiquitin hóa, và các enzyme E1, E2, E3 giúp tạo thuận lợi cho quá trình apoptosis.
 - Trong quá trình apoptosis, proteasome nằm trên màng nhân sẽ chuyển vào màng bleb phía ngoài của apoptosis
- Proteasome có khả năng xử lý số lượng lớn protein với sự điều hòa cao → giúp thủy giải hoàn toàn các thành phần protein trong tế bào.
- Proteasome không cần thiết cho quá trình apoptosis

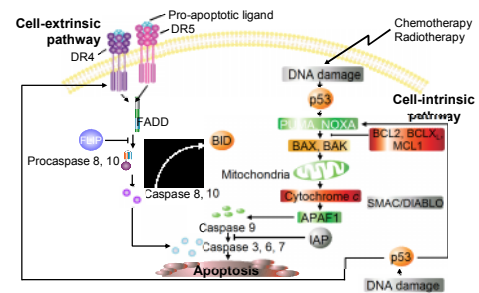
The Intrinsic Apoptosis Pathway

- **The intrinsic pathway is triggered by the p53 tumor-suppressor in response to DNA damage and other types of severe cell stress**
- **Conventional anticancer therapies, such as chemotherapy and radiotherapy, activate this pathway via p53**
- **p53 activates the intrinsic pathway through transcriptional upregulation of pro-apoptotic members of the BCL2 family of proteins such as PUMA and BAX**
- **BAX causes the release of cytochrome c from the mitochondria, which together with the adaptor APAF1, activate the initiator caspase 9**
- **Caspase 9 activates the effector caspases 3, 6, and 7, which are responsible for destroying critical components of the cell, and inducing apoptosis**
- **p53 is inactivated by mutations in more than half of human cancers**

The Extrinsic Apoptosis Pathway

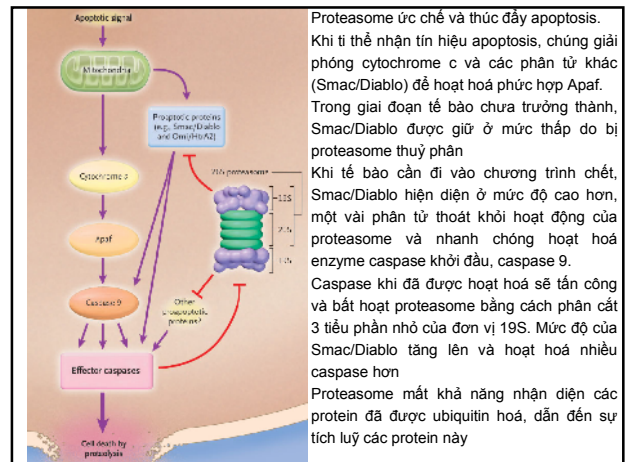
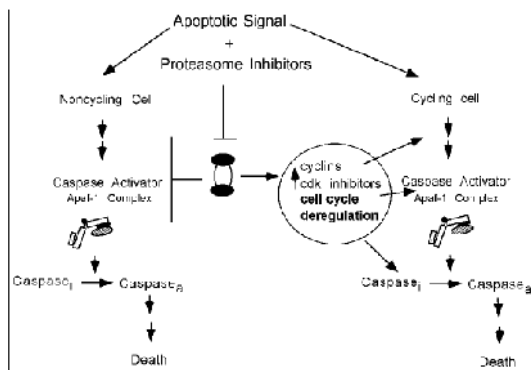
- The extrinsic pathway triggers apoptosis in response to the activation of pro-apoptotic receptors, such as DR4 and DR5, by specific pro-apoptotic ligands, such as Apo2L/TRAIL
- This pathway stimulates apoptosis independently of p53
- Ligand-induced activation of DR4 and DR5 leads to the rapid assembly of the death-inducing signaling complex (DISC) and the recruitment of initiator caspases 8 and 10 through the adaptor Fas-associated death domain (FADD)
- Caspases 8 and 10 activate effector caspases 3, 6, and 7, leading to apoptosis

The Two Major Apoptosis Pathways



Adapted from Ashkenazi A. Nat Rev Can 2002;2:420-430.
 APAF1, apoptotic protease activating factor-1; BAK, BCL2 homologous antagonist/killer; BAX, BCL2-associated protein; BCL2, B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 2; BCL-XL, BCL2-like 1; BID, BH3-interacting domain death agonist; DR, death receptor; FADD, Fas-associated death domain; FLIP, FLICE (FADD-like interleukin 1 β -converting enzyme) inhibitory protein; IAP, inhibitor of apoptosis protein; MCL1, myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related); PUMA, p53-upregulated modulator of apoptosis; SMAC/DIABLO, second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI.

Sự liên quan giữa apoptosis và proteasome

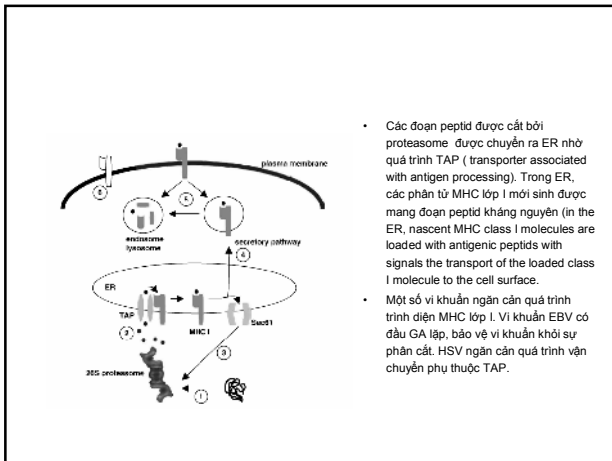


Proteasome ức chế và thúc đẩy apoptosis. Khi tế bào nhận tín hiệu apoptosis, chúng giải phóng cytochrome c và các phân tử khác (Smac/Diablo) để hoạt hoá phức hợp Apaf. Trong giai đoạn tế bào chưa trưởng thành, Smac/Diablo được giữ ở mức thấp do bị proteasome thủy phân. Khi tế bào cần đi vào chương trình chết, Smac/Diablo hiện diện ở mức độ cao hơn, một vài phân tử thoát khỏi hoạt động của proteasome và nhanh chóng hoạt hoá enzyme caspase khởi đầu, caspase 9. Caspase khi đã được hoạt hoá sẽ tấn công và bất hoạt proteasome bằng cách phân cắt 3 tiểu phần nhỏ của đơn vị 19S. Mức độ của Smac/Diablo tăng lên và hoạt hoá nhiều caspase hơn. Proteasome mất khả năng nhận diện các protein đã được ubiquitin hoá, dẫn đến sự tích lũy các protein này.

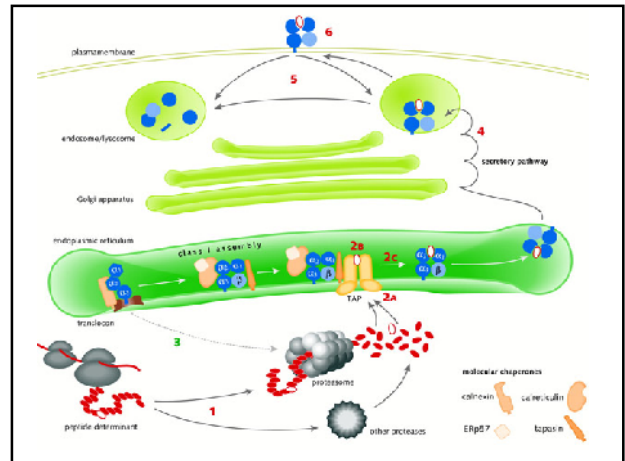
Vai trò của proteasome trong hệ thống miễn dịch

- Proteasome giữ vai trò then chốt trong hệ thống miễn dịch đáp ứng. Kháng nguyên có bản chất peptid hiện diện trên các protein MHC lớp I trên bề mặt của các tế bào trình diện kháng nguyên là sản phẩm của quá trình thủy phân protein có nguồn gốc từ sinh vật gây bệnh xâm nhập. Interferon gamma cảm ứng sự biểu hiện của các phức hợp protein chuyên biệt sản xuất các đoạn peptid với kích thước và thành phần phù hợp gắn với MHC. Phức hợp này gia tăng trong quá trình đáp ứng miễn dịch, gồm phần điều hoà 11S- chức năng chính là điều hoà sự sản xuất các ligand MHC và tiểu phần β đặc biệt chuyên biệt cơ chất. Phức hợp hình thành với tiểu phần β được gọi là proteasome miễn dịch.
- Độ mạnh của liên kết ligand với MHC nhóm I phụ thuộc vào thành phần đầu C của ligand. Đầu C kỵ nước sẽ có liên kết chặt hơn và phức hợp proteasome miễn dịch thích tạo đầu C kỵ nước.

- Proteasome có thể tổng hợp các đoạn peptid ngắn được sử dụng như kháng nguyên trong các tế bào lympho. Những kháng nguyên này được trình diện trên bề mặt của các tế bào lympho (qua phức hợp với MHC) và đóng vai trò quan trọng trong khả năng gia tăng đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.
- Trong quá trình viêm nhiễm, các tế bào sẽ thay thế các phần của proteasome để thực hiện chức năng hiệu quả hơn
 - Thay cap 19S bằng cap 11S. Proteasome với cap 11S sẽ giúp phức hợp sản xuất các đoạn peptid hiệu quả hơn.
 - Thay tiểu phần β bằng chất tương đồng được cảm ứng bởi Interferon gamma.



- Các đoạn peptid được cắt bởi proteasome được chuyển ra ER nhờ quá trình TAP (transporter associated with antigen processing). Trong ER, các phân tử MHC lớp I mới sinh được mang đoạn peptid kháng nguyên (in the ER, nascent MHC class I molecules are loaded with antigenic peptides with signals the transport of the loaded class I molecule to the cell surface.
- Một số vi khuẩn ngăn cản quá trình trình diện MHC lớp I. Vi khuẩn EBV có đầu GA lập, bảo vệ vi khuẩn khỏi sự phân cắt. HSV ngăn cản quá trình vận chuyển phụ thuộc TAP.



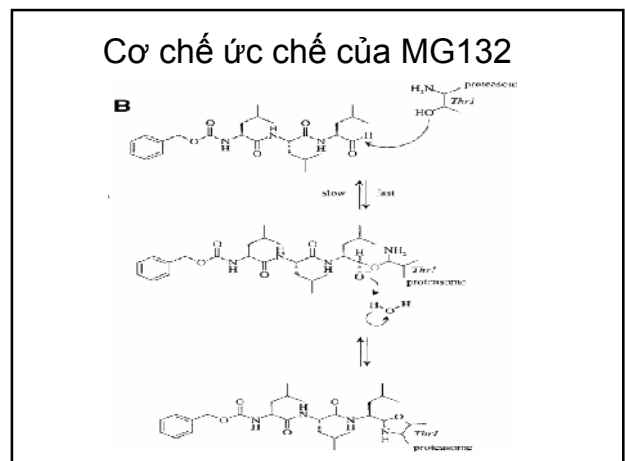
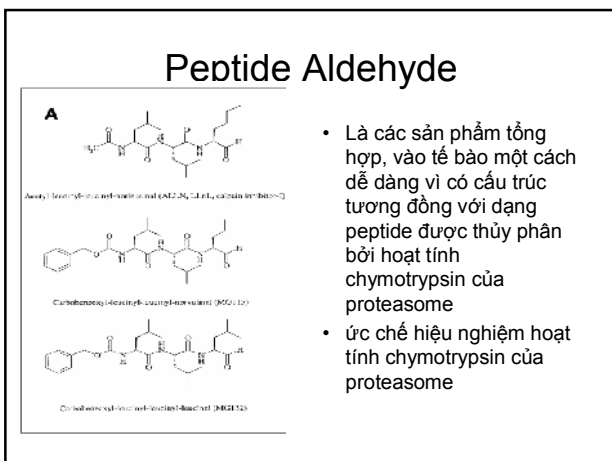
Vai trò proteasome trong đáp ứng sự xâm nhiễm của virut

- Sự trình diện kháng nguyên lớp I gồm các bước:
 - Phân cắt protein nội sinh thành từng đoạn peptid
 - Vận chuyển peptid qua màng ER
 - Thu nhận phân tử vận chuyển MHC lớp I trong ER
 - Chuyển qua màng tế bào
- Các đoạn peptid được tạo bởi proteasome là nguồn peptid chính cho MHC lớp I

Proteasome Inhibitor

Chia làm 5 nhóm lớn

1. Peptide Aldehyde
2. Lactacystin và Clasto-Lactacystin β -Lactone
3. Peptide Vinyl Sulfone
4. Boronate Inhibitor
5. Các Proteasome Inhibitor khác



Peptide aldehyde inhibitors and advantage for their use in vivo

- 1. có tính thuận nghịch, không làm biến đổi hoạt tính phân cắt
- 2. có hiệu lực cao
- 3. không mắc để tổng hợp
- 4. sau khi tiếp xúc với các tác nhân này, khả năng sống và phát triển của tế bào nói chung không bị ảnh hưởng

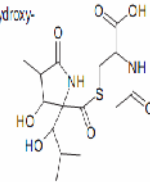
Lactacystin và β -lactone

- Là sản phẩm tự nhiên, có nguồn gốc từ Streptomyces
- Thẩm qua được màng tế bào, không thuận nghịch,
- ức chế chọn lọc hơn peptide aldehyde

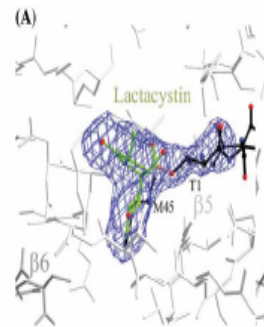
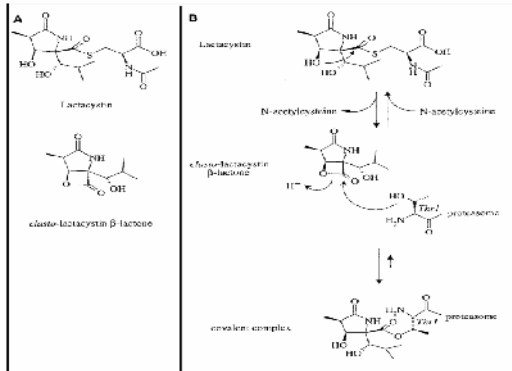
Lactacystin

N-Acetyl-L-Cysteine, *S*-(2*R*,3*S*,4*R*)-3-Hydroxy-2-[(1*S*)-1-Hydroxy-2-Methylpropyl]-4-Methyl-5-Oxo-2-Pyrrolicarboxonyl
(M.W. 376.43) $C_{15}H_{21}N_2O_5S$

Inhibitor for Proteasome
Microbial Product



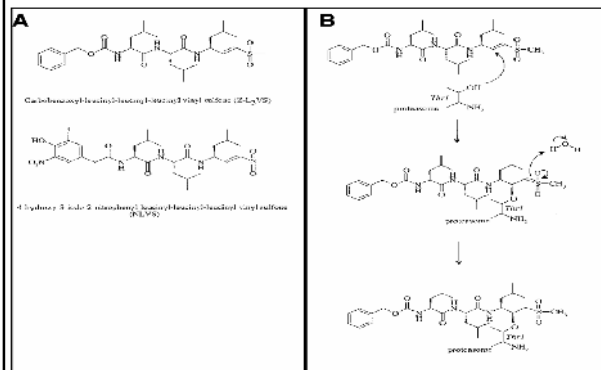
Cơ chế ức chế của Lactacystin



- Tác động ức chế cả 3 hoạt tính peptidase của proteasome
- Ức chế chuyên biệt cho proteasome, không ức chế các protease nội bào khác
- Tính chọn lọc của Lactacystin là do nhóm dimethyl tương tác chặt chẽ với Met45 trong vùng T1 kỵ nước của tiểu phần B5

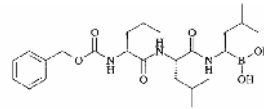
- clasto-lactacystin β -lactone ức chế tất cả các hoạt tính peptidase trong proteasome nhanh hơn 15-20 lần so với lactacystin cùng liều lượng.
- lactacystin và β -lactone khó tổng hợp hơn mắc hơn so với chất ức chế peptide aldehyde thuận nghịch.

Peptide Vinyl Sulfone

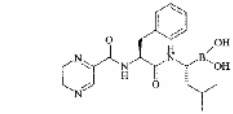


- Peptides chứa 1 đuôi C vinyl sulfone, có tính chuyên biệt cao với proteasome của động vật hữu nhũ.
- Tạo liên kết đồng hóa trị với N-terminal threonine trong các tiểu phần β .
- Cũng tương tự như các peptide aldehydes kỵ nước (MG132), chúng cũng ức chế hoạt tính chymotrypsin của proteasome và ít hiệu quả hơn so với hoạt tính trypsin và caspase.
- Trong thời kì ủ bệnh kéo dài của tế bào lymphoma người, với chất ức chế vinyl sulfone ở hàm lượng thấp có sự xuất hiện enzyme tripeptidyl peptidase II (TPP II) để thay thế chức năng của proteasome.

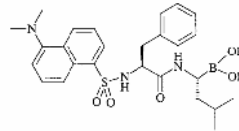
Boronate Inhibitor



Carbobenzoylethyl-leucyl-metay-leucyl-boronic acid



Carboxylpyrityl-phenylalanyl-leucyl-boronic acid (PS 341)

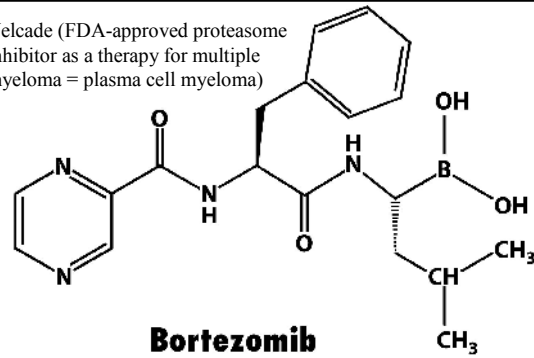


Dansyl-phenylalanyl-leucyl-boronic acid (DFLB)

- Các tác chất này gắn với threonine của vùng hoạt tính và tạo liên kết boron-Thr1Oy, liên kết này bền vững hơn nhiều so với liên kết carbon-Thr1Oy trong hemiacetal, được tạo bởi peptide aldehydes và proteasomes

- Có tính chọn lọc rất cao với proteasome. Ví dụ, (Cbz-LLL-B(OH)₂) có hiệu lực chọn lọc với proteasome gần 200,000 lần so với cathepsin B.
- Dansyl-phe-leu-B(OH)₂ (DFLB) và Morpholino-naphthyl-ala-leu-B(OH)₂ (MNLB) được tổng hợp giúp cho việc nghiên cứu proteasome.
- Boronate inhibitors (như PS341) hiện đang được sử dụng như các tác nhân chống ung thư ở người và các bệnh viêm.

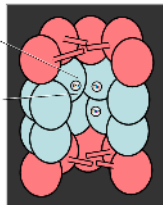
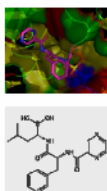
Velcade (FDA-approved proteasome inhibitor as a therapy for multiple myeloma = plasma cell myeloma)



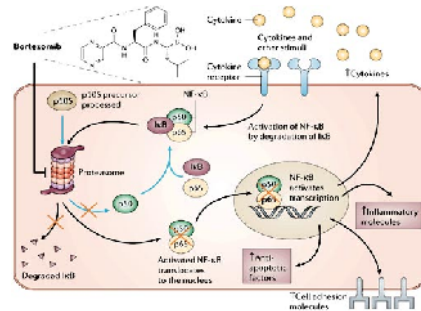
Bortezomib
(a dipeptidyl boronic acid)

Unnumbered figure pg 634
Biochemistry, Sixth Edition
© 2004 W. H. Freeman & Co.

Velcade (FDA-approved proteasome inhibitor as a therapy for multiple myeloma = plasma cell myeloma)



Bortezomib
Velcade™



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Sánchez-Serrano *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 107–114 (February 2006) | doi:10.1038/nrd1959

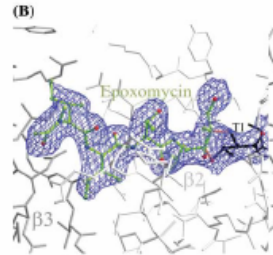
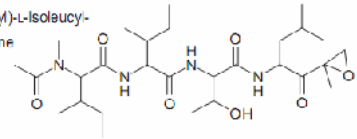
nature DRUG
REVIEWS DISCOVERY

Các Proteasome Inhibitor khác

- HIV protease inhibitor khóa hoạt tính chymotrypsin ở proteasome 20S và trong in vitro có khả năng ức chế sự phân cắt IκB và sự trình diện kháng nguyên MHC lớp I
- Epoxomicin có cấu trúc epoxyketon, là chất ức chế chọn lọc cao và không thuận nghịch với hoạt tính chymotrypsin của proteasome 20S ở động vật hữu nhũ.

Epoxomicin

(2R)-2-[Acetyl-(N-Methyl-L-Isoleucyl)-L-Isoleucyl-1-Threonyl-L-Leucyl]-2-Methylxirane
(M.W. 554.72) $C_{28}H_{42}N_2O_7$
Inhibitor for Proteasome
Synthetic Product



- Epoxomicin có cấu trúc epoxyketon, là chất ức chế chọn lọc cao và không thuận nghịch với hoạt tính chymotrypsin của proteasome 20S ở động vật hữu nhũ.
- Gắn đồng hóa trị với β2 và β5
- Không ức chế các protease khác

1. Peptide Aldehydes

Có tính thuận nghịch reversible transition state analogs
Khả năng ức chế hoạt tính chymotrypsin >> caspase-like (PGPH) > trypsin
Thâm nhập tế bào dễ dàng
Không chuyên biệt, có thể ức chế cathepsins và calpains

2. Lactacystin & β-lactone

Liên kết đồng hóa trị không thuận nghịch
ức chế hoạt tính chymotryptic >> tryptic > caspase-like (PGPH)
Thâm nhập tế bào dễ dàng (trong nấm men, chỉ có β-lactone mới có thể vào)

Chuyên biệt, nhưng cũng ức chế cathepsin A

3. Peptide Vinyl Sulfones

Liên kết đồng hóa trị không thuận nghịch
ức chế chymotryptic >> tryptic, caspase-like (PGPH)
Dễ dàng xâm nhập vào tế bào động vật hữu nhũ
Chuyên biệt, nhưng cũng ức chế cathepsin S

4. Boronate Inhibitors

Thuận nghịch
ức chế chymotryptic >> tryptic, caspase-like (PGPH)
Thâm nhập tế bào dễ dàng
Chuyên biệt rất cao với proteasomes (tính chọn lọc 200, 000 lần)

