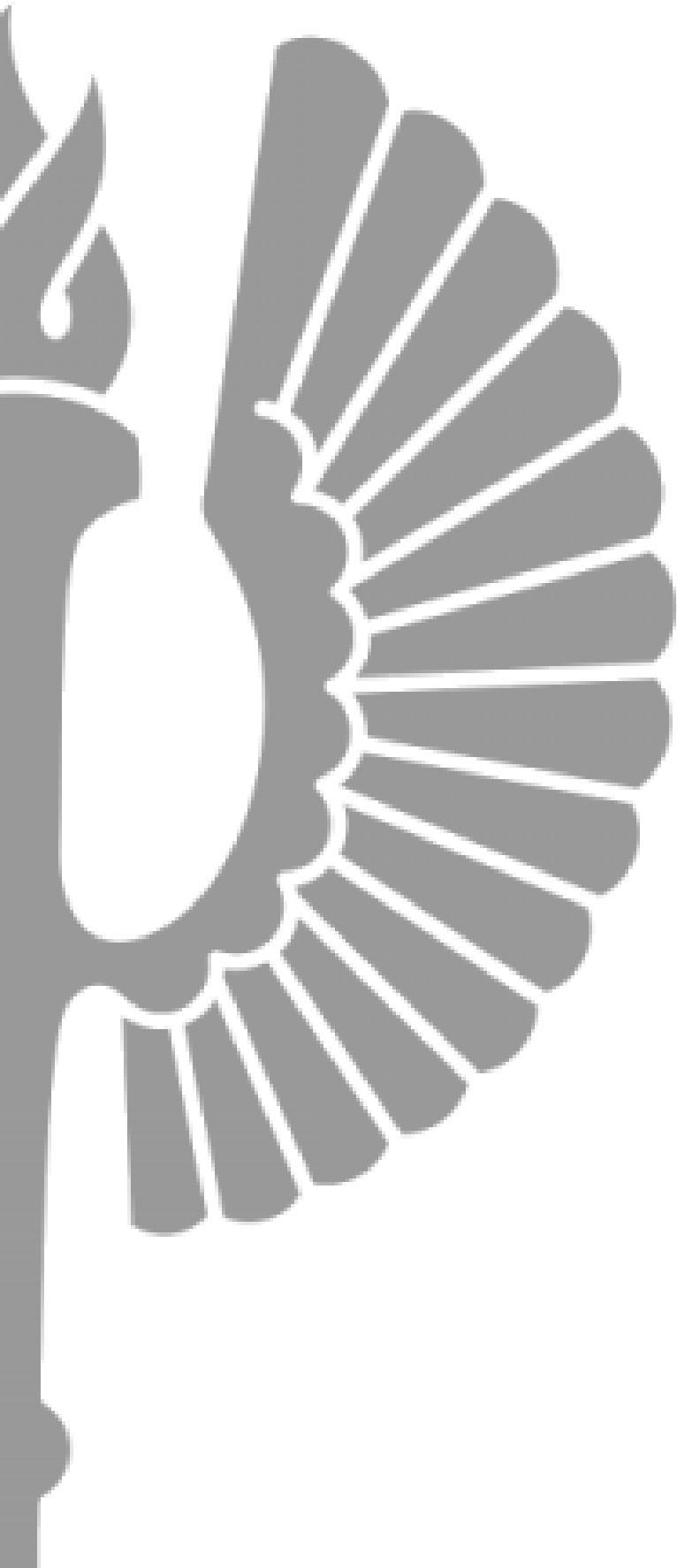


Eukaryoottisen 20S-proteasomin rakenne ja kokoonpano



LuK-tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Biokemia
Helmikuu 2024
Tutta Tomberg

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO
Bioteknologian laitos

TOMBERG, TUTTA: Eukaryoottisen 20S-proteasomin rakenne ja kokoonpano

LuK-tutkielma, 17 sivua
Biokemia
Helmikuu 2024

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Proteasomit ovat keskeisiä solun homeostaasin säätelytekijöitä, jotka hydrolysoivat solulle haitallisten proteiinien peptidisidoksia. 20S-proteasomi toimii proteasomeissa proteolyyttisena keskuksena, jossa tapahtuu solunsisäisten substraattien hajotus. 20S-proteasomi koostuu neljästä konservoituneesta heptameerisesta renkaasta, jotka muodostavat 20S-proteasomille ominaisen ontton ja sylinterimäisen $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -rakenteen. Tutkielman tavoitteena on syventää käsitystämme eukaryoottisen 20S-proteasomin rakenteesta, aktiivisista keskuksista sekä kokoonpanomekanismista ja siihen vaikuttavista säätelytekijöistä. Tutkielman keskiössä on 20S-proteasomin kokoonpano, jossa viisi erilaista kaperonia (Pba1-Pba2, Pba3-Pba4 ja Ump1) sekä proteasomin β -alaysiköiden C- ja N-terminaaliset päät ohjaavat koordinoitusti 20S-proteasomin rakentumista. Kaperonien avulla ohjataan α -renkaiden muodostumista, minkä jälkeen β -alaysiköt integroidaan α -renkaaseen yksitellen ja lopulta puoliproteasomin dimerisaation avulla muodostetaan kokonainen 20S-proteasomi. Kaperonien vapauttaminen tai hajotus rakenteesta sekä β -alaysiköiden propeptidien autokatalyyttinen prosessointi aktivoivat 20S-proteasomin proteolyyttisen aktiivisuuden. Proteasomin kokoonpanomekanismi sisältää vielä monia epäselviä kohtia, minkä takia kokoonpanoon vaikuttavien säätelytekijöiden ja kokoonpanomekanismin tutkiminen on tärkeää myös tulevaisuudessa.

Asiasanat: 20S-proteasomi, proteasomi, treoniiniproteaasi, propeptidi, kaperoni, aktiivinen keskus, proteolyysi, proteasomiaktivaattori, immunoproteasomi, tymoproteasomi, sekaproteasomi, ubikitinaatio

SISÄLLYS

1	Johdanto	2
2	20S-proteasomi	5
2.1	20S-proteasomin rakenne ja aktiiviset keskukset	5
2.2	20S-proteasomin alatyypit	8
3	20S-proteasomin kokoonpano	10
3.1	α -rengas	11
3.2	β -rengas	12
3.3	Puoliproteasomin dimerisaatio ja 20S-proteasomin aktivointi	13
4	Yhteenveto	16

1 Johdanto

Proteasomit ovat monikatalyyttisiä proteaasikomplekseja, joiden tehtävänä on ylläpitää solun homeostaasia hydrolysoimalla solunsisäisten proteiinien peptidisidoksia (Fabre ja muut 2014a; Kim ja muut 2023). Proteolyyttisen aktiivisuuden avulla kohdeproteinit pilkotaan lyhyiksi peptideiksi, jotka ovat yleensä 3–23 aminohappoa pitkiä (Kim ja muut 2023). Proteasomeja esiintyy kaikissa eukaryooteissa ja joissakin prokaryooteissa. Bakteereissa ainoastaan *Actinomycetales*-lahkon organismeilla esiintyy proteasomeja, mutta muissa bakteereissa, kuten esimerkiksi *Escherichia coli*, esiintyy proteasomin rakenneyksiköitä muistuttavia treoniiniproteaaseja. Lisäksi joissakin arkeoneissa esiintyy myös proteasomeja. (Murata ja muut 2009; Ramos ja muut 2004.) Tässä tutkielmassa keskitytään eukaryoottien, erityisesti nisäkkäiden, 20S-proteasomiin ja sen toimintaan.

Proteasomit ovat osa proteiinien laadunvalvontajärjestelmää (*Protein Quality Control*, PQC), joka sisältää proteasomien lisäksi muita proteaaseja, kaperoneja sekä autofagosytoosin (Li ja muut 2022). Haitallisten proteiinimuotojen, kuten väärinlaskostuneiden, avautuneiden tai vaurioituneiden proteiinien, poistaminen solusta on elintärkeää solun homeostaasin ylläpitämiseksi. Solun erilaiset stressiolosuhteet, kuten oksidatiivinen stressi, aiheuttavat proteiinien väärinlaskostumista sekä avautumista, mikä voi johtaa solulle haitallisten proteiiniaggregaattien muodostumiseen (Kim ja muut 2023; Shringarpure ja muut 2001). Erityisesti oksidatiivisesta stressistä johtuva proteiinien vaurioituminen liittyy nisäkkäillä ikääntymiseen ja erilaisiin häiriötiloihin, kuten neurodegeneratiivisiin sairauksiin ja syöpään (Jung ja muut 2014; Kragness ja Trader 2023; Raynes ja muut 2016; Shringarpure ja muut 2001). Oksidatiivisesti modifioituja proteiineja muodostuu, kun proteiinit altistuvat erilaisille vapaille radikaaleille, muun muassa reaktiivisille happilajeille. Erityisesti rikkiä sisältävät aminohapot, kuten kysteiini ja metioniini, ovat herkkiä oksidatiiviselle vauriolle (Shringarpure ja muut 2001). Hapettumisen myötä proteiinin sekundaarinen ja tertiäärinen rakenne muuttuvat, jolloin proteiinin hydrofobiset rakenteet paljastuvat, minkä jälkeen proteasomit voivat tunnistaa ja hajottaa ne (Davies 2001; Jung ja Grune 2008; Raynes ja muut 2016).

Proteasomi-termillä viitataan erilaisiin komplekseihin, joilla kaikilla on yksi yhteinen tekijä: 20S-proteasomi. Kompleksit eroavat toisistaan niihin kiinnittyvillä proteasomiaktivaattoreilla (*proteasome activators*, PA), jotka voivat kiinnittyä 20S-proteasomin molempiin tai ainoastaan toiseen päähän (Budenholzer ja muut 2017; Kim ja muut 2023). Mikäli 20S-proteasomiin kiinnittyy kaksi erilaista aktivaattoria, puhutaan tällöin hybridiproteasomista (Budenholzer ja muut 2017).

Eukaryoottisoluisissa vapaa 20S-proteasomi pystyy itsenäisesti ja valikoivasti hajottamaan substraatteja (Abi Habib ja muut 2020; Myer ja muut 2018; Raynes ja muut 2016; Shringarpure ja muut 2001), mutta proteasomin toimintaa voidaan säädellä erilaisten aktivaattorien avulla. Yleisimmin tutkittu aktivaattori on 19S RP (*regulatory particle*, PA700), joka tunnistaa

ubikitiinilla leimattuja proteiineja. On osoitettu, että 19S RP on aktivaattoreista yleisin kaikissa solulinjoissa, ja noin 21–35 % kaikista proteasomeista sisältää kyseisen aktivaattorin (Fabre ja muut 2014a,b). 19S RP voi kiinnittyä 20S-proteasomiin joko yhdestä tai molemmista päistä, muodostaen 26S- tai 30S-holoentsyymin (Sahu ja Glickman 2021). Usein tieteellisissä artikkeleissa näistä kahdesta puhutaan pelkästään 26S-proteasomina, ja tässä tutkielmassa tullaan myös viittaamaan 26S-proteasomiin.

Muita eukaryoottisen solun proteasomin aktivaattoreita ovat PA28 (11S) ja PA200 (hiivassa Blm10) (Fabre ja muut 2014a; Sahu ja Glickman 2021; Tanahashi ja muut 2000). Nisäkässoluissa PA28-aktivaattorista on pystytty tunnistamaan kolme erilaista homologista muotoa (PA28 $\alpha\beta\gamma$). PA28 α ja PA28 β muodostavat yhdessä erilaisia heterohepta- tai heteroheksameerisiä rakenteita ($\alpha3\beta3$, $\alpha3\beta4$, $\alpha4\beta3$), joita esiintyy lähinnä solulimassa (Kim ja muut 2023; Tanahashi ja muut 2000). PA28 $\alpha\beta$ -20S-proteasomikompleksin esiintyminen vaihtelee (1–14 %) solulinjan mukaan (Fabre ja muut 2014a,b). PA28 γ muodostaa homoheptameerisen rakenteen, jota esiintyy lähinnä tumassa (Kim ja muut 2023). PA200-aktivaattorista on kolme erilaista muotoa, joista ainoastaan yksi on vuorovaikutuksessa 20S-proteasomin kanssa (Fabre ja muut 2014a). Sekä PA200 että PA28 voivat muodostaa yhdessä 19S RP:n kanssa hybridiproteasomin (Kim ja muut 2023, Tanahashi ja muut 2000). Molemmat aktivaattorit kykenevät avustamaan ainoastaan pienten peptidien hydrolyysissa (Kim ja muut 2023; Stadtmueller ja Hill 2011). PA200 ja PA28 γ muodostamia 20S-proteasomikomplekseja esiintyy solussa alle 5 % kaikista proteasomeista, mutta niiden määrän on havaittu nousevan, kun soluun kohdistetaan stressitekijöitä (Fabre ja muut 2014a,b).

Ubikitinaatio on yksi yleisimmistä reversiibeleistä post-translationalisista modifikaatioista (*post-translational modification*), jonka avulla ATP-riippuvainen 26S-proteasomi tunnistaa ja hajottaa väärinlaskostuneet tai avautuneet proteiinit (Fabre ja muut 2014a; Li ja muut 2022). Ubikitinaatioissa substraattiproteiinin N-terminaaliseen päähän liitetään yksittäinen ubikitiinimolekyyli tai polyubikitiiniketju, jonka avulla proteasomit voivat tunnistaa substraatin. Arviolta noin 80 % solun proteiineista hajotetaan 26S-proteasomin avulla. (Kim ja muut 2023.) 20S-proteasomi puolestaan hajottaa ATP:sta ja ubikitiinista riippumattomalla tavalla proteiineja, jotka ovat hapettuneita, luonnostaan rakenteettomia tai sisältävät rakenteettomia alueita (*intrinsically disordered proteins/regions*, IDP/R) (Davies 2001; Kim ja muut 2023; Liu ja muut 2003). Tällaisia proteiineja ovat muun muassa p21, p53, tau ja α -synukleiini, jotka kaikki liittyvät erilaisiin sairauksiin (Ben-Nissan ja Sharon 2014). 20S-proteasomin kyky hajottaa kyseisiä proteiineja viittaa siihen, että IDP/R:llä ja oksidatiivisilla proteiineilla on spesifejä ominaisuuksia, joiden avulla ne ohjautuvat suoraan 20S-proteasomiin edistäen niiden hajotusta (Liu ja muut 2003). 20S-proteasomi pystyy esimerkiksi tunnistamaan erityisesti hapettuneiden proteiinien hydrofobiset rakenteet ja täten pilkkomaan ne (Davies 2001; Raynes ja muut 2016). Lisäksi Sahu

työryhmineen (2021) havaitsi, että substraattiin kiinnitetty ubikitiini voidaan hajottaa yhdessä substraatin kanssa 20S-proteasomilla.

Useiden tutkimusten mukaan 20S-proteasomilla on merkittävä rooli IDP/R:n ja oksidatiivisten proteiinien hajotuksessa, kun soluun kohdistetaan stressitekijöitä (Davies 2001; Liu ja muut 2003; Raynes ja muut 2016; Sahu ja muut 2021). Sen on ehdotettu toimivan niin sanottuna hätäproteasomina (Jung ja Grune 2008; Jung ja muut 2014; Myers ja muut 2018). Tämä voi johtua siitä, että oksidatiivisen stressin aikana 26S-proteasomi on labiilimpi kuin 20S-proteasomi, ja 26S dissosioituu 19S RP:ksi ja 20S-proteasomiksi (Abi Habib ja muut 2020; Ben-Nissan ja Sharon 2014; Kim ja muut 2023; Sahu ja Glickman 2021). Oksidatiivisen stressin jälkeen 26S-proteasomin määrä solussa nousee jälleen sitä edeltävälle tasolle (Abi Habib ja muut 2020). Tämä viittaa siihen, että 26S- ja 20S-proteasomit toimivat enemmänkin toisiaan täydentävinä mekanismeina, kun solu pyrkii sopeutumaan muuttuviin olosuhteisiin. Suurin osa solun proteasomeista esiintyy vapaana 20S-proteasomina (noin 50 %) solulinjasta riippumatta (Sahu ja Glickman 2021). Tämä viittaa siihen, että solu pystyy nopeasti mukauttamaan proteolyttista toimintaansa tarpeiden mukaan, kun soluun kohdistetaan stressitekijöitä. On kuitenkin vielä epäselvää, miten 20S-hajotusmekanismi aktivoituu ja miksi vapaan 20S-proteasomin osuus solussa on niin suuri.

20S-proteasomin rakenteen ja sen kokoonpanoon vaikuttavien säätelytekijöiden tutkiminen on tärkeää useasta syystä. 20S-proteasomin merkitys solujen homeostaasin ylläpidossa on tärkeää, sillä se auttaa ymmärtämään solujen kykyä sopeutua erilaisiin vallitseviin olosuhteisiin. Lisäksi 20S-proteasomin rooli monissa häiriötiloissa, kuten syövässä tai neurodegeneratiivissa sairauksissa, korostaa 20S-proteasomin tutkimuksen merkitystä uusien hoitokeinojen kehittämisessä. Tutkimalla 20S-proteasomin rakenteellisia yksityiskohtia ja kokoonpanomekanismia, saadaan arvokasta tietoa, joka voi tukea lääketieteellistä tutkimusta. Tässä tutkielmassa keskitytään eukaryyottien, erityisesti nisäkkäiden, 20S-proteasomin rakenteelliseen analyysiin. Lisäksi tarkastellaan nykytiedon perusteella 20S-proteasomin kokoonpanomekanismia ja kokoamista ohjaavien säätelytekijöiden roolia mekanismeissa.

2 20S-proteasomi

2.1 20S-proteasomin rakenne ja aktiiviset keskukset

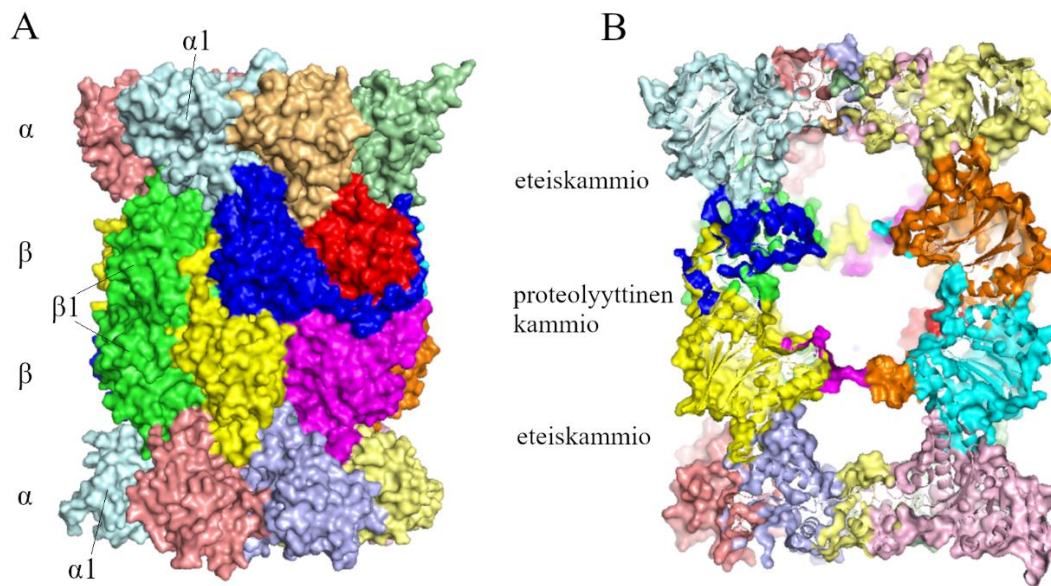
20S-proteasomin (~750 kDa) rakenne on konservoitunut ja se koostuu 28 alayksiköstä, jotka järjestäytyvät neljäksi homologiseksi renkaaksi. Renkaat asettuvat päällekkäin niin, että kaksi β -rengasta ($\beta 1$ - $\beta 7$) sijaitsee rakenteen keskellä, ja α -renkaat ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) sijoittuvat rakenteen molempiin päihin muodostaen ontion ja sylinterimäisen $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -rakenteen (kuva 1A). (Fabre ja muut 2014a; Tanahashi ja muut 2000; Tanaka 2009.) Rakenteen perusteella on havaittu, että dimeerisen proteasomin $\alpha\beta$ -renkaiden kaikki $\alpha 1$ - ja $\beta 1$ -alayksiköt ovat linjassa keskenään, ja renkaiden muut alayksiköt kiertävät vastakkaisiin suuntiin (kuva 1A) (Sahu ja Glickman 2021). Kuvasta 1B nähdään, että 20S-proteasomissa on kolme kammiota (*chamber*): kaksi eteiskammiota (*antechamber*) rakenteen molemmissa päissä ja yksi keskellä sijaitseva proteolyytin kammio (*central catalytic chamber*), joka muodostuu β -alayksiköistä (Sahu ja Glickman 2021).

α -renkaiden tehtävänä on säädellä substraatin sisäänkäyntiä proteasomin sisäosaan, kun taas β -renkaat muodostavat proteasomin katalyyttisen keskuksen. Ainoastaan $\beta 1$ -, $\beta 2$ - ja $\beta 5$ -alayksiköt ovat proteolyytisesti aktiivisia ja kykenevät hydrolysoimaan proteiinien peptidisidoksia. (Budenholzer ja muut 2017; Kim ja muut 2023.) Jokainen proteolyytisesti aktiivinen β -alayksikkö hajottaa peptidisidoksen tietystä kohtaa substraattia. Aktiivisten keskusten S1-taskujen (*S1-pockets*) rakenteelliset ominaisuudet vaikuttavat proteasomin kykyyn tunnistaa tiettyjä peptidisidokseja (Abi Habib ja muut 2022). $\beta 1$ -alayksikkö, jolla on peptidyyli-glutamyyli-peptidihydrolyysi-aktiivisuus (*peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing activity*, PGPH), käyttää S1-taskun pohjalla sijaitsevaa positiivisesti varautunutta arginiinia (Arg45) hydrolysoidakseen peptidisidoksen happamien aminohappojen C-terminaalista päästä. $\beta 2$ -alayksiköllä on puolestaan trypsiinin kaltainen aktiivisuus (*trypsin-like activity*), ja S1-taskun glysiinin (Gly45) tai negatiivisesti varautuneen aspartaatin (Asp55) avulla alayksikkö pilkkoo peptidisidokset emäksisen aminohapon karboksyyli-ryhmän puolelta. $\beta 5$ -alayksikön S1-taskun metioniini (Met45) mahdollistaa hydrofobisten aminohappojen jälkeisten peptidisidosten katkaisun kymotrypsinin kaltaisen aktiivisuuden (*chymotrypsin-like activity*) avulla. (Kim ja muut 2023; Marques ja muut 2009; Serrano-Aparicio ja muut 2022; Tanaka 2009.)

Proteasomin β -renkaat järjestäytyvät päällekkäin siten, että ainoastaan $\beta 1$ -alayksiköt ovat kohdakkain. Koska kaksi muuta katalyyttistä alayksikköparia eivät sijaitse rakenteessa päällekkäin, muodostuu β -renkaiden rakenteeseen aukko, jossa ei ole proteolyyttistä aktiivisuutta. Kun verrataan eukaryoottisen 20S-proteasomin β -renkaiden rakennetta ja katalyyttistä aktiivisuutta esitumallisten 20S-proteasomeihin, havaitaan, että esitumallisilla kaikki neljätöistä β -alayksikköä ovat sekä rakenteeltaan että proteolyytiseltä aktiivisuudeltaan samanlaisia. On siis mahdollista, että evoluution aikana eukaryoottien 20S-proteasomien rakenne on muuttunut siten, että nämä aukot mahdollistavat pidempien peptidien muodostumisen. Näitä peptidejä voidaan

myöhemmin hyödyntää esimerkiksi solusignaaloinnissa. (Budenholzer ja muut 2017; Sahu ja Glickman 2021.)

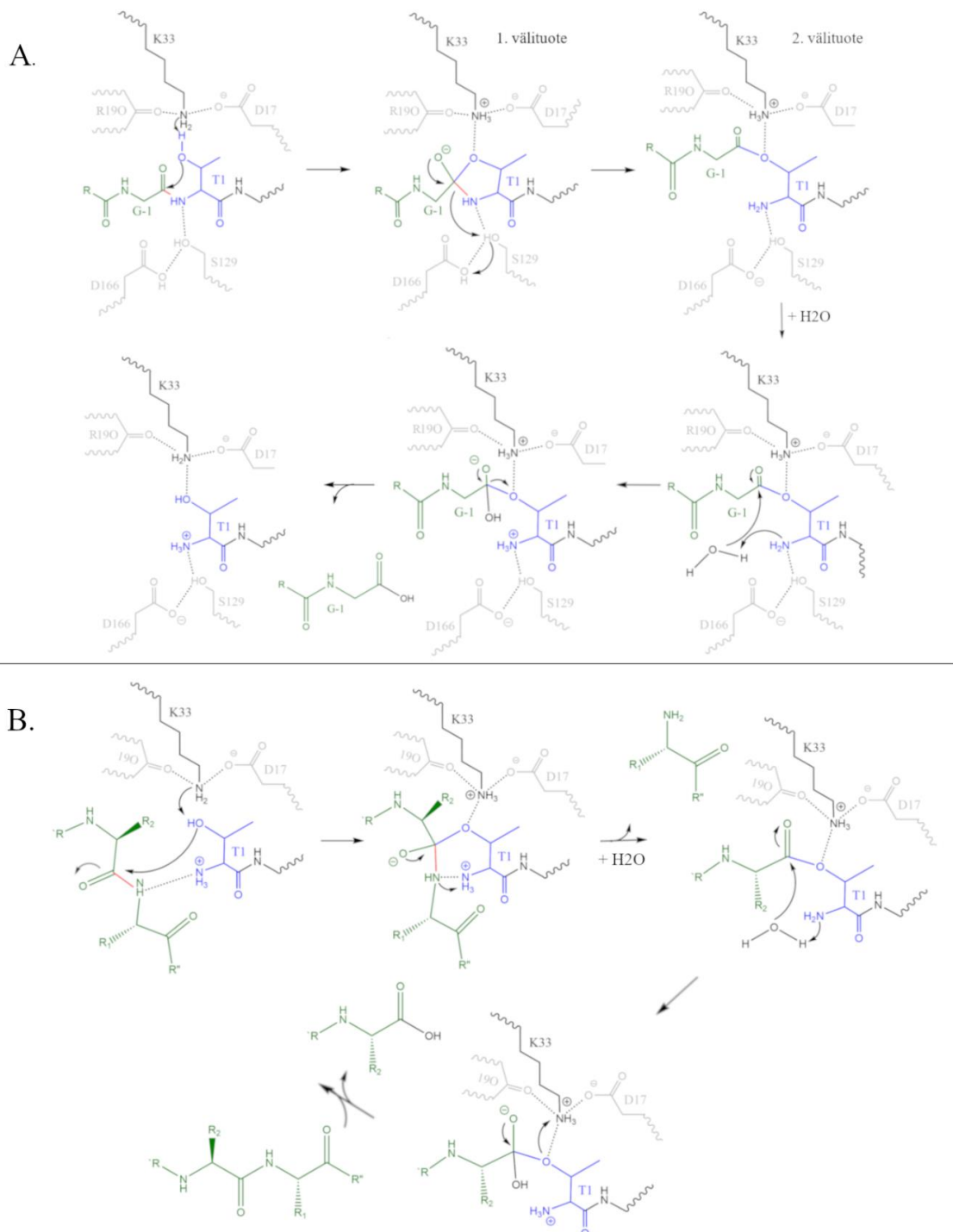
β -renkaan aktiiviset keskukset ovat treoniini-proteaseja, joissa kunkin β -alaysikön N-terminaaliosassa sijaitseva konservoitu treoniini (Thr, T) toimii nukleofiilina hydroksyyli-ryhmänsä ansiosta (Budenholzer ja muut 2017; Kim ja muut 2023). Nämä β -alaysiköt aktivoidaan niiden N-terminaalisen propeptidien autokatalyyttisen hajotuksen avulla, mikä paljastaa proteolyttisesti aktiivisen treoniinin. Propeptidien pääasiallisena tehtävänä on suojata N-terminaalista treoniinia asetylaatiolta ja auttaa proteasomin alaysiköitä niiden oikeanlaisessa laskostumisessa ja kokoonpanossa (Kisselev ja muut 2000).



Kuva 1. Ihmisen 20S-proteasomin rakenne. (A) 20S proteasomin $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -rakenne, jossa ylempi $\alpha\beta$ -renkas kiertää vastapäivään ja alempi $\alpha\beta$ -renkas kiertää myötäpäivään. Renkaiden $\alpha 1/\beta 1/\beta 1/\alpha 1$ -alaysiköt ovat linjassa keskenään. Jokainen alaysikkö on kuvattu omalla värillä: $\beta 7$ (keltainen), $\beta 6$ (magenta), $\beta 5$ (oranssi), $\beta 4$ (syaani), $\beta 3$ (punainen), $\beta 2$ (sininen), $\beta 1$ (vihreä), $\alpha 7$ (lohenpunainen), $\alpha 6$ (vaaleansininen), $\alpha 5$ (vaaleankeltainen), $\alpha 4$ (vaaleanpunainen), $\alpha 3$ (vaaleanvihreä), $\alpha 2$ (vaaleanoranssi), $\alpha 1$ (vaaleansyaani). (B) 20S-proteasomin ontto rakenne, josta nähdään molemmissa päissä sijaitsevat eteiskammiot ja keskellä sijaitseva proteolyttinen kammio, jossa proteiinit hajotetaan. 20S-proteasomin malli on tehty käyttäen PyMOL-ohjelmaa (The PyMOL Molecular Graphics System 2.4.1, Schrödinger, LCC) perustuen aiemmin julkaistun kiderakenteeseen (1.8 Å, Schrader ja muut 2016).

Eukaryoottien katalyyttisessä keskuksessa sijaitsee treoniinin (Thr1, T1) lisäksi kaksi muuta konservoitunutta aminohappoa: asparagiinihappo (Asp17, D17) ja lysiini (Lys33, K33) (Marques ja muut 2009). Lisäksi lähellä katalyyttistä treoniinia sijaitsevat seriinit (Ser129, S129 ja Ser169, S169) ja asparagiinihappo (Asp166, D166) stabiloivat treoniinin konformaatiota vetysidoksien avulla (Marques ja muut 2009). Huber ja työryhmä (2016) ovat osoittaneet, että kyseinen Thr-Lys-Asp-ryhmä on kriittinen tekijä sekä autokatalyyttisessä prosessoinnissa että substraattien proteolysissa. On ehdotettu, että autokatalyyttisessä prosessoinnissa vesimolekyyli tai lysiinin (K33) amiiniryhmä, joka sijaitsee treoniinin läheisyydessä (2.7 Å), deprotonoi treoniinin hydroksyyli-ryhmän (Huber ja muut 2016). Zhou työryhmineen (2023) on lisäksi osoittanut, että D17:n polaarisuus edistää K33:n protonaatiota. Deprotonoitunut treoniinin (T1O γ) hydroksyyli-ryhmä toimii nukleofiilina hyökäten viereisen glysiinin (Gly-1, G-1) aminohapon

karbonyylihiileen, jolloin muodostuu tetrahedraalinen oksatsolidiini-väliuote. Glysiinin (G-1) amiiniryhmä toimii reaktiossa oksianioniaukkona (*oxyanion hole*), stabiloiden negatiivisesti varautuneen väliuotteen. Seuraavaksi treoniinin amiiniryhmä hyökkää seriinin (S129) hydroksyyliin, joka puolestaan hyökkää asparagiinihapon (D166) hydroksyyliin, muodostaen uuden vetysidoksen aminohappojen välille. Lopuksi treoniinin amiiniryhmä polarisoi vesimolekyylin, joka hyökkää muodostuneen asyylientsyymi-väliuotteen karbonyylihiileen, vapauttaen N-terminaalisen treoniinin G-1:stä. (Huber ja muut 2016.) Huber työryhmineen (2016) on myös osoittanut, että substraatin proteolyysissä tapahtuu lähes samankaltainen reaktio kuin autokatalyyttisessä prosessoinnissa. Kemialliset reaktiomekanismit on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. 20S-proteasomin aktiivisten keskusten reaktiomekanismit. (A) Autokatalyyttinen prosessointi. Proteasomin β -alaysiköiden aktivointi ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) N-terminaalisen propeptidin autokatalyyttisellä hajotuksella. Reaktiossa lysini (K33) deprotonoi treoniinin (T1) hydroksyyliiryhmän, joka hyökkää glysiinin (G-1) karbonyylihiileen muodostaen tetrahedraalisen oksatsolidiini-väliuotteen (1. väliuote). G-1NH toimii oksianioniaukkona, stabiloiden negatiivisesti varautuneen väliuotteen. T1NH hyökkää seriinin (S129) hydroksyyliiryhmään, joka puolestaan hyökkää vieressä olevaan asparagiinihapon (D166) hydroksyyliiryhmään. Tällöin peptidisidos katkeaa ja muodostuu asyylientsyymi-väliuote (2. väliuote), johon T1NH₂:n polarisoima vesimolekyyli hyökkää. Seurauksena on N-terminaalisen treoniinin vapautuminen G-1:sta. Arginiini (R190) yhdessä muiden aminohappojen kanssa stabiloi katalyyttisen treoniinin konformaatiota. (B) Proteolyysi. Substraatin proteolyttinen hajotus β -alaysikön ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) aktiivisen keskuksen toimesta. T1:n deprotonoitu hydroksyyliiryhmä hyökkää katkaistavan peptidisidoksen karbonyylihiileen. Katkenneen peptidisidoksin amiiniryhmä vastaanottaa T1NH₂:ta vedyn, jolloin deprotonoitu T1NH₂ polarisoi vesimolekyylin asyylientsyymien hydrolyysia varten. Kuva on mukailtu artikkelissa Huber ym. (2016) esitetystä kuvasta.

2.2 20S-proteasomin alatyypit

Nisäkässolujen 20S-proteasomista on pystytty selvittämään kuusi erilaista kiderakennetta. Näissä rakenteissa $\beta 1$ -, $\beta 2$ - ja $\beta 5$ -alaysiköt on korvattu niiden homologisilla alaysiköillä ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$, $\beta 5t$). Yhtenä 20S-proteasomin rakennevarianttina on immunoproteasomi, jota esiintyy pääasiassa immuunisoluissa, kuten T- ja B-soluissa sekä antigeeniä esittelevissä soluissa. (Abi Habib ja muut 2022.) Sen on havaittu esiintyvän erityisesti PA28 $\alpha\beta$ -proteasomiaktivaattorin kanssa (Račková ja Csekés 2020). Immunoproteasomissa β -alaysiköt on korvattu $\beta 1i$ -, $\beta 2i$ - ja $\beta 5i$ -alaysiköillä, mikä lisää proteasomin kymotrypsiinin ja trypsiinin kaltaista aktiivisuutta (Abi Habib ja muut 2022). Tämän seurauksena proteasomit tuottavat enemmän antigeenipeptidejä, joiden C-terminaaliossa on hydrofobinen tai emäksinen aminohappo. Luokan I MHC (*major histocompatibility complex*) proteiinit suosivat tämänkaltaisia peptidejä, mikä edistää solun immuunivastetta (Tanaka 2009). Hajotetut antigeenipeptidit liitetään MHC luokan I molekyylien pinnalle solulimakalvostolla, minkä jälkeen kompleksia esitellään sytotoksisille T-soluille. On havaittu, että $\beta 5i$ -alaysikön S1-taskun metioniinin (Met45) ja glutamiinin (Gln53) van der Waals-vuorovaikutukset suurentavat S1-taskun kokoa, minkä takia S1-taskuun mahtuu suurempia hydrofobisia substraatteja. (Abi Habib ja muut 2022.) β -alaysiköiden esiintymiseen vaikuttavat stressiolosuhteet, erityisesti oksidatiivinen stressi, sekä tulehdussytokiinin esiaste (pro-inflammatory cytokines), kuten interferonit (INF- $\gamma/\alpha/\beta$) ja tuumorinekroositekijä (*tumor necrosis factor*, TNF) (Abi Habib ja muut 2022; Murata ja muut 2018). Tutkimuksessa on lisäksi löydetty todisteita siitä, että $\beta 5i$ -alaysiköllä on merkittävä rooli hapettuneiden proteiinien pilkkomisessa (Abi Habib ja muut 2020).

20S-proteasomista on havaittu rakenteita, joissa vain osa proteolyttisesti aktiivisista β -alaysiköistä on korvattu homologisilla β -alaysiköillä. Tämänkaltaisia proteasomeja kutsutaan sekaproteasomeiksi (*mixed/intermediate proteasomes*) ja niitä esiintyy kahdessa päämuodossa: ensimmäisessä muodossa esiintyy $\beta 1$ -, $\beta 2$ - ja $\beta 5i$ -alaysiköitä, kun taas toisessa muodossa esiintyy $\beta 1i$ -, $\beta 2$ - ja $\beta 5i$ -alaysiköitä. (Abi Habib ja muut 2022; Kim ja muut 2023.) Näiden proteasomimuotojen olemassaolo lisää peptidien monimuotoisuutta antigeenien esittelystä (Budenholzer ja muut 2017). Lisäksi on pystytty keinotekoisesti rakentamaan erilaisia

proteasomiyhdistelmiä β - ja β i-alayksiköistä, mutta niiden luonnollista esiintymistä soluissa ei ole pystytty vahvistamaan (Abi Habib ja muut 2022).

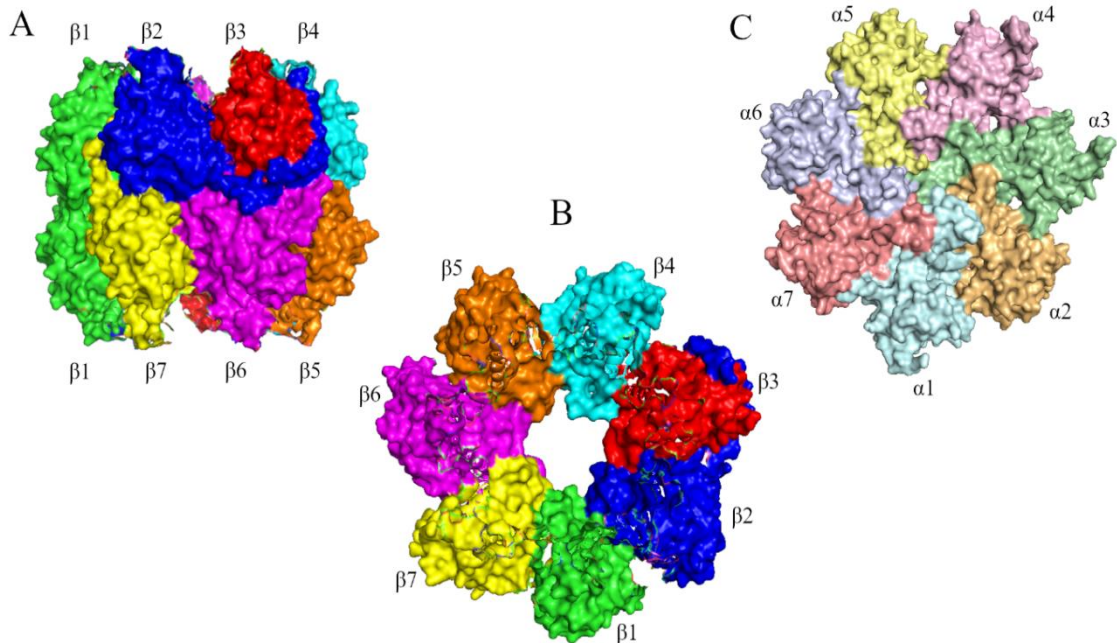
Kateenkorvan kuorikerroksen epiteelisoluissa (*cortical thymic epithelial cells*, cTECs) esiintyvän tymoproteasomin β -renkaan katalyyttisesti aktiiviset β -alayksiköt on korvattu β 1i-, β 2i ja β 5t-alayksiköillä (Kim ja muut 2023). Rakenteessa esiintyvä β 5t-alayksikkö on homologinen β 5-alayksikölle, ja sen on havaittu alentavan kymotrypsiinin kaltaista aktiivisuutta verrattuna β 5- tai β 5i-alayksiköihin (Abi Habib ja muut 2022; Tanaka 2009). Tämä viittaa siihen, että tymoproteasomin avulla lisätään luokan I MHC proteiineihin kiinnittyvien peptidien monimuotoisuutta, ja siten vaikutetaan T-lymfosyyttien esiasteiden kehitykseen kateenkorvassa. Tutkimustulokset osoittavatkin, että tymoproteasomilla on tärkeä rooli CD8+-T-lymfosyyttien positiivisessa valinnassa tuottamalla sellaisia peptidejä, jotka johtavat alhaisen affiniteetin sitoutumiseen T-solureseptorin (TCR) ja MHC-peptidikompleksin välillä (Nitta ja muut 2010; Sasaki ja muut 2015; Takada ja muut 2015).

20S-proteasomista on myös vaihtoehtoisia rakennemuotoja, joissa α -alayksiköitä on korvattu niiden homologeilla. Tällaisia esimerkiksi ovat spermatoproteasomit, joissa α 4-alayksikkö on korvattu homologisella α 4s-alayksiköllä. Tämä alayksikön vaihdos ei kuitenkaan vaikuta proteasomin katalyyttiseen aktiivisuuteen, sillä β -renkaan alayksiköt pysyvät standardeina. Spermatoproteasomeja esiintyy urospuolisen nisäkkään sukusoluista kehittyvissä spermatosyyteissä ja sillä on keskeinen rooli spermatogeneesissä. (Abi Habib ja muut 2022; Budenholzer ja muur 2017.) *Drosophila*-suvun mahlakärpästen hedelmällisyyteen vaikuttavat puolestaan kivesspesifiset proteasomit, joissa α 6-alayksikkö on korvattu α 6T-alayksiköllä (Budenholzer ja muur 2017).

3 20S-proteasomin kokoonpano

20S-proteasomin kokoaminen on tarkkaan säädelty, monivaiheinen prosessi, jossa α - ja β -alaysiköt muodostavat sylinterimäisen ja onton rakenteen. Tässä prosessissa β -propeptidialaysiköt käyvät läpi autokatalyyttisen prosessoinnin, mikä on edellytys 20S-proteasomin aktivoitumiselle. α - ja β -alaysiköiden järjestys renkaissa on esitetty kuvassa 3. Eukaryoottisen proteasomin kokoonpanon avustavina tekijöinä ovat kaksi konservoitunutta heterodimeeristä kaperonia, hiivan Pba1-Pba2 ja Pba3-Pba4 (ihmisen PAC1-PAC2 ja PAC3-PAC4), sekä konservoitunut Ump1-kaperoni (*ubiquitin-mediated proteolysis*; ihmisen hUmp1, POMP). (Budenz ja muut 2017; Kim ja muut 2023; Murata ja muut 2009.)

On ehdotettu, että proteasomin kokoonpano tapahtuu kolmessa päävaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa Pba1/2- ja Pba3/4-kaperonit avustavat α -alaysiköitä renkaan muodostamisessa. Toisessa vaiheessa β -alaysiköt kiinnitetään vaiheittain α -renkaaseen, jolloin muodostuu kaksi puoliproteasomia, jotka viimeisessä vaiheessa dimerisoituvat kokonaiseksi 20S-proteasomiksi. Tämän prosessin aikana muodostuu 13S-kompleksi, joka sisältää α -renkaan (α 1-7), kolme β -alaysikköä (β 2-4), Pba1/2 sekä Ump1-kaperonin. 13S-kompleksin muodostuminen edellyttää Pba3/4-kaperonien poistamista rakenteesta. 15S-kompleksi muodostuu, kun β 1-, β 5- ja β 6-alaysiköt kiinnitetään rakenteeseen. β 7-alaysikkö kiinnitetään viimeisenä, jolloin muodostuu puoliproteasomi. Viimeisessä vaiheessa β -alaysiköiden propeptidit prosessoidaan autokatalyyttisesti ja kaperonit vapautetaan rakenteesta. (Schnell ja muut 2021.)



Kuva 3. Ihmisen 20S proteasomin α - ja β -renkaat. (A) 20S proteasomin heptameeriset β -renkaat, joiden alaysiköt kiertävät vastakkaisiin suuntiin. Alaysiköiden värit: β 7 (keltainen), β 6 (magenta), β 5 (oranssi), β 4 (syaani), β 3 (punainen), β 2 (sininen), β 1 (vihreä). β 7-alaysikön pitkä C-terminaalinen häntä ulottuu vastakkaisen β -renkaan β 1:n ja β 2:n väliseen rajapintaan. β 2-alaysikön pitkä C-terminaalinen häntä kietoutuu β 3:n ympärille. (B) 20S proteasomin β -renkas ylhäältä kuvattuna. (C) 20S proteasomin heptameerinen α -renkas ylhäältä kuvattuna. Alaysiköiden värit: α 7 (lohenpunainen), α 6 (vaaleansininen), α 5 (vaaleankeltainen), α 4 (vaaleanpunainen), α 3 (vaaleanvihreä), α 2 (vaaleanoranssi), α 1 (vaaleansyaani). α 3-alaysikön pitkä N-terminaalinen häntä ulottuu α -renkaan aukon keskelle. Kuvat on tehty käyttäen PyMOL-ohjelmaa (The PyMOL Molecular Graphics System 2.4.1, Schrödinger, LCC) perustuen aiemmin julkaistuun kiderakenteeseen (1.8 Å, Schrader ja muut 2016).

3.1 α -rengas

Eukaryoottisen 20S-proteasomin kokoaminen alkaa heteroheptameeristen α -renkaiden muodostamisella, mikä tapahtuu Pba1-Pba2 (PAC1/2)- ja Pba3-Pba4 (PAC3/4)-kaperonien avustuksella ennen β -alaysiköiden kiinnittymistä α -renkaaseen (Budenholzer ja muut 2017; Schnell ja muut 2021). Pba3/4-heterodimeeri kiinnittyy α -renkaan sille puolelle, johon β -rengas myöhemmin kiinnitetään. Pba1/2-heterodimeeri puolestaan kiinnittyy α -renkaan vastakkaiselle puolelle, johon proteasomiaktivaattorit myöhemmin kiinnittyvät (Schnell ja muut 2022b; Tanaka 2009).

Alaysiköiden tarkkaa järjestystä α -renkaan kokoamisessa ei ole vielä lopullisesti vahvistettu, mutta tutkimukset ovat antaneet viitteitä mahdollisesta järjestyksestä. On ehdotettu, että Pba3/4 (PAC3/4) -kaperonit avustavat α 4-7-alaysiköitä muodostamaan välikompleksin, johon loput α -alaysiköt kiinnittyvät (Kusmierczyk ja muut 2008; Wu ja muut 2018). Tutkimukset osoittavat, että Pba3/4-kaperonikompleksi on spesifissä vuorovaikutuksessa α 5-alaysikön kanssa, mikä edesauttaa α 4-7-välikompleksin muodostumista (Kusmierczyk ja muut 2008; Takagi ja muut 2014; Yashiroda ja muut 2008). Tätä väittämää tukee havainto Pba3-Pba4- α 5-kiderakenteesta (2.9 Å) sekä tieto siitä, että Pba3/4-kaperonit edistävät α 4- ja α 5-alaysiköiden kiinnittymistä toisiinsa α -renkaan kokoamisprosessin aikana (Takagi ja muut 2014; Yashiroda ja muut 2008). Pba3/4-kaperonit irrotetaan kuitenkin α -renkaasta ennen 13S-kompleksin muodostumista, koska Ump1-kaperonin kiinnittyminen α 7- ja α 1-4-alaysiköihin aiheuttaa steerisen esteen Pba4-kaperonin kanssa (Schnell ja muut 2021). On myös ehdotettu, että β 4-alaysikön (Budenholzer ja muut 2017) tai β 3-alaysikön (Hirano ja muut 2008) kiinnittyminen α -renkaaseen aiheuttaa steerisen esteen Pba3/4:n kanssa, mutta näistä vaihtoehdoista ei ole vielä muodostettu yhteistä konsensususta.

α -renkaan kokoonpanoa avustaa myös toinen kaperonipari Pba1-Pba2 (PAC1-PAC2), jonka päätehtävänä on stabiloida α -rengasta 20S-proteasomin kokoonpanon aikana sekä estää ennenaikainen dimerisaatio toisen α -renkaan tai proteasomiaktivaattorin kanssa (Budenholzer ja muut 2017; Schnell ja muut 2021). Pba1/2-kaperonit kiinnittyvät muodostuvaan α -renkaaseen samalla tavalla kuin 19S RP ja PA200. Kiinnittyminen tapahtuu Pba1/2-kaperonien C-terminaalisen pään HbYX-motiivin (*hydrophobic-tyrosine-any amino acid*) avulla. Pba1-kaperonin HbYX-motiivi kiinnittyy α 5- α 6-alaysiköiden väliseen tilaan, kun taas Pba2-kaperonin HbYX-motiivi kiinnittyy α 6- α 7-alaysiköiden väliseen tilaan (Budenholzer ja muut 2017; Fabre ja muut 2014; Schnell ja muut 2022a). Pba1-kaperonin N-terminaalinen pää puolestaan sukeltaa muodostuvan proteasomin sisäosaan α -renkaan aukosta, ja on vuorovaikutuksessa Ump1:n, β 5-propeptidin ja jokaisen α -alaysikön kanssa (Schnell ja muut 2021). Pba1/Pba2 sitoutuu 20S-proteasomin esiasteeseen huomattavasti tiukemmin kuin 20S-proteasomiin (Budenholzer ja muut 2017). Tämän on ehdotettu johtuvan HbYX-motiiveista (Budenholzer ja muut 2017) tai Pba1-kaperonin assosiaatiosta Ump1:n ja β 5-propeptidin kanssa 20S-proteasomin kokoonpanon aikana (Schnell ja muut 2021).

α 1-3-alayksiköiden liittämismekanismi α 4-7-välikompleksiin on vielä epäselvä. On havaittu kuitenkin, että α 1- ja α 3-alayksiköt voidaan liittää yksinään välikompleksiin, mutta α 2-alayksikön kiinnittyminen on riippuvainen α 1-alayksiköstä. α 2-alayksikön kiinnittyminen välikompleksiin on säädelty siten, että se on liitettävä α 1-alayksikön jälkeen. (Watanabe ja muut 2022; Wu ja muut 2018.) Schnell työryhmineen (2022a) havaitsivat, että Pba1-kaperonin N-terminaalinen pää on vuorovaikutuksessa α 1-3-alayksiköiden kanssa, jolloin on mahdollista, että Pba1/2-kaperonit avustavat kyseisten alayksiköiden liittämisessä α 4-7-välikompleksiin.

Marshall työryhmineen (2020) löysi hiljattain lituruohosta (*Arabidopsis thaliana*) proteasomiin sidonnaisen kaperonin (PBAC5), jonka C-terminaaliosassa on HbYX-motiivi ja se sitoutuu α 4- α 5-alayksiköiden väliseen taskuun. PBAC5:n on havaittu muodostavan heterotrimeerin PAC1-PAC2-kompleksin kanssa. Tämä viittaa siihen, että PBAC5-kaperonilla on rooli 20S-proteasomin kokoonpanossa. Kyseisen kaperonin toimintaa ei kuitenkaan ole vielä määritetty, mutta sen homologisia geenejä on löydetty kaikista kasvilajeista, useista *Oomycetes*-luokan munasienistä sekä joistakin sienistä.

3.2 β -rengas

α -renkaan kokoamisen jälkeen β -alayksiköt muodostavat renkaan. β -renkaan irrallisia välituotteita ei ole havaittu solussa, mikä viittaa siihen, että β -alayksiköt kiinnittyvät suoraan α -renkaaseen (Hirano ja muut 2008). Ump1 (hUmp1) koordinoi β -alayksiköiden kiinnittymistä α -renkaaseen ja osallistuu puoliproteasomien dimerisaatioon (Morris ja Da Fonseca 2021; Schnell ja muut 2021; Tanaka 2009). Lisäksi useat β -alayksiköiden C-terminaaliset hännät ja N-terminaaliset propeptidit toimivat proteasomin kokoonpanossa molekyylinsisäisinä kaperoneina (Hirano ja muut 2008; Matias ja muut 2010). Eukaryoottisissa soluissa β 1-2- ja β 5-7-alayksiköt sisältävät propeptidisegmentin (Matias ja muut 2010; Schnell ja muut 2022b).

Ump1-kaperoni kiinnittyy α -renkaan samalle puolelle kuin Pba3/4-kaperonit. Se koostuu seitsemästä α -kierteestä, jotka kiertävät proteasomin sisäkammion ympäri muodostaen kontaktin β 2-5-, α 7- ja α 1-4-alayksiköiden kanssa (Schnell ja muut 2022b). Kaperonin N-terminaalinen pää sijaitsee lähellä β 6-7-alayksiköiden liittymäkohtaa (Budenholzer ja muut 2017). β 7-alayksikön propeptidi vuorovaikuttavaa Ump1:n N-terminaalisen pään kanssa *in vitro* (Zimmermann ja muut 2022), minkä takia on ehdotettu, että Ump1 toimii niin sanottuna tarkistusasteena proteasomin kokoonpanossa. Tällä tarkoitetaan sitä, että Ump1-kaperoni varmistaa, että kaikki alayksiköt ovat kiinnittyneenä renkaaseen ennen puoliproteasomien dimerisaatiota ja mahdollisesti inhiboi β 7-alayksikön ennenaikaista kiinnittymistä. (Budenholzer ja muut 2017; Kusmierczyk ja Hochstrasser 2008; Li ja muut 2007; Tanaka 2009; Zimmermann ja muut 2022.) Ump1-kaperonin tarkka rooli puoliproteasomien dimerisaatiossa on kuitenkin yhä epäselvä.

β 2-alayksikkö kiinnittyy α -renkaaseen ensimmäisenä, minkä jälkeen β 3-, β 4-, β 5- ja β 6-alayksiköt kiinnittyvät renkaaseen. β 1-alayksikkö todennäköisimmin kiinnittyy β 6-alayksikön jälkeen, mutta sen on havaittu myös kiinnittyvän ennen β 4-6-alayksiköitä. (Hirano ja muut 2008.) Immuno- ja tymoproteasomeissa β 1i- ja β 2i-alayksiköt kiinnittyvän α -renkaaseen ensimmäisenä. Nämä alayksiköt liitetään samanaikaisesti, ja niiden jälkeen kiinnittyvät β 3- ja β 4-alayksiköt, muodostaen kyseisille proteasomeille tyypillisen 13S-kompleksin. β 1i- ja β 2i-alayksiköiden kiinnittyminen on hUmp1:sta riippuvainen. (Bai ja muut 2014.) Hirano ja muut (2008) osoittivat, että myös β 2-alayksikön kiinnittyminen α -renkaaseen edellyttää hUmp1-kaperonin läsnäoloa. Hiivassa Ump1-kaperoni kiinnittyy kuitenkin vasta β 2-alayksikön kiinnittymisen jälkeen (Hirano ja muut 2008; Yashiroda ja muut 2008). β 2-alayksikön N-terminaalinen propeptidi avustaa β 3-alayksikön ja mahdollisesti myös β 4-alayksikön oikeanlaisessa kiinnittymisessä α -renkaaseen (Ramos ja muut 2004; Schnell ja muut 2021). β 2-alayksikön C-terminaalinen häntä puolestaan stabiloi muodostuvaa rakennetta kietoutumalla β 3-alayksikön ympärille (Matias ja muut 2010; Schnell ja muut 2021; Tanaka 2009), kuten kuvassa 3A on esitetty. β 2-alayksiköiden N- ja C-terminaaliset hännät ovat täten kriittisiä toiminnallisen proteasomin kokoonpanolle (Matias ja muut 2010).

β 5-alayksikön N-terminaalinen propeptidi (75 aminohappoa) on pisin β -alayksiköissä esiintyvistä propeptideistä, ja sen on havaittu avustavan yhdessä Ump1:n kanssa puoliproteasomien dimerisaatiota sekä propeptidien autokatalyyttista hajotusta (Li ja muut 2007; Schnell ja muut 2022b). β 5-alayksikön liittäminen α -renkaaseen edellyttää β 4-alayksikön kiinnittymistä, kun taas β 6-alayksikön kiinnittyminen vaatii β 5-alayksikön propeptidin läsnäoloa (Bai ja muut 2014; Hirano ja muut 2008). Lisäksi on havaittu, että β 5-alayksikön kiinnittäminen 13S-kompleksiin on proteasomin kokoonpanoprosessin yksi nopeutta rajoittavista vaiheista (Bai ja muut 2014; Hirano ja muut 2008.) Bai työryhmineen (2014) osoitti, että immuno- ja tymoproteasomeissa β 5i- ja β 5t-alayksiköt voidaan liittää muodostuvaan β -renkaaseen heti β 3-alayksikön jälkeen β 4-alayksiköstä riippumattomalla tavalla. β 7-alayksikkö kiinnitetään viimeisenä proteasomin alatyypistä riippumatta, mikä käynnistää puoliproteasomien dimerisaation. (Bai ja muut 2014; Hirano ja muut 2008.)

3.3 Puoliproteasomin dimerisaatio ja 20S-proteasomin aktivointi

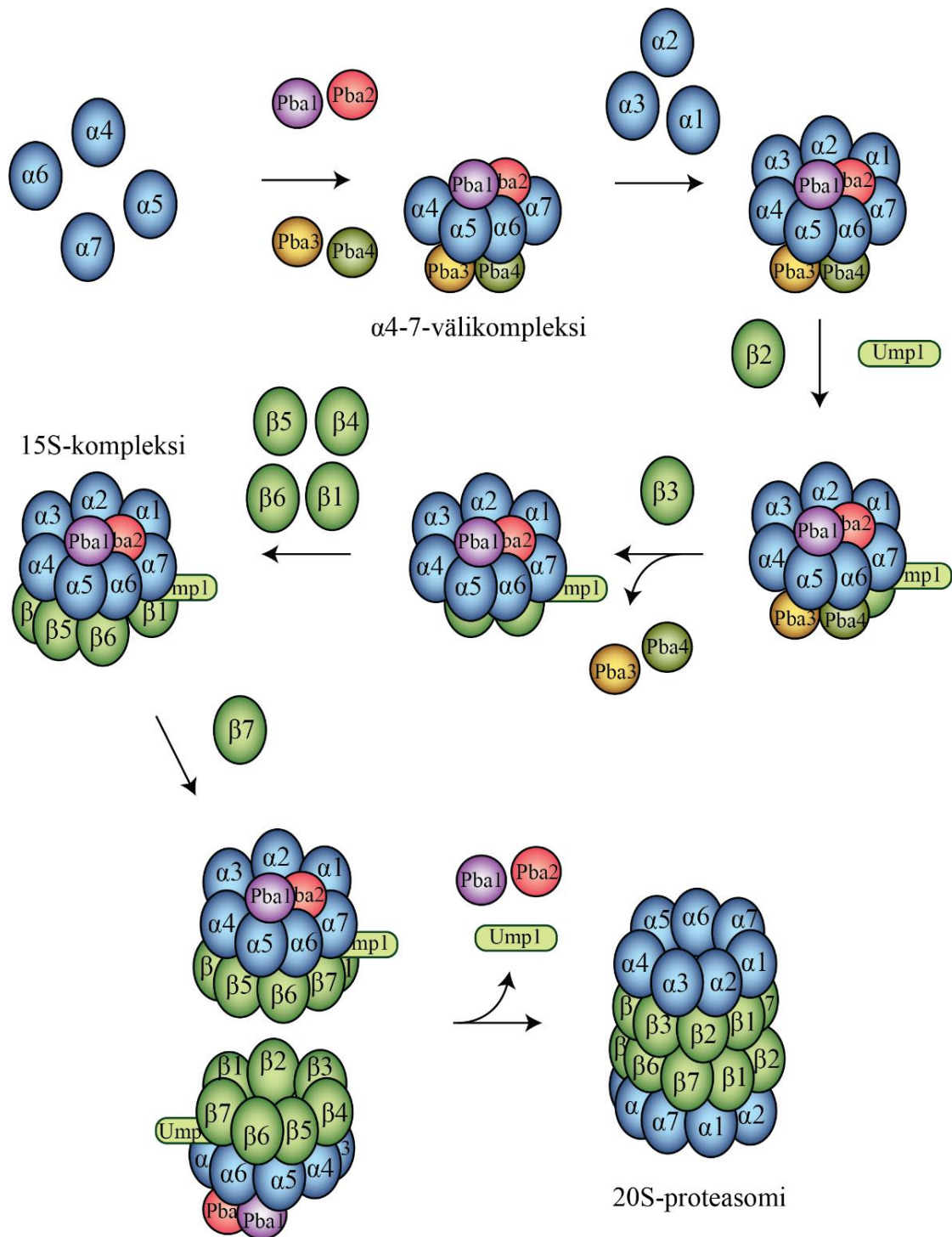
β 7-alayksiköiden C-terminaalisten päiden 17–19 viimeistä aminohappotähdettä kiinnittyy vastakkaisen 15S-kompleksin β 1-2-alayksiköiden väliin (kuva 3A), mikä johtaa puoliproteasomien muodostumiseen. Samaan aikaan β 7-alayksikkö yhdistää nämä muodostuneet puoliproteasomit toisiinsa. (Hirano ja muut 2008; Ramos ja muut 2004; Schnell ja muut 2022b.) Kyseessä olevien C-terminaalisten aminohappojen poistaminen heikentää puoliproteasomien dimerisaatiota, mikä johtaa 15S-kompleksien ja puoliproteasomien kertymiseen (Ramos ja muut 2004). β 7-alayksikön lisäksi β 5-propeptidi ja β 6-alayksikön yhdeksän viimeistä N-terminaalista

aminohappoa (*N-terminal extension*, NTE) edistävät proteasomin kokoonpanoa. Sen sijaan Ump1-kaperoni ja $\beta 6$ -propeptidi inhiboivat puoliproteasomien dimerisaatiota (Li ja muut 2007).

Puoliproteasomien dimerisaatiota seuraa β -alaysiköiden propeptidien ($\beta 1$ -2, $\beta 5$ -7) poistaminen autokatalyyttisesti ja Ump1-kaperonin sekä PAC1-PAC2-kaperonien hajotus muodostuneen 20S-proteasomin avulla (Hirano ja muut 2005). Hiivan Pba1-Pba2-kaperonien kohtalo kokoonpanon jälkeen on vielä epäselvä. On ehdotettu, että Pba1/2-kaperoni irrotetaan hajotuksen sijaan uudelleenkäyttöä varten. Pba1-kaperonin affiniteetti proteasomiin heikkenee Ump1:n ja $\beta 5$ -propeptidin hajottua, mikä mahdollistaisi Pba1-kaperonin irtoamisen. (Schnell ja muut 2022b.) Pba1/2-kaperonien irrottaminen johtaisi proteasomin α -renkaan aukon sulkeutumiseen, joka tapahtuu pääasiassa $\alpha 2$ -4-alaysiköiden N-terminaalisten päiden avulla. Lisäksi nämä alaysiköt ovat vuorovaikutuksessa Pba1/2-kaperonien kanssa (Bajorek ja Glickman 2004; Schnell 2022a).

Kuten tutkielmassa aiemmin esitettiin (2.1), on $\beta 1$ -, $\beta 2$ - ja $\beta 5$ -alaysiköiden propeptidien autokatalyyttisen prosessoinnin reaktiomekanismi tunnettu. Sen sijaan tapahtuma, joka laukaisee tämän reaktion puoliproteasomien dimerisaation jälkeen, on edelleen epäselvä. Lisäksi $\beta 6$ -7-alaysiköiden propeptidien autokatalyyttinen hajotusmekanismi on tuntematon, sillä alaysiköt eivät omaa Thr-Lys-Asp-ryhmää, kuten katalyyttisen keskuksen alaysiköt. On ehdotettu, että kaperonien poistamiseen ja aktiivisten keskusten aktivoitumiseen voi liittyä konformaatiomuutoksia proteasomissa (Marques ja muut 2009).

$\beta 7$ -alaysikön C-terminaalisen pään aminohapot muodostavat vetysidoksia $\beta 1$ -alaysikön aktiivisen keskuksen Thr-Lys-Asp-ryhmän lysiinin (Lys33) kanssa, mikä stabiloi tämän konformaatiota. C-terminaalisten aminohappojen poistaminen heikentää merkittävästi $\beta 1$ -alaysikön PGPH-aktiivisuutta. (Ramos ja muut 2004.) $\beta 1$ -alaysikön aktiivisuuden heikentymisen ei kuitenkaan havaittu vaikuttavan $\beta 2$ - ja $\beta 5$ -alaysiköiden aktiivisiin keskuksiin, mikä viittaa siihen, että aktiivisten keskusten propeptidien autokatalyyttinen hajotus ei ole ketjutettu reaktio. 20S-proteasomin kokoonpanomekanismi on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4: 20S-proteasomin kokoonpano. Eukaryoottisolun 20S-proteasomin kokoonpanoprosessi vaiheittain esitettyinä. α 4-7-alayksiköt muodostavat aluksi välikompleksin Pba3/4-kaperonien avustuksella. Pba1/2-kaperonit kiinnittyvät vasta, kun niiden C-terminaalisten päiden HbYX-motiiivit pääsevät kiinnittymään α 5-6- ja α 6-7-alayksiköiden välisiin taskuihin. α 1-3 liitetään muodostuneeseen välikompleksiin siten, että α 2 liitetään α 1:n jälkeen. α -renkaaseen liitetään ensimmäisenä Ump1-kaperoni sekä β 2. Pba3/4-kaperonit irtoavat rakenteesta steerisen esteen takia joko Ump1:n, β 3- tai β 4-alayksikön kiinnittymisen jälkeen. β 2 avustaa β 3:n ja mahdollisesti β 4:n kiinnittymisessä. 13S-kompleksi muodostuu, kun rakenne sisältää α 1-7, β 2-4, Ump1 ja Pba1/2-kaperonit. Tämän jälkeen β 5, β 6 ja β 1 kiinnittyvät. β 5:n kiinnittyminen edellyttää β 4 kiinnittymistä, kun taas β 6 edellyttää β 5-propeptidin kiinnittymistä. β 1 voi kiinnittyä joko β 6:n jälkeen tai ennen β 4-6-alayksiköitä. 15S-kompleksi muodostuu, kun rakenne sisältää α 1-7, β 1-6, Ump1 ja Pba1/2-kaperonit. Viimeisenä lisätään β 7, joka aktivoi puoliproteasomien dimerisaation 20S-proteasomiksi. β 7:n C-terminaalinen pää kiinnittyy vastakkaisen 15S-kompleksin β 1-2-alayksiköiden väliseen rajapintaan. Dimerisaation jälkeen β -alayksiköiden (β 1-2, β 5-7) propeptidit autokatalyyttisesti hajotetaan, Pba1/2-kaperonit irrotetaan rakenteesta ja Ump1 hajotetaan muodostuneen 20S-proteasomin toimesta. PAC1/-kaperonit hajotetaan myös 20S-proteasomin toimesta.

4 Yhteenveto

Tässä tutkielmassa tarkasteltiin eukaryoottien, erityisesti nisäkkäiden, 20S-proteasomin rakenteellista analyysia sekä katalyyttisten keskusten β -propeptidien autokatalyyttistä hajotusta ja substraattien proteolyysia. Lisäksi esiteltiin nykytiedon perusteella 20S-proteasomin kokoonpanomekanismi ja kokoamista ohjaavien säätelytekijöiden rooli mekanismeissa. Pba1-Pba2 (PAC1-PAC2)-, Pba3-Pba4 (PAC3-PAC4)- ja Ump1 (hUmp1)-kaperonien (Budenholzer ja muut 2017; Kim ja muut 2023; Murata ja muut 2009) sekä β -alaysiköiden C- ja N-terminaalisten päiden on todettu ohjaavan koordinoitusti 20S-proteasomin kokoonpanoa (Hirano ja muut 2008; Matias ja muut 2010). 20S-proteasomin kokoonpanossa saattaa olla myös muita, vielä tuntemattomia säätelytekijöitä. Esimerkiksi hiljattain lituruohosta (*Arabidopsis thaliana*) löydetyn PBAC5-kaperonin on havaittu muodostavan heterotrimeerin PAC1-PAC2-kompleksin kanssa, mutta tämän toimintaa ei ole vielä määritetty (Marshall ja muut 2020).

Kokoonpanomekanismi sisältää yhä monia epäselviä kohtia, ja erityisesti puoliproteasomien dimerisaation jälkeiset tapahtumat vaativat lisätutkimusta. Vaikka β 1-, β 2- ja β 5-propeptidien autokatalyyttinen prosessointireaktio on selvitetty, on β 6- ja β 7-propeptidien hajotusmekanismi yhä tuntematon. Ump1-kaperoni on mielenkiintoisessa asemassa, sillä sen tiedetään olevan vuorovaikutuksessa useamman β -alaysikön propeptidin (β 2, β 5, β 7) kanssa. On epäselvää, miten propeptidien autokatalyyttinen prosessointi etenee dimerisaation jälkeen ja miten propeptidit irrottautuvat Ump1-kaperonista. Jos propeptidit eivät irrottaudu Ump1-kaperonista, on mahdollista, että ne hajotetaan yhdessä Ump1-kaperonin kanssa. On myös ehdotettu, että muutokset konformaatiossa saattavat vaikuttaa 20S-proteasomin aktivointiin puoliproteasomien dimerisaation jälkeen.

Korkean resoluution kiderakenteet 20S-proteasomista ja sitä avustavista säätelytekijöistä ovat antaneet arvokasta tietoa kokoonpanovälituotteista ja -mekanismista. Tämän lisäksi kiderakenteita voidaan käyttää yhdessä muiden molekyylibiologisten tutkimusmenetelmien kanssa 20S-proteasomin rakenteellisten ominaisuuksien ja proteasomin aktivoivien tai inhiboivien vuorovaikutusten ymmärtämiseen. Erityisesti proteasomia inhiboivia lääkemolekyylejä on suunniteltu viime vuosikymmeninä terapeuttiseen käyttöön, kuten multippelia myeloomaa ja muita syöpiä varten. Proteasomin hajotustoiminnan tehostamiseen tähtäviä menetelmiä puolestaan tutkitaan ratkaisuna proteiinien väärinlaskostumiseen liittyviin häiriötiloihin, kuten erilaisiin neurodegeneratiivisiin sairauksiin.

20S-proteasomin alaysiköiden geeneihin kohdistuvien mutaatioiden on myös havaittu aiheuttavan erinäisiä sairauksia, kuten autoinflammatoriset oireyhtymät (PRAAS 1-5), Nakajo-Nishimura-oireyhtymä (NNS) ja krooninen autoinflammatorinen ihosairaus (*Chronic Atypical Neutrophilic Dermatitis with Lipodystrophy and Elevated temperature*, CANDLE). Nämä mutaatiot ovat kohdistuneet α 1-, α 7-, β 7-, β 5-, β 5i-, β 2i-, β 1- ja β 1i-alaysiköihin. Lisäksi on havaittu hUmp1- ja PAC2-kaperoneissa tapahtuvia mutaatioita, jotka estävät 20S-proteasomin

kokoonpanoa ja edistäen näin haitallisten proteiinien kertymistä soluun. (Schnell ja muut 2022b; Watanabe ja muut 2022.) On mahdollista, että monet muutkin sairaudet liittyvät 20S-proteasomin kokoonpanomekanismin mutaatioihin tai virheisiin. 20S-proteasomin rooli monissa sairauksissa korostaa 20S-proteasomin tutkimuksen merkitystä sairauksien kartoittamisessa ja uusien hoitokeinojen kehittämisessä. Tästä syystä 20S-proteasomin rakenteen ja sen kokoonpanoon vaikuttavien säätelytekijöiden tutkiminen on tärkeää myös tulevaisuudessa.

Lähteet

Abi Habib, J., De Plaen, E., Stroobant, V., Zivkovic, D., Bousquet, M. P., Guillaume, B., Wahni, K., Messens, J., Busse, A., Vigneron, N., Van den Eynde, B. J. (2020) Efficiency of the four proteasome subtypes to degrade ubiquitinated or oxidized proteins. *Sci. Rep.*, **10(1)**:15765–15765.

Abi Habib, J., Lesenfants, J., Vigneron, N., Van den Eynde, B. J. (2022) Functional differences between proteasome subtypes. *Cells*, **11(3)**:421.

Bai, M., Zhao, X., Sahara, K., Ohte, Y., Hirano, Y., Kaneko, T., Yashiroda, H., Murata, S. (2014) Assembly mechanisms of specialized core particles of the proteasome. *Biomolecules*, **4(3)**:662–677.

Bajorek, M. & Glickman M.H. (2004) Keepers at the final gates: regulatory complexes and gating of the proteasome channel. *CMLS*, **61(13)**:1579–1588.

Ben-Nissan, G., & Sharon, M. (2014) Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules*, **4(3)**:862–884.

Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y., Hochstrasser, M. (2017) Proteasome structure and assembly. *J. Mol. Biol.*, **429(22)**:3500–3524.

Davies, K. J. A. (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, **83(3)**:301–310.

Fabre, B., Lambour, T., Garrigues, L., Ducoux-Petit, M., Amalric, F., Monsarrat, B., Burlet-Schiltz, O., Bousquet-Dubouch, M.-P. (2014a) Label-Free quantitative proteomics reveals the dynamics of proteasome complexes composition and stoichiometry in a wide range of human cell lines. *J. Proteome Res.*, **13(6)**:3027–3037.

Fabre, B., Lambour, T., Garrigues, L., Ducoux-Petit, M., Amalric, F., Monsarrat, B., Burlet-Schiltz, O., Bousquet-Dubouch, M.-P. (2014b) Label-Free quantitative proteomics reveals the dynamics of proteasome complexes composition and stoichiometry in a wide range of human cell lines. *J. Proteome Res.*, **13(12)**:3027–3037.

Hirano, Y., Hendil, K. B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., Murata, S. (2005) A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature*, **437**:1381–1385.

Hirano, Y., Kaneko, T., Okamoto, K., Bai, M., Yashiroda, H., Furuyama, K., Kato, K., Tanaka, K., Murata, S. (2008) Dissecting beta-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *EMBO J*, **27(16)**:2204–2213.

- Huber, E. M., Heinemeyer, W., Li, X., Arendt, C. S., Hochstrasser, M., Groll, M. (2016) A unified mechanism for proteolysis and autocatalytic activation in the 20S proteasome. *Nat. Commun.*, **7(1)**:10900–10910.
- Jung, T., & Grune, T. (2008) The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life*, **60(11)**:743–752.
- Jung, T., Höhn, A., Tilman G. (2014) The Proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II - Protein oxidation and proteasomal degradation. *Redox Biol.*, **2**:99–104.
- Kim, Y., Kim, E.-K., Chey, Y., Song, M.-J., Jang, H. H. (2023) Targeted protein degradation: principles and applications of the proteasome. *Cells*, **12(14)**:1846.
- Kisselev, A., Songyang, Z., Goldberg, A. (2000) Why does threonine, and not serine, function as the active site nucleophile in proteasomes? *JBC*, **275**:14831–14837.
- Kragness, K. A. & Trader, D. J. (2023) The role of the proteasome in limiting cellular stress associated with protein accumulation. *Isr. J. Chem.*, e202300120.
- Kusmierczyk, A. R., Kunjappu, M. J., Funakoshi, M., Hochstrasser, M. (2008) A multimeric assembly factor controls the formation of alternative 20S proteasomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**:237–244.
- Kusmierczyk, A. R. & Hochstrasser, M. (2008) Some assembly required: dedicated chaperones in eukaryotic proteasome biogenesis. *Biol. Chem.*, **389(9)**:1143–1151.
- Li, X., Kusmierczyk, A. R., Wong, P., Emili, A., Hochstrasser, M. (2007) Beta-subunit appendages promote 20S proteasome assembly by overcoming an Ump1-dependent checkpoint. *EMBO J*, **26**:2339–2349.
- Li, Y., Li, S., Wu, H. (2022) Ubiquitination-proteasome system (UPS) and autophagy two main protein degradation machineries in response to cell stress. *Cells*, **11**:851.
- Liu, C.-W., Corboy, M. J., DeMartino, G. N., Thomas, P. J. (2003) Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science*, **299(5605)**: 408–411.
- Marques, A. J., Palanimurugan, R., Matias, A. C., Ramos, P. C., Dohmen, R. J. (2009) Catalytic mechanism and assembly of the proteasome. *Chem. Rev.*, **109(4)**:1509–1536.
- Marshall, R. S., Gemperline, D. C., McLoughlin, F., Book, A. J., Hofmann, K., Vierstra, R. D. (2020) An evolutionarily distinct chaperone promotes 20S proteasome α -ring assembly in plants. *J. Cell Sci.*, **133(21)**.
- Matias, A. C., Ramos, P. C., Dohmen, R. J. (2010) Chaperone-assisted assembly of the proteasome core particle. *Biochem. Soc. Trans.*, **38(1)**:29–33.

- Murata, S., Takahama, Y., Kasahara, M., Tanaka, K. (2018) The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease. *Nat. Immunol.*, **19**(9):923–931.
- Murata, S., Yashiroda, H., Tanaka, K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**:104–115.
- Myers, N., Olender, T., Savidor, A., Levin, Y., Reuven, N., Shaul, Y. (2018) The disordered landscape of the 20S proteasome substrates reveals tight association with phase separated granules. *Proteomics*, **18**(21–22):e1800076.
- Nitta, T., Murata, S., Sasaki, K., Fujii, H., Ripen, A. M., Ishimaru, N., Koyasu, S., Tanaka, K., Takahama, Y. (2010) Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8 + T cells. *Immunity*, **32**(1):29–40.
- Ráčková, L. & Csekés, E. (2020) Proteasome biology: chemistry and bioengineering insights. *Polymers*, **12**(12):1–58.
- Ramos, P. C., Marques, A. J., London, M. K., Dohmen, R. J. (2004) Role of C-terminal extensions of subunits beta2 and beta7 in assembly and activity of eukaryotic proteasomes. *J. Biol. Chem.*, **279**(14):14323–14330.
- Raynes, R., Pomatto, L. C. D., Davies, K. J. A. (2016) Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Mol. Asp. Med.*, **50**:41–55.
- Sahu, I. & Glickman, M. H. (2021) Structural insights into substrate recognition and processing by the 20S proteasome. *Biomolecules*, **11**:148.
- Sahu, I., Mali, S. M., Sulkshane, P., Xu, C., Rozenberg, A., Morag, R., Sahoo, M. P., Singh, S. K., Ding, Z., Wang, Y., Day, S., Cong, Y., Kleifeld, O., Brik, A., Glickman, M. H. (2021) The 20S as a stand-alone proteasome in cells can degrade the ubiquitin tag. *Nat. Commun.*, **12**(1): 6173–6173.
- Sasaki, K., Takada, K., Ohte, Y., Kondo, H., Sorimachi, H., Tanaka, K., Takahama, Y., Murata, S. (2015) Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8 T cells. *Nat. Commun.*, **6**(1):7484–7484.
- Schnell, H. M., Ang, J., Rawson, S., Walsh, R.M. Jr, Micoogullari, Y., Hanna, J. (2022a) Mechanism of proteasome gate modulation by assembly chaperones Pba1 and Pba2. *J. Biol. Chem.*, **298**(5):101906.
- Schnell, H. M., Walsh, R. M. Jr, Rawson, S., Kaur, M., Bhanu, M. K., Tian, G., Prado, M. A., Guerra-Moreno, A., Paulo, J. A., Gygi, S. P., Roelofs, J., Finley, D., Hanna, J. (2021) Structures of chaperone-associated assembly intermediates reveal coordinated mechanisms of proteasome biogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **28**(5):418–425.

- Schnell, H. M., Walsh, R. M., Rawson, S., Hanna, J. (2022b) Chaperone-mediated assembly of the proteasome core particle - recent developments and structural insights. *J. Cell Sci.*, **135(8)**: jcs259622.
- Schrader, J., Henneberg, F., Mata, R. A., Tittmann, K., Schneider, T. R., Stark, H., Bourenkov, G., Chari, A. (2016) The inhibition mechanism of human 20S proteasomes enables next-generation inhibitor design. *Science*, **353(6299)**:594–598.
- Serrano-Aparicio, N., Ferrer, S., Świderek, K. (2022) Covalent inhibition of the human 20S proteasome with homobelactosin C inquired by QM/MM studies. *Pharmaceuticals*, **15(5)**:531.
- Shringarpure, R., Grune, T., Davies, K. (2001) Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *CMLS*, **58(10)**:1442–1450.
- Stadtmueller, B. M. & Hill, C. P. (2011) Proteasome Activators. *Mol. Cell*, **41(1)**:8–19.
- Takada, K., Van Laethem, F., Xing, Y., Akane, K., Suzuki, H., Murata, S., Tanaka, K., Jameson, S. C., Singer, A., Takaham, Y. (2015) TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.*, **16**:1069–1076.
- Takagi, K., Saeki, Y., Yashiroda, H., Yagi, H., Kaiho, A., Murata, S., Yamane, T., Tanaka, K., Mizushima, T., Kato, K. (2014) Pba3–Pba4 heterodimer acts as a molecular matchmaker in proteasome α -ring formation. *BBRC*, **450(2)**:1110–1114.
- Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K. B., Tanaka, K. (2000) Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.*, **275(19)**:14336–45.
- Tanaka K. (2009) The proteasome: overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. B: Phys. Biol.*, **85(1)**:12–36.
- Wu, W., Sahara, K., Hirayama, S., Zhao, X., Watanabe, A., Hamazaki, J., Yashiroda, H., Murata, S. (2018) PAC1-PAC2 proteasome assembly chaperone retains the core α 4– α 7 assembly intermediates in the cytoplasm. *Genes Cells*, **23(10)**:839–848.
- Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyam, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Niwa, S., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Takagi, K., Suzuki, A., Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., Tanaka, K. (2008) Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**:228–236.
- Zhou, J., Sang, X., Wang, J., Xu, Y., An, J., Chu, Z. T., Saha, A., Warshel, A., Huang, Z. (2023) Elucidation of the α -ketoamide inhibition mechanism: revealing the critical role of the electrostatic reorganization effect of Asp17 in the active site of the 20S Proteasome. *ACS Catal.*, **13(21)**:14368–14376.

Zimmermann, J., Ramos, P. C., Dohmen, R. J. (2022) Interaction with the assembly chaperone Ump1 promotes incorporation of the $\beta 7$ subunit into half-proteasome precursor complexes driving their dimerization. *Biomolecules*, **12**(2):253.