

KONSPEKT LEKCJI Z WYKORZYSTANIEM GRY DEGRADATOR

– szkoły ponadpodstawowe (wiek 15+)

Autorzy: Jakub Tomaszewski, Mikołaj Cup

BioCentrum Edukacji Naukowej BioCEN

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

Celem gry DEGRADATOR jest uświadomienie uczniom roli degradacji białek w utrzymaniu homeostazy środowiska wewnątrzkomórkowego. Podczas gry, uczniowie wcielają się w rolę ligazy ubikwityny - białka odpowiedzialnego za przyłączanie ubikwityny do białek przeznaczonych do zniszczenia w proteasomie. Oznaczone ubikwityną białka uzyskują powinowactwo do proteasomu, który rozrywa wiązania peptydowe między aminokwasami. Zniszczeniu ulega w ten sposób struktura pierwszorzędowa ubikwitynowanego białka. Produktem tej reakcji są pojedyncze aminokwasy lub krótkie łańcuchy aminokwasowe, które mogą być wykorzystane ponownie podczas translacji, odtwarzając cząsteczkę zdegradowanego białka, lub tworząc cząsteczkę białka zupełnie innego. Dodatkowym atutem gry jest uzmysłwienie uczniom probabilistycznej natury reakcji enzymatycznych oraz zaobserwowania roli kompleksów kilku enzymów w kierowaniu specyficznością enzym-substrat.

Przygotowanie sali

Sala lekcyjna powinna być wyposażona w projektor multimedialny oraz komputer, na którym będzie wyświetlana prezentacja oraz gra. Uczniowie powinni mieć do swojej dyspozycji komputer, laptop, telefon komórkowy lub inne urządzenie mobilne z dostępem do Internetu. Konspekt przewidywany jest na 90 minut zajęć, ale z uwagi na różnice w programach nauczania w różnych placówkach oświatowych możliwe jest przeprowadzenie lekcji w czasie 45 minut. Lekcja jest dostosowana również dla uczniów o specjalnych potrzebach, którzy nie mogą wziąć udziału w rozgrywce. Każdy etap gry został opisany, a materiały znajdują się w plikach do pobrania w zakładce „Dla edukatorów” na stronie internetowej gry (link na str. 2).

Przykładowy scenariusz lekcji

1. Wstęp merytoryczny (prezentacja PowerPoint dostępna do pobrania w zakładce „Dla edukatorów” na stronie internetowej gry)
2. Rozwiązanie poziomów 1 i 2
3. Omówienie zagadnień przedstawionych poziomów (co uczniowie zaobserwowali podczas rozgrywki)
4. Rozwiązanie quizu na poziomie 3
5. Omówienie quizu
6. Rozwiązywanie poziomów 4 i 5
7. Omówienie zagadnień przedstawionych poziomów (co uczniowie zaobserwowali podczas rozgrywki)
8. Rozwiązanie quizu na poziomie 6
9. Omówienie quizu
10. Wstęp merytoryczny do poziomów 7 i 9
11. Omówienie zagadnień przedstawionych poziomów (co uczniowie zaobserwowali podczas rozgrywki)
12. Rozwiązanie quizu na poziomie 10
13. Omówienie quizu

Gra DEGRADATOR składa się z 10 poziomów, w każdym uczestnik mierzy się z innym zadaniem, które pogłębia jego zrozumienie działania systemu ubikwityna-proteasom (UPS). Proponujemy scenariusz, w którym uczniowie najpierw samodzielnie przechodzą jeden poziom gry, a następnie jest on omawiany wspólnie. Bardzo istotnym elementem kształcenia jest samodzielna praca uczniów polegająca na słownym opisie tego co zostało przedstawione na poszczególnych etapach. Przechodzenie kolejnych poziomów przed ich omówieniem symuluje przeprowadzanie doświadczeń przez naukowców, którzy najpierw obserwują dane zjawisko, a następnie dopiero opisują je w logiczny sposób.

Przed przystąpieniem do zajęć nauczyciel powinien zapoznać się z materiałami edukacyjnymi do gry DEGRADATOR dostępnymi w zakładce “Dla edukatorów” pod linkiem: <https://degradator-gra.pl/>, w szczególności zaś z „Wielką Encyklopedią

Degradacji Białek”. Materiały zawarte w „Wielkiej Encyklopedii Degradacji Białek” są polecane także uczniom, jednak zapoznanie się z nimi nie jest konieczne przed rozpoczęciem zajęć.



❖ **POZIOM PIERWSZY** - zapoznanie z zasadami gry DEGRADATOR

Gracz porusza za pomocą kursora/dotyku (w zależności czy gra na komputerze czy na urządzeniu mobilnym) enzymem - ligazą ubikwityny E3. Celem jest stworzenie czteroskładnikowego kompleksu ubikwityna – enzym E2 – enzym E3 - substrat. Cztery reszty ubikwityny dołączone do cząsteczki białka są wystarczającym sygnałem do jego degradacji przez proteasom. Gracz w trakcie pierwszego poziomu musi poprawnie zdegradować cztery białka w czasie 3 minut.

Po przejściu przez uczniów pierwszego poziomu gry, należy poruszyć następujące zagadnienia:

Środowisko wewnętrzne komórki

Bardzo krótko przypomnieć uczniom budowę komórki i skład cytoplazmy. Szczególnie ważną informacją jest to, że cytozol jest gęstym wodnym roztworem zawierającym wiele różnych białek. W środowisku tym, jednym z najważniejszych mechanizmów umożliwiających zachodzenie reakcji enzymatycznych jest dyfuzja białek i ich substratów. Należy podkreślić, że natrafienie enzymu na substrat jest wydarzeniem całkowicie losowym i naprostować częste, niepoprawne wrażenie uczniów, że substraty w sposób celowy i kierowany zmiernają w stronę enzymów - jak żelazne przedmioty przyciągane przez magnes. Zwiększenie szansy na zajście danej reakcji może odbywać się wyłącznie poprzez zwiększenie stężenia substratu, enzymu lub podniesienie temperatury (czyli przyspieszenia dyfuzji).

Następnie należy upewnić się, że uczniowie pamiętają mechanizm powstawania białek na drodze translacji. Gdy w środowisku wewnątrzkomórkowym zachodzi potrzeba wyprodukowania większej ilości danej substancji, uruchamiają się mechanizmy prowadzące do wyrażenia genów kodujących enzymy produkujące ten związek. Prowadzi to do zwiększenia ilości cząsteczek tego enzymu w cytozolu, co przekłada się bezpośrednio na powstawanie większej ilości pożądanego produktu.

Potrzeby życiowe komórki i budowanego przez nią organizmu zmieniają się bezustannie, wobec czego po jakimś czasie wytworzone wcześniej białka mogą przestać być potrzebne. Jest to jedna z sytuacji, kiedy białka takie mogą być ubikwitynowane i przeznaczone do degradacji w proteasomach. Odzyskane w ten sposób aminokwasy zostaną ponownie wykorzystane podczas innej reakcji translacji do budowy nowej cząsteczki białka.

Natura enzymów i kompleksów enzymatycznych

Enzymy katalizują reakcje chemiczne dzięki swojej charakterystycznej budowie. Należy w tym miejscu uwrażliwić uczniów, że w świecie przyrody fizyczna struktura jest jedyną determinantą funkcji - jest to prawda zarówno na poziomie genów i białek, jak i na poziomie całych tkanek i organizmów. Białka enzymatyczne dopasowują się do swoich substratów za pomocą kształtu swojej powierzchni oraz chemicznego charakteru aminokwasów tworzących ich centrum aktywne.

Mechanizmy degradacji białek w komórce

Należy zwrócić szczególną uwagę na to, że procesy syntezy i degradacji białek są ze sobą w stałej równowadze, a ich zaburzenie prowadzi do rozwoju chorób związanych z nadmiernym niszczeniem, lub gromadzeniem się białek. Gra DEGRADATOR skupia się na niszczeniu białek poprzez system UPS, jednak nie jest to jedyny mechanizm, który pozwala komórkom na usuwanie białek. Istotną rolę pełnią także mechanizmy jak autofagia oraz eksport białek na zewnątrz komórki poprzez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Informacje odnośnie tych mechanizmów zostały przedstawione w „Wielkiej Encyklopedii Degradacji Białek”.

Należy zwrócić uwagę na różnice między poszczególnymi szlakami niszczenia białek.

Autofagia - proces polegający na upakowaniu niepotrzebnych białek lub całych organelli komórkowych przez pęcherzyki cytoplazmatyczne (autofagosomy), które są transportowane do lizosomów (organella, w których zachodzi trawienie wewnątrzkomórkowe). Ten sposób niszczenia zachodzi zwłaszcza w sytuacjach głodzenia komórek, gdy wysoki obrót białek i organelli dostarcza składników do budowy białek niezbędnych do przeżycia komórek. Jednakże, długa i intensywna autofagia może aktywować szlaki doprowadzające do śmierci komórki (apoptozy). Wzrost zainteresowania zjawiskiem autofagii uległ nasileniu, kiedy dowiedziono jej istotnej roli w nowotworzeniu. Ponownie, zjawisko autofagii może być zarówno korzystne jak i niekorzystne dla naszego zdrowia. Z jednej strony, autofagia umożliwia “selekcję” uszkodzonych komórek i warunkuje ich przeżycie w ciężkich warunkach, ale z drugiej może umożliwiać przeżycie komórkom nowotworowym, co utrudnia zdrowienie.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe - niepotrzebne białka lub organella mogą być również pakowane w tzw. pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. extracellular vesicles - EVs). Są to pęcherzyki wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej o wielkości nieprzekraczającej 1000 nm. Dzielimy je na małe EVs - do 200 nm średnicy, nazywane egzosomami, oraz duże EVs o średnicy powyżej 200 nm. Transport za pomocą EVs jest niezwykle istotny ponieważ “wyrzuca” niechciane produkty na zewnątrz komórki, skąd mogą one zostać “zjedzone” przez komórki układu odpornościowego, lub zostać wchłonięte przez inne komórki zmieniając ich funkcjonowanie. Dzięki temu ostatniemu, EVs pełnią również znaczącą rolę w komunikacji międzykomórkowej.

System UPS – stanowi oś gry. Jest to bardzo wydajny, selektywny oraz szybki system niszczenia białek. Pełni on kluczową funkcję w regulacji podziału komórek, apoptozy, nowotworzenia oraz reakcji zapalnych, będąc odpowiedzialnym za degradację 80-90% białek w komórce. Za odkrycie mechanizmów degradacji białek przez system UPS Aaron Ciechanover, Avram Hershko oraz Irwin Rose w 2004 r.

otrzymali Nagrodę Nobla (dowiedz się więcej na:

<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2004/popular-information/>; materiał dostępny w jęz. angielskim).



Należy pamiętać, że samo pojawienie się ubikwityny na białku niekoniecznie od razu kieruje białko do degradacji. Pojedyncza ubikwitynacja rzadko prowadzi do takiego efektu, a proteasom zazwyczaj rozpoznaje łańcuchy ubikwityny. Ubikwitynacja może również pełnić inne funkcje regulatorowe, na przykład wpływać na lokalizację białek wewnątrz komórki.

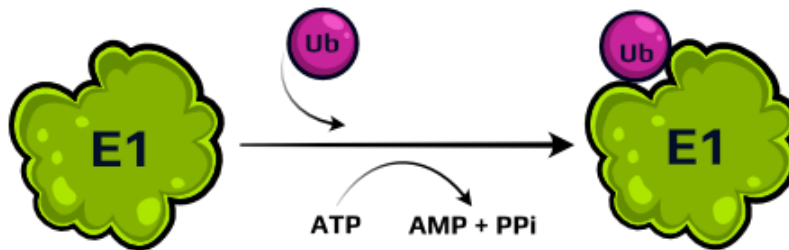
❖ **POZIOM DRUGI** - degradacja białek w komórce jest zależna od ATP

W drugim etapie gracz ma za zadanie ponownie złożyć kompleks enzymatyczny kierując ligazą E3, doprowadzając do degradacji czterech białek w ciągu 3 minut. Jednakże na tym etapie musi pamiętać o tym, że ubikwityna na enzymie E2 jest pośrednio odnawiana w wyniku energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Dlatego złapanie przez gracza cząsteczki ATP umożliwia regenerację ubikwityny na najbliższym enzymie E2. Kolejnym utrudnieniem w tym poziomie jest pojawienie się dodatkowego substratu, którego nie rozpoznaje nasza ligaza E3.

Swoistość substratowa reakcji enzymatycznych

Należy wyjaśnić uczniom w jaki sposób enzymy rozpoznają substraty swoich reakcji. Zwrócić uwagę, że jest to oddziaływanie przestrzenne, polegające na dopasowaniu substratu reakcji do miejsca aktywnego enzymu (miejsce wiązania substratu). To oddziaływanie zmienia strukturę przestrzenną miejsca aktywnego enzymu, co “pobudza” enzym do działania. Jest to tzw. teoria rękawiczki lub indukowanego dopasowania, która wyparła niegdyś popularną teorię klucza i zamka, w której

zmiany kształtu enzymu pod wpływem interakcji z substratem były niesłusznie pomijane.



Selektywna degradacja białek wymaga energii pochodzącej z rozpadu ATP. Jest ona niezbędna do aktywacji enzymu E1, który następnie przekazuje ubikwitynę na enzym E2, który będąc w kompleksie z ligazą E3, ostatecznie przenosi ją na degradowany substrat.

ATP - uniwersalny nośnik energii w komórce

Należy podkreślić, że procesy degradacji białek w komórce wymagają nakładów energii pochodzącej z rozpadu ATP. ATP jest uniwersalnym nośnikiem energii w komórce. Aby lepiej zrozumieć tę koncepcję, możemy porównać ją do paliwa (ATP), które jest niezbędne dla silnika (enzym), który porusza samochodem (reakcja chemiczna). Należy na to szczególnie uczulić uczniów, ponieważ procesy niszczenia białek podczas trawienia w przewodzie pokarmowym nie wymagają dostarczenia energii. Stąd, degradacja białek wewnątrz komórki ma inny charakter niż tylko “rozbijanie” białek na aminokwasy. Podstawową różnicą jest selektywność degradacji wewnątrzkomórkowej i nieselektywność trawienia.

❖ **POZIOM TRZECI** - krótki QUIZ podsumowujący

Podczas quizu gracz utrwala wiedzę zdobytą podczas wykonywania zadań z poprzednich poziomów.

❖ **POZIOM CZWARTY** – przedstawienie nowoczesnego leku typu PROTAC umożliwiającego selektywną degradację

Gracz musi zdegradować cztery białka w ciągu 3 minut, których normalnie nie rozpoznaje bohater gry. Jednakże dzięki złapaniu cząsteczki PROTAC, nasza ligaza E3 będzie mogła wiązać nowe substraty.



Związek typu PROTAC z widoczną dwuczłonową budową – fragment po lewej wiąże się z ligazą E3, a fragment po prawej z wybranym substratem przeznaczonym do selektywnej degradacji.

Reakcje enzymatyczne mogą być kontrolowane przez aktywatory i inhibitory

Należy zwrócić uwagę na to, że enzymy jako katalizatory reakcji biologicznych mogą podlegać zarówno aktywacji jak i inhibicji. Aktywatory to cząsteczki, które zwiększają aktywność danego enzymu, przez zwiększenie powinowactwa do danego substratu. Natomiast inhibitory zmniejszają aktywność danego enzymu przez zmniejszanie powinowactwa do danego substratu.

Kleje molekularne vs PROTAC

Powyższe rozważania są nam niezbędne do zrozumienia różnicy między klejem molekularnym (ang. molecular glue), a cząsteczkami chimerycznymi kierującymi do proteolizy (ang. PROteolytic TArgeting Chimeras; PROTAC). Kleje molekularne są to aktywatory kompleksu ligazy E3, które zwiększają powinowactwo ligazy E3 do danego substratu. W związku z powyższym, białka przeznaczone do degradacji są wydajniej ubikwitynowane i kierowane do proteasomów. Zatem, zastosowanie **klejów molekularnych nie zmienia substratu reakcji, a wydajność reakcji**. Cząsteczki PROTAC działają natomiast jak przejściówki, dzięki którym możemy podłączyć urządzenie posiadające europejską wtyczkę do amerykańskiego gniazdka elektrycznego. Ponieważ co do zasady ligaza E3 jest swoista substratowo (łączy się z określonymi białkami) to, aby zmusić ją do ubikwitynacji innego białka, musimy użyć “przejściówki”. **Dlatego PROTAC zmienia substrat reakcji** i możemy go wykorzystać, gdy chcemy pozbyć się konkretnego białka z komórki. Jednym z przykładów są nowotwory, w których dochodzi do nadmiernego wytwarzania białek promujących ich wzrost i inwazyjność. Zastosowanie związków PROTAC potencjalnie umożliwi niszczenie tych białek i spowolnienie wzrostu nowotworu, przez co łatwiej i skuteczniej można go wyleczyć.

- ❖ **POZIOM PIĄTY** – związki PROTAC umożliwiają degradację wielu różnych substratów

Gracz ma do dyspozycji różne związki PROTAC, które umożliwiają ubikwitynację różnych substratów za pomocą tej samej ligazy E3.

Zastosowaniu różnych związków PROTAC ma ogromne znaczenie w projektowaniu przyszłych terapii przeciwnowotworowych. Dzięki PROTACom, konkretna ligaza E3 (taka, do której pasuje jedna część tego związku) zyskuje możliwość ubikwitynacji innych niż normalnie substratów. Potencjalnie umożliwia to sterowanie degradacją konkretnych białek w komórkach pacjenta, często takich, z którymi tradycyjne leki drobnocząsteczkowe nie są w stanie oddziaływać.

- ❖ **POZIOM SZÓSTY** - enzymy deubikwitynujące odcinają reszty ubikwityny, hamując degradację białek

Gracz ponownie musi zdegradować cztery białka w czasie 3 minut. Jednakże poczynając od tego poziomu, będą mu przeszkadzały enzymy deubikwitynujące, które odcinają przyłączone reszty ubikwityny, co zmniejsza szansę na ich degradację w proteasomie.

Enzymy deubikwitynujące

Enzymy deubikwitynujące (ang. DeUBiquitinating enzymes; DUBs) są proteazami, czyli enzymami tnącymi wiązania peptydowe obecne w białkach. DUBs odcinają reszty ubikwityny od białek, uniemożliwiając ich degradację w proteasomie. Jak wiele mechanizmów regulacyjnych w biologii, działają one w równowadze z ligazami E3, która mają za zadanie dołączać reszty ubikwityny do białek. W grze DEGRADATOR DUBs są naszymi przeciwnikami, które przeszkadzają w kierowaniu białek do degradacji przez proteasom. Nadmiar aktywności DUBs może być przyczyną chorób. W niektórych rodzajach nowotworów mogą one hamować ubikwitynację cząsteczek sygnałowych promujących wzrost komórek nowotworowych, co napędza rozwój nowotworu. Niemniej, pełnią bardzo wiele istotnych funkcji w czasie podziału komórki, przez co odgrywają niezbędną rolę np. w regeneracji tkanek oraz wzroście organizmu. Enzymy deubikwitynujące pełnią również niezwykle istotną rolę

w przebiegu zakażeń niektórymi wirusami. Hamują one niekontrolowaną ubikwitynację białek komórkowych, która jest napędzana przez wirusy, dzięki czemu wirus nie może się wydajnie replikować w komórkach gospodarza i atakować innych komórek. Gorąco zachęcamy do przedstawienia uczniom komiksu o DUBs, który jest zamieszczony na stronie gry (link na str. 2) w zakładce „Dla edukatorów”.

❖ **POZIOM SIÓDMY** - krótki QUIZ podsumowujący

Podczas quizu gracz utrwala wiedzę zdobytą podczas wykonywania zadań z poprzednich poziomów.

❖ **POZIOM ÓSMY** - inhibitory hamują enzymy deubikwitynujące

Gracz ponownie musi zdegradować cztery białka w czasie 3 minut. W tym poziomie ponownie będą przeszkadzać enzymy deubikwitynujące, lecz tym razem do arsenału gracza dołączony zostaje inhibitor enzymów deubikwitynujących. Po najechnaniu na inhibitor, najbliższy enzym deubikwitynujący zostaje zamrożony.

Inhibitory enzymów

1. Przed rozpoczęciem omawiania tego zagadnienia należy przypomnieć uczniom o podstawach działania enzymów oraz ich inhibitorów.
2. **Inhibitor** jest cząsteczką, która inaktywuje katalizator (enzym) tym samym zmniejszając szybkość zachodzenia danej reakcji. Wyróżniamy dwa podstawowe mechanizmy inhibicji: **kompetycyjna (substratowa)** oraz **niekompetycyjna**.
3. **Inhibicja kompetycyjna**, czyli substratowa, polega na hamowaniu enzymu poprzez wiązanie się inhibitora z centrum aktywnym enzymu. W związku z tym można odwrócić jego działanie poprzez zwiększenie stężenia substratu. Odmiennym mechanizmem cechuje się **inhibicja niekompetycyjna**, która wiąże się z enzymem w innym miejscu niż centrum aktywne (w tzw. centrum allosterycznym), co uniemożliwia wiązanie substratu i powoduje dezaktywację enzymu. W grze nie precyzujemy, z jakim typem inhibitora mamy do czynienia, ponieważ w przypadku DUBs istnieją inhibitory wiążące się zarówno odwracalnie jak i nieodwracalnie.

- ❖ **POZIOM DZIEWIĄTY** - auto-ubikwitynacja ligazy E3 powoduje jej degradację przez proteasom

Gracz ponownie musi zmierzyć się z zadaniem ubikwitynacji czterech białek w ciągu 3 minut, jednakże nasz bohater staje się sam wrażliwy na ubikwitynację. Jeśli nasza ligaza E3 pozostaje przez dłuższy czas w kompleksie z enzymem E2 (na którym jest ubikwityna) i nie zwiąże swojego substratu, to na nią zostanie przetransferowana cząsteczka ubikwityny. Po czterokrotnej ubikwitynacji nasz bohater zostanie skierowany do degradacji i gra się zakończy.

Ligazy E3 mogą ulegać degradacji na dwa sposoby: poprzez proces samokatalizowany (**auto-ubikwitynacja**) lub za pośrednictwem modyfikacji katalizowanej przez inne ligazy. W kontekście tego mechanizmu, warto zwrócić uwagę również na nieproteolityczne funkcje auto-ubikwitynacji. Przykładem takiej funkcji jest aktywacja ligaz E3, co podkreśla złożoność i wielofunkcyjność procesu ubikwitynacji w regulacji działania białek.

- ❖ **POZIOM DZIESIĄTY** - QUIZ podsumowujący grę DEGRADATOR
Quiz podsumowuje wiedzę zdobytą podczas gry oraz zawartą w „Wielkiej Encyklopedii Degradacji Białek”

Efekty Kształcenia

Uczeń:

1. określa funkcję oraz budowę białek w komórce;
2. określa sposób zachodzenia reakcji chemicznych w cytoplazmie oraz rozumie rolę składu cytoplazmy dla jej przebiegu;
3. wyjaśnia na przykładach pojęcia szlaku metabolicznego (obrot białek);
4. porównuje istotę procesów anabolicznych i katabolicznych oraz wykazuje, że są ze sobą powiązane;
5. porównuje selektywną degradację białek wewnątrzkomórkową od trawienia zewnątrzkomórkowego;

6. określa rolę oraz istotę obrotu białek w komórce;
7. wymienia rodzaje mechanizmów usuwania białek z komórki;
8. wykazuje związek budowy ATP z jego rolą biologiczną oraz określa jego rolę dla zachodzenia reakcji w komórce;
9. przedstawia charakterystyczne cechy budowy enzymu;
10. wyjaśnia istotę katalizy enzymatycznej;
11. przedstawia teorię swoistości substratowej enzymu;
12. przedstawia sposoby regulacji aktywności enzymów (aktywacja, inhibicja);
13. wyjaśnia mechanizm sprzężenia zwrotnego ujemnego w regulacji przebiegu szlaków metabolicznych (auto-ubikwitynacja);
14. rozumie patomechanizmy chorób związanych z nieodpowiednim obrotem białek w komórce;
15. przedstawia narzędzia wykorzystywane w biotechnologii molekularnej (związki PROTAC, kleje molekularne) i określa ich zastosowania w medycynie;
16. rozumie znaczenie inhibitorów enzymów deubikwitynujących w medycynie.