



PEROXIREDOXIN

förlänger livet genom att guida chaperoner till skadade proteiner

Ny forskning från Göteborgs universitet har ökat kunskapen om hur celler åldras. Studierna kan få betydelse för förståelsen för uppkomsten av sjukdomar som Alzheimers och Parkinsons sjukdom. Denna spännande cellforskning beskrivs här av **Sarah Hanzén**, doktorand, Institutionen för kemi och molekylärbiologi och **Katarina Vielfort**, PhD och forskare, Institutionen för biomedicin, båda vid Göteborgs universitet.



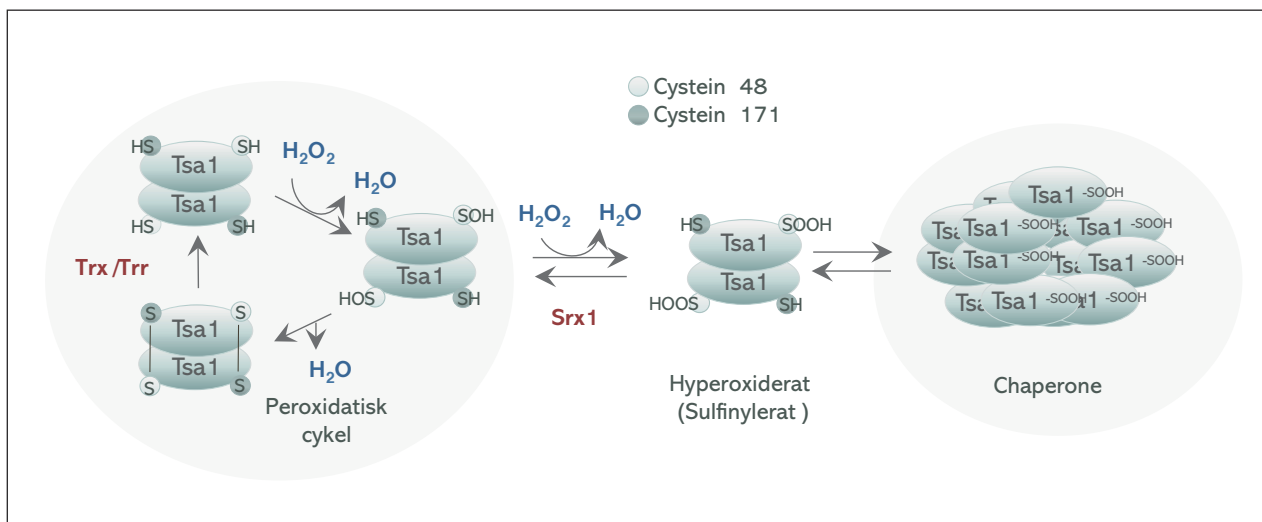
”Att kroppen åldras hänger bland annat samman med att effektiviteten hos cellens reparationssystem minskar med tiden, vilket leder till en ansamling av skador som slutligen gör att cellen förlorar sin funktion och dör.”

Åldrande karaktäriseras av en gradvis försämring av kroppens funktioner som yttrar sig i allt ifrån rynkor och grått hår till nedsatt effektivitet hos olika organsystem och minskad förmåga att motstå sjukdomar. I kroppens celler uppstår det konstant skador av olika slag, vilka kontinuerligt måste repareras. Att kroppen åldras hänger bland annat samman med att effektiviteten hos cellens reparationssystem minskar med tiden, vilket leder till en ansamling av skador som slutligen gör att cellen förlorar sin funktion och dör. Studier på senare år framhåller ett antal faktorer som parallellt påverkar cellulärt åldrande; detta inkluderar nedsatt funktion hos organeller såsom mitokondrier och vakuoler/lysosomer, toxiska DNA-strukturer och skadade/aggregerade proteiner.¹

ICKE-FUNKTIONELLA PROTEINER KAN AGGREGERA

Ett protein består av en kedja med aminosyror som har veckats ihop i en tredimensionell struktur. Denna struktur, det vill säga proteinets nativa form, är helt avgörande för proteinets funktion. Proteiner som förlorat sin nativa form är ofunktionella och tenderar att klumpa ihop sig och bilda så kallade proteinaggregat. Proteinaggregat kan interagera med olika komponenter i cellen och på så sätt störa olika cellulära processer, vilket kan vara fördödande för cellen. Proteinaggregat ackumuleras med ålder i flertalet modellorganismer och har kopplats till flera sjukdomar som påverkar nervsystemet, till exempel Alzheimers, Parkinsons sjukdom och Huntingtons sjukdom.²

Det finns olika typer av faktorer som kan ge upphov till proteinskador, exempelvis värme, pH-ändringar och reaktiva oxidanter. Väteperoxid (H_2O_2), som är en biprodukt från cellens syreomsättningsprocesser, är en instabil molekyl som oxiderar olika makromolekyler i cellen såsom DNA och proteiner.³ I vissa fall är proteinoxidering nödvändigt för proteinets struktur och funktion, men oftast förstör oxideringen proteinets struktur och bidrar till dess aggregering. Både väteperoxid och oxidativt modifierade proteiner har setts öka med ålder.^{3,4}



Figur 1. Katalytisk cykel för peroxiredoxin Tsa1. Till vänster: Tsa1 reducerar H_2O_2 till H_2O och katalytiska cysteinet 48 oxideras till en sulfensyra (-SOH). Cystein 171 reducerar cystein 48 genom att bilda en disulfidbrygga som sedan kan reduceras av Thioredoxin/Threonin (Trx/Trr) -systemet. Till höger: En liten del Tsa1-molekyler oxideras ytterligare på cystein 48 som bildar en sulfinsyra (-SOOH), i detta hyperoxiderade tillstånd sker strukturella förändringar hos Tsa1 som då bildar högmolekylära komplex som har chaperonaktivitet. Sulfinsyran reduceras specifikt av sulfiredoxin 1 (Srx1). Vid ökade nivåer av H_2O_2 skiftar balansen åt höger och mer Tsa1 återfinns i den högmolekylära chaperonformen.

Ett avancerat nätverk av försvarsmekanismer har utvecklats för att skydda cellens proteiner och begränsa toxiciteten av skadade proteiner. Detta kallas för proteinkvalitetskontroll och inkluderar bland annat protein som förebygger uppkomsten av skador, men också proteiner som tar hand om skadade proteiner i cellen.² En stor del av detta system utgörs av så kallade chaperoner, som är proteiner med en mängd olika funktioner. Många chaperoner ökar i produktion vid värme-stress och kallas därför "heat shock proteins" (Hsps) och familjer har namngetts efter storlek. Hsp70 kan till exempel vecka proteiner till nativa former och Hsp104, från Hsp100-familjen, kan lösa upp proteinaggregat (disaggregera). Ibland kan ett skadat protein inte återgå till sin nativa form och då kan det i stället behöva brytas ner. Cellen har flera sätt att bryta ner proteiner på och ett av dessa sker med hjälp av proteasomen – ett stort proteinkomplex som bryter bindningar mellan aminosyror.

PEROXIREDOXINER SKYDDAR CELLEN

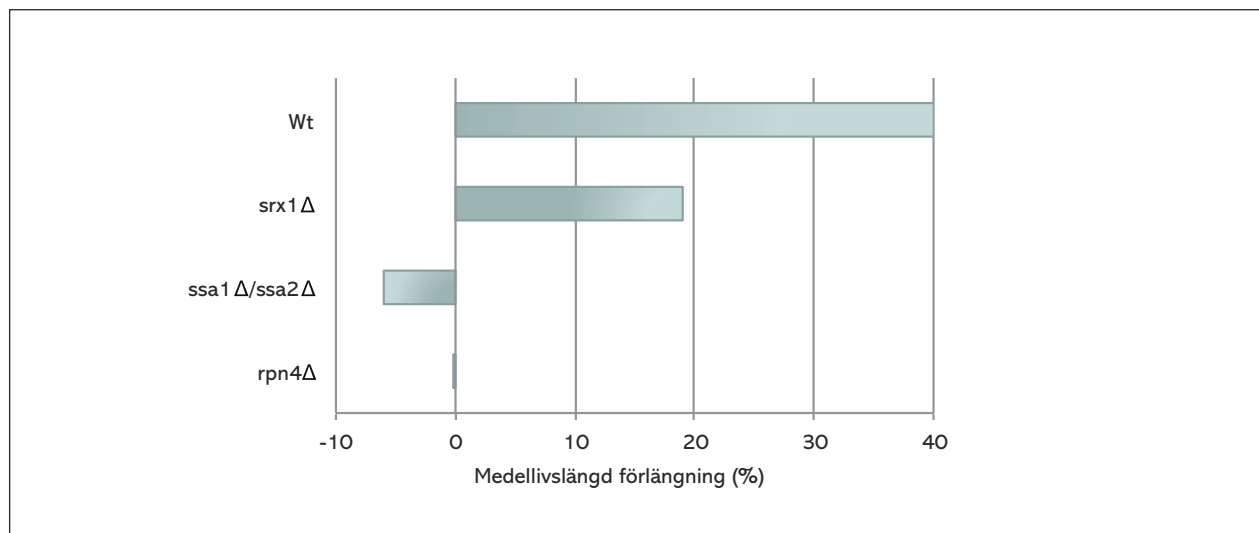
Peroxiredoxiner är enzymer som medverkar i cellens försvar mot skador, exempelvis fungerar de som antioxidanter som bryter ner skadliga peroxider. De är dessutom viktiga för att motverka DNA-skador.⁵ På senare år har de även visats skydda proteiner mot aggregering.⁶ Jäst har fem peroxiredoxiner och människor sex. Det primära peroxiredoxinet Tsa1 i jästceller är en ortholog till cytosoliska Peroxiredoxin 1 i människor.⁵ Tsa1 är ett peroxiredoxin som specifikt reducerar väteperoxid, och precis som andra eukaryota peroxiredoxiner har Tsa1 förmågan att växla mellan antioxidant och chaperon beroende på cellulära nivåer av väteperoxid (figur 1).^{6,7} Vid låga nivåer fungerar enzymet främst som ett peroxid (antioxidant), som reducerar väteperoxid till vatten i en process som innebär att ett av enzymets katalytiska aktiva cystein

"Nu har vi ytterligare påvisat vikten av peroxiredoxiner i åldrandeprocessen, då vi har sett att det går att förlänga medellivslängden hos jäst genom att endast öka mängden av Tsa1."

(cystein 48) oxideras till sulfensyra (-SOH) (figur 1). Små strukturella förändringar i peroxiredoxinet gör att cystein 48 kan bilda en sulfidbindning med ett annat cystein (cystein 171). Ett reducerande system bryter sedan denna bindning, ser till att peroxiredoxinet återfår sin ursprungliga form och därmed slutförs enzymets peroxidiska cykel. Vid högre nivåer av väteperoxid blir cystein 48 ytterligare oxiderat (sulfenylrat) till en sulfinsyra (-SOOH), detta medför strukturella förändringar och bildandet av ett högmolekylärt komplex, vilket kan fungera som ett chaperon (figur 1). Denna hyperoxidering, eller sulfenylering, är en reversibel process där peroxiredoxinets katalytiska aktivitet kan återställas genom reduktion via Sulfiredoxin 1 (Srx1). På så sätt växlar peroxiredoxinet mellan de olika funktionella formerna.

ÖKAD LIVSLÄNGD HOS JÄSTCELLER

Vi har tidigare studerat Tsa1 och visat betydelsen av detta enzym för att förlänga livet med kalori-restriktion. Kalori-restriktion är ett fenomen där man minskar intaget av sock-



Figur 2. Medellivslängdspåverkan i stammar med en extra kopia av *Tsa1*. Grafen visar förändringen av medellivslängden (uttryckt i procent) i en jäststam med en extra kopia av *Tsa1*, jämfört med samma stam utan en extra kopia. En extra kopia *Tsa1* ökar medellivslängden i vildtyp-celler (Wt) med 40%. Denna livsförlängande funktion är kopplad till att sulfhydrylerad *Tsa1* effektivt kan reduceras, vilket kan ses då medellivslängden inte kan förlängas till samma grad i en stam som saknar Sulfiredoxin 1 (*srx1Δ*). *Tsa1*:s förmåga att öka medellivslängden är helt beroende på proteinkvalitetskontroll, då en extra kopia av *Tsa1* inte ökar medellivslängden i en stam som saknar två Hsp70-proteiner (*ssa1Δ/ssa2Δ*) eller i en stam som har nedsatt nedbrytningsfunktion (*rpn4Δ*) då den saknar transkriptionsfaktorn Rpn4, vilken stimulerar proteasomgener.

er och proteiner och på så sätt kan få medellivslängden att öka i allt från jäst och flugor till råttor och apor.⁸ Vår tidigare studie visade att både *Tsa1* och det reducerande *Srx1* behövs för att kalori restriktion skall fungera effektivt.⁹

I en ny studie har nya rön framkommit som understryker vikten av peroxiredoxiner i åldrandeprocessen; en extra kopia av *Tsa1* gör att jästcellerna lever 30–40 procent längre (figur 2), vilket tyder på en betydande roll för *Tsa1* i jästens åldrandeprocess.

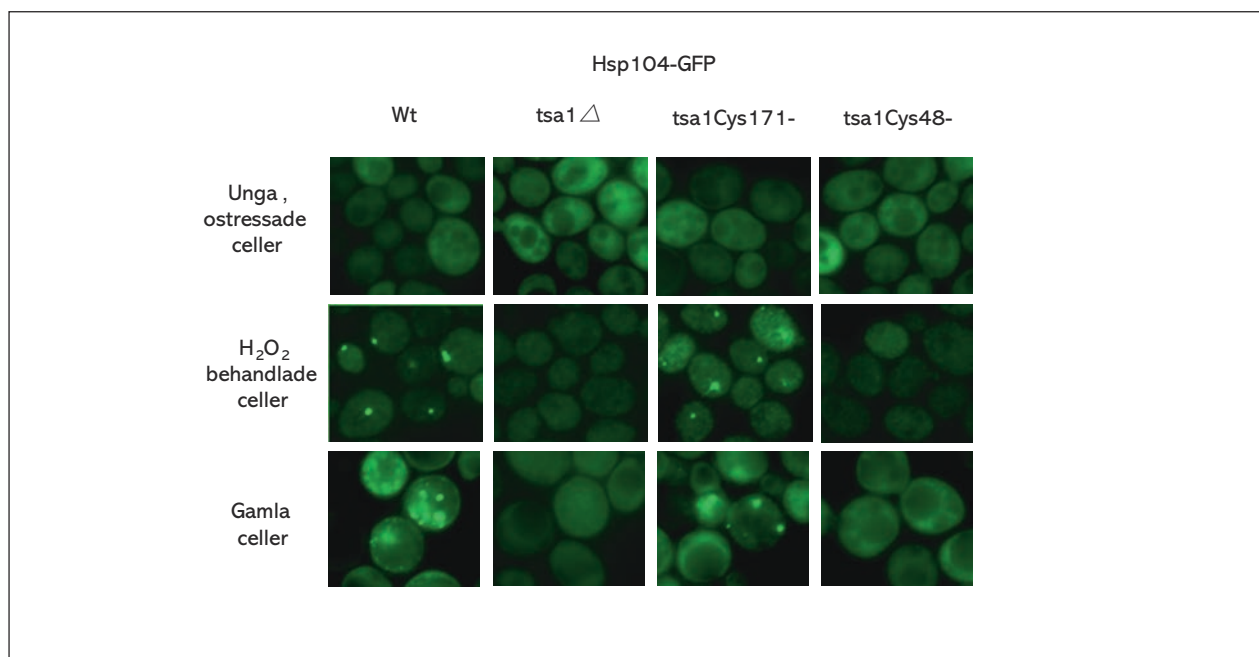
Med tanke på de många olika funktionerna som peroxiredoxiner har, så ville vi identifiera vilken av dem som är avgörande för den livslängdsreglerande förmågan hos *Tsa1*. Vi fann att en extra kopia av *Tsa1* varken sänker mutationshastigheten eller mängden DNA-skador i gamla celler. Inte heller resulterar det i effektivare nedbrytning av väteperoxid. I stället för dessa mer etablerade funktioner hos *Tsa1*, visade det sig att den essentiella uppgiften, med avseende på åldrande, snarare ligger i proteinkvalitetskontroll.

Tidigare studier har definierat faktorer som behövs för att lösa upp aggregat orsakade av värme, och man har sett att Hsp40, Hsp70 och Hsp104 samarbetar för att dessa aggregat skall lösas upp på ett effektivt sätt.¹⁰ Hsp40 binder till skadade proteiner och assisterar Hsp70 och Hsp104 som då kan lösa upp aggregatet och antingen återge proteinet sin nativa form eller skicka dem till nedbrytning. Vår studie visade att *Tsa1* medverkar i en liknande process för att lösa upp aggregat som orsakats av oxidativ stress. Vi fann att även proteinaggregat som orsakats av väteperoxid behöver Hsp70 och Hsp104 för att lösas upp, men i motsats till värmeinducerade aggregat krävs *Tsa1* för att Hsp70 och Hsp104 effektivt skall känna igen de väteperoxidinducerade aggregaten (figur 3).

”Om peroxiredoxiners funktion i hantering av skadade proteiner är av relevans också hos människor, finns förhoppningar om att med hjälp av stimulering av dessa enzym och därmed cellens försvar mot ansamling av skadade proteiner kunna motverka, eller åtminstone senarelägga, uppkomsten av till exempel Alzheimers och Parkinsons sjukdom.”

REKRYTERING AV CHAPERONER

Genom att sammanlänka Hsp104 till ett grönt fluorescerande protein (GFP) kan vi under ett fluorescensmikroskop följa dess lokalisering i cellen (figur 3). Under normala förhållanden finns Hsp104-GFP utspritt i hela cellen, men under stress koncentreras Hsp104 till proteinaggregat vilket kan ses som starkt gröna punkter under mikroskopet. Under väteperoxidstress bildas oftast en eller två punkter i cellen, vilket



Figur 3. Fluorescensmikroskopi av stammar med Hsp104-GFP. Representativa bilder från fluorescensmikroskopi av jäststammar med Tsa1 (wt), utan Tsa1 (*tsa1Δ*), Tsa1 med ett inaktivt cystein 171 (*tsa1Cys171-*) och Tsa1 med ett inaktivt cystein 48 (*tsa1Cys48-*). Överst: Unga, ostressade celler (kontroller). Alla stammar har Hsp104-GFP jämt fördelat i cellerna. Mitten: H₂O₂-behandlade celler för att inducera proteinaggregering. I wt-celler lokaliserar Hsp104-GFP till proteinaggregat, vilket ses som en eller två väldefinierade punkter. I celler utan Tsa1 hittar Hsp104-GFP inte till aggregat, och därmed saknar dessa celler punkter. Med ett inaktivt cystein 171 kan Tsa1 sulfinyleras och bilda chaperon, vilket då kan rekrytera Hsp104-GFP till aggregat och dessa celler har därför Hsp104-GFP punkter. Ett inaktivt cystein 48 blockerar sulfinylering och chaperonbildning och Tsa1 kan inte längre rekrytera Hsp104-GFP till aggregat, vilket leder till celler utan punkter. Underst: Gamla celler. I wt-celler lokaliserar Hsp104-GFP till proteinaggregat, vilket ses som väldefinierade punkter, vanligen mer än två. Precis som i H₂O₂-behandlade celler lokaliserar Hsp104-GFP till proteinaggregat på ett Tsa1Cys48-beroende sätt.

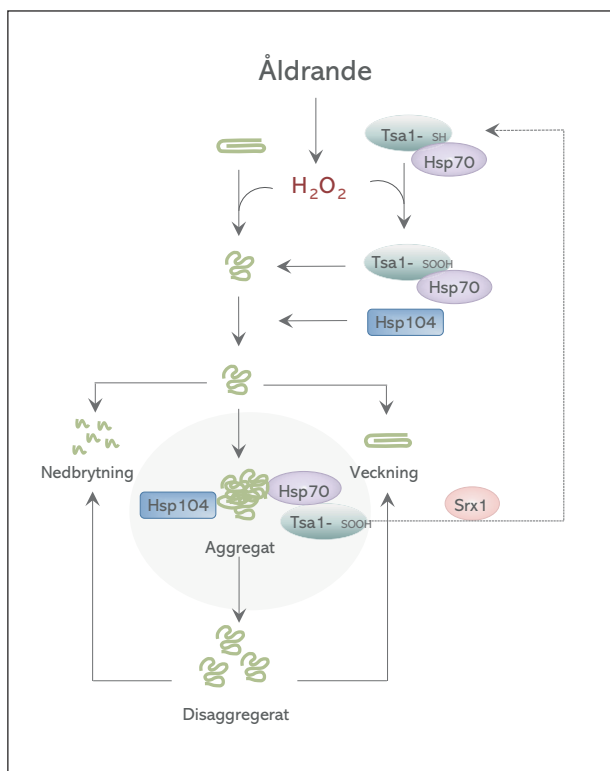
betyder att Hsp104 lokaliserats till platsen. I celler som saknar Tsa1 (*tsa1Δ*), kan Hsp104 och Hsp70 inte hitta till proteinaggregat på ett effektivt sätt och därför saknas Hsp104-GFP-punkter i dessa celler (figur 3). När vi tittar på andra GFP-taggade proteiner som aggregerar av väteperoxid i cellen kan vi se att proteinaggregat finns och dessutom har svårare att lösas upp i celler utan Tsa1. Att Hsp104/Hsp70 saknas vid dessa aggregat tyder på att Tsa1 behövs för att rekrytera dessa chaperoner till aggregat under väteperoxidstress. Resultaten visade även att Tsa1:s förmåga att rekrytera chaperoner är beroende av dess aktiva cystein 48. Vid inaktivering av cystein 48 (*tsa1Cys48-*) och därmed blockering av dess förmåga att sulfinyleras och forma chaperon, förlorar Tsa1 sin förmåga att guida Hsp104 (figur 3) och Hsp70 till aggregat. Med ett inaktiverat cystein 171 (*tsa1Cys171-*) kan Tsa1 däremot fortfarande forma chaperon, då detta cystein endast behövs för den peroxidatiska cykeln, och därmed kan Tsa1 agera guide åt Hsp104 (figur 3). Vidare visade sig Srx1 vara viktig för att aggregaten skall kunna lösas upp på ett effektivt sätt, vilket betyder att båda processerna är kopplat till Tsa1:s sulfinyleringsstatus. Rekrytering av chaperoner är beroende av sulfinylering av cystein 48 och upplösning av aggregat effektiviserar genom desulfinylering via Srx1.

Slutligen såg vi att Tsa1 är viktig för hanteringen av proteinaggregat som bildas under åldrande; precis som under väteperoxid rekryteras Hsp104 av Tsa1 på ett cystein 48-beroende sätt till åldersrelaterade aggregat (figur 3), och avsak-

naden av Tsa1 leder till ackumulering av fler aggregat i gamla celler. Ökad produktion av Tsa1 leder tvärtom till färre proteinaggregat och förlängd livslängd (figur 2). I avsaknad av Srx1, vilken effektiviserar disaggregeringen av väteperoxidinducerade aggregat, förlänger inte en extra kopia av *Tsa1* medellivslängden lika markant (figur 2). Dessutom kunde vi visa att Tsa1:s livsförlängande funktion är helt beroende av att enzymer såsom Hsp70 och transkriptionsfaktorn Rpn4, vilken stimulerar uttrycket av proteasomgener, finns närvarande vilket visar på att Tsa1:s roll i proteinkvalitetskontroll är kopplad till dess förmåga att förlänga livet (figur 2).

SLUTSATS

Vi föreslår att Tsa1 är viktig för hanteringen av proteinaggregat under åldrande på följande sätt (figur 4): 1) Tsa1 rekryterar Hsp70 till proteiner som missveckats av väteperoxid, Hsp70 kan i sin tur vecka proteinet till sin nativa form eller dirigera dem till nedbrytning i proteasomen och på så sätt förhindra aggregatbildning. 2) Rekrytering av Hsp104 gör att proteinaggregat kan lösas upp och därefter återveckas av Hsp70 eller brytas ner i proteasomen. Tsa1-funktion regleras av redoxstatusen hos det aktiva cysteinet 48; sulfinylering och medföljande omvandling till chaperon gör att Tsa1 kan rekrytera Hsp70/Hsp104 till aggregat inducerade av väteperoxid, och desulfinylering (via Srx1) leder till en effektiviserad upplösning av dessa aggregat.



Figur 4. Schematisk representation för hantering av protein-aggregat inducerat av H_2O_2 . Ökade H_2O_2 -nivåer i gamla celler leder dels till ökad mängd missveckade proteiner och dels ökad mängd sulfinylerat Tsa1 med chaperonaktivitet. Tsa1 kan då rekrytera Hsp70/Hsp104 till missveckade proteiner och Hsp70 kan återveckla eller dirigera proteinet till nedbrytning. Om aggregat bildats kan Hsp104 tillsammans med Hsp70 lösa upp aggregatet, en process som underlättas av att Tsa1-SOOH desulfinyleras av Srx1, därefter kan Hsp70 återigen vecka proteinet till dess nativa form eller assistera i nedbrytning.

Om peroxiredoxinens funktion i hantering av skadade proteiner är av relevans också hos människor, finns förhoppningar om att med hjälp av stimulering av dessa enzym och därmed cellens försvar mot ansamling av skadade proteiner kunna motverka, eller åtminstone senarelägga, uppkomsten av till exempel Alzheimers och Parkinsons sjukdom. Nedsatt funktion av peroxiredoxiner är dessutom associerat till flertalet genetiska defekter och cancer, vilket innebär att denna nya kunskap kring peroxiredoxinens funktion kan komma att bli betydelsefull även för att motverka uppkomsten av cancer.

Länk till originalartikel:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27264606>

REFERENSER

1. Dillin A, Gottschling DE, Nyström T. The good and the bad of being connected: the integrons of aging. *Curr Opin Cell Biol* 2014 Feb; 26:107–12.
2. Hipp MS, Park S-H, Hartl FU. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol* 2014 Sep; 24(9):506–14.
3. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* 2006 Dec; 40(12):1250–8.
4. Sohal RS, Orr WC. Relationship between antioxidants, prooxidants, and the aging process. *Ann N Y Acad Sci* 1992 Nov 21; 663:74–84.
5. Iraqui I, Faye G, Ragu S, Masurel-Heneman A, Kolodner RD, Huang M-E. Human peroxiredoxin Prxl is an orthologue of yeast Tsa1, capable of suppressing genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res* 2008 Feb 15; 68(4):1055–63.
6. Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 2004 May 28; 117(5):625–35.
7. Rhee SG, Woo HA. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H_2O_2 , and protein chaperones. *Antioxid Redox Signal* 2011 Aug 1; 15(3):781–94.
8. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature* 2010 Mar 25; 464(7288):504–12.
9. Molin M, Yang J, Hanzén S, Toledano MB, Labarre J, Nyström T. Life span extension and H_2O_2 resistance elicited by caloric restriction require the peroxiredoxin Tsa1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* 2011 Sep 2; 43(5):823–33.
10. Mogk A, Kummer E, Bukau B. Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation. *Front Mol Biosci* 2015; 2:22.



SARAH HANZÉN

Doktorand, Institutionen för kemi och molekylärbiologi, Göteborgs universitet
sarah.hanzen@gu.se



KATARINA VIELFORT

PhD, Forskare, Avd för mikrobiologi och immunologi vid Institutionen för biomedicin, Göteborgs Universitet.
katarina.viefort@gu.se