

## Внутриклеточный сигналинг и протеолиз

*А. А. Чиркин, профессор кафедры химии Витебского государственного университета имени П. М. Машерова, руководитель секции «Образование» Белорусского общественного объединения биохимиков и молекулярных биологов*

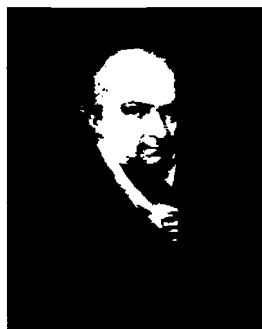


Рисунок 1 — Андрей (Енджей) Снядецкий (фото: Wikipedia)

В 2018 году исполнилось 250 лет со дня рождения (30.11.1768–12.05.1838) выдающегося учёного Виленского университета, создателя химической школы и основ биогеохимии, биоорганической теории жизненных процессов и

медико-биологических новаций XIX века, основателя региональной биоорганической и медико-

биологической науки, академика Российской медико-хирургической академии Андрея (Енджея) Снядецкого.

Могила Андрея Снядецкого находится в д. Городники Ошмянского района Гродненской области.

В связи с этим событием 8–9 ноября 2018 года в Институте биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (г. Гродно) состоялась I Белорусско-польско-литовская научная конференция «Границы биологических наук. Сигналинг и метаболизм».

Как отметили организаторы конференции доктор медицинских наук, профессор



Рисунок 2 — Могила Андрея (Енджея) Снядецкого (фото: radzima.org)



Рисунок 3 — Группа белорусских, польских и литовских участников конференции. На заднем плане под портретом А. Снядецкого — один из активных инициаторов конференции — доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси А. Г. Мойсеенок

И. Н. Семененя и доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси А. Г. Мойсеенок: «Главной задачей конференции было развитие идеи А. Снядецкого о роли эпигенеза в биологии развития и его взаимосвязи с обменом веществ». Его труд «Теория органических существ» (3 тома, 1804–1811) — одна из первых монографий в области биохимии в мировой литературе. В книге рассматриваются закономерности развития живых организмов и биологические процессы как результат обмена веществ.

Автором статьи на этой конференции был сделан доклад, целью которого был поиск способов совершенствования преподавания биохимии и молекулярной биологии в связи с лавинообразным накоплением новых экспериментальных данных и формулированием новых гипотез, а также необходимостью ознакомления старшеклассников и студентов младших курсов с международными базами данных по биологическим и химическим объектам исследования и познания мира. Автор выбрал раздел сигнальной системы, в котором отменяется действие регуляторных бел-

ков p17, p19, p21, p27, p53 и многих других методом протеолитического разрушения.

**Введение.** Около 5 % генома многоклеточных организмов участвует в кодировании ферментов протеолиза. Ранее протеазы считали молекулярными единицами удаления «мусора», которые просто деградировали отработанные белки для поддержания общего гомеостаза. Однако подробные исследования протеазной функции за последние несколько десятилетий продемонстрировали, что эти ферменты намного сложнее, потому что они играют ключевые роли в 1) экспрессии генов, 2) пролиферации клеток и 3) апоптозе.

Протеолитические ферменты — ферменты из класса гидролаз, которые расщепляют пептидную связь между аминокислотами в белках. Пептидазы, или протеиназы, теперь подразделяются на семь семейств на основе природы каталитических центров (MEROPS — база данных пептидаз (<http://merops.sanger.ac.uk/>) согласно Kohei Oda, 2012):

- 1) аспарагиновые (впервые описаны в 1993 г.),
- 2) цистеиновые (1993),
- 3) сериновые (1993),
- 4) металло- (1993),
- 5) треониновые (1997),
- 6) глутаминовые (2004),
- 7) аспарагин-пептидаза (2010).

В авторитетном журнале Федерации Европейских Биохимических Обществ в 2015 году была опубликована статья «Human protease landscape» (FEBS, 2015), рисунок 4.

К цистеиновым протеазам относят каспазы, катепсины, кальпаины и др.; к сериновым — панкреатические ферменты, калликреины, олигопептидазы и др.; к металлопептидазам — аминоксипептидазы, АДАМ и др.; к аспарагиновым — пепсины, химозины и др. и к треониновым — протеасомы. Наличие семи семейств пептидаз связано с тем, что пептидная связь образуется между аминок-

кислотами четырёх групп по полярности боковых цепей (радикалов): гидрофобные незаряженные, гидрофильные незаряженные, отрицательно заряженные и положительно заряженные. Для ферментативного гидролиза этих связей требуются дополнительные условия, например по величине pH, требуемой для оптимального гидролиза. Поэтому в пищеварительном тракте человека имеются пищеварительные полости желудка с pH 5-1 (для реннина у вскармливаемых молоком, а также гастриксина и пепсина у взрослых), в 12-перстной кишке слабощелочная реакция создаёт условия для гидролиза белков трипсином, химотрипсином, эластазой, коллагеназой, карбоксипептидазами, а в тонком кишечнике требуется нейтральное значение pH для действия аминоксипептидазы, три- и дипептидаз.

Белки регулируют процессы, происходящие внутри клеток, используя пять основных механизмов:

- взаимодействие с молекулами ДНК (факторы транскрипции);
- с использованием фосфорилирования (протеинкиназы) или дефосфорилирования (протенинфосфатазы) регулируемых белков;

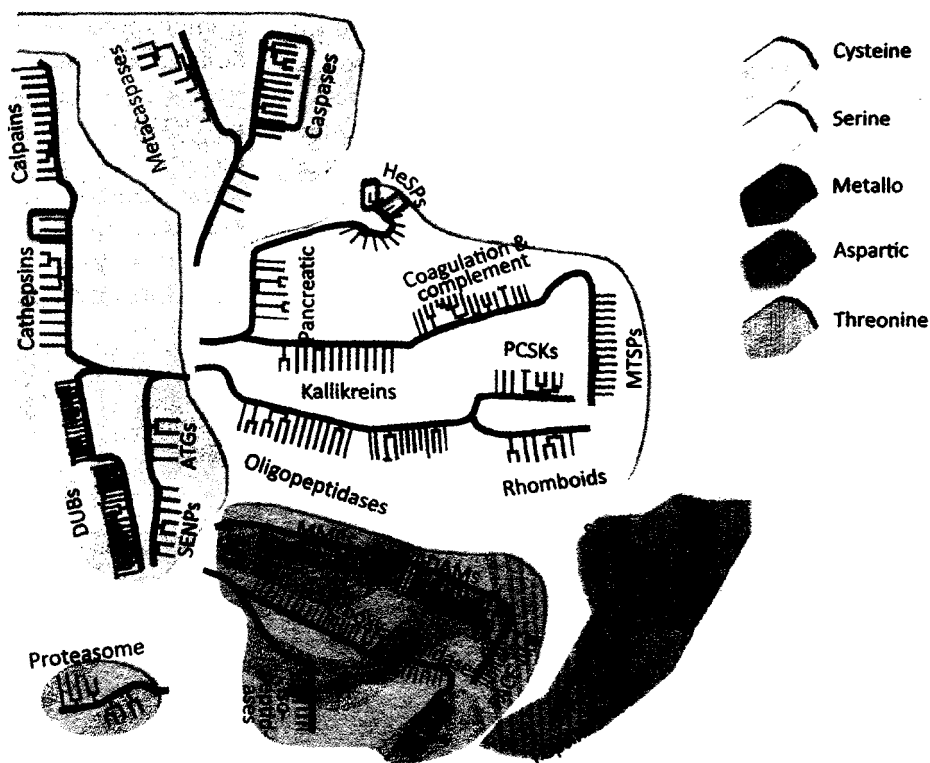


Рисунок 4 — Протеазы человека

- путём взаимодействия с молекулами рибосомы или РНК (факторы регуляции трансляции);

- воздействие на процесс удаления интрона (факторы регуляции сплайсинга);

- влияние на скорость деградации других белков (убиквитин-протеасомный путь).

В данной статье будет обсуждена роль протеолиза в регуляции метаболизма и жизнедеятельности клетки, в том числе 1) внутримембранный протеолиз, 2) внутриклеточный протеолиз и 3) АТФ-зависимый убиквитин-протеасомный путь разрушения белков.

**Внутримембранный протеолиз.** На рисунке 5 показана общая схема внутримембранного протеолиза. Следует учитывать, что мембраны представляют собой фосфолипидные бислои, в которых снаружи располагаются гидрофильные «головки» или функциональные группы молекул (например, 3-ОН группа свободного холестерина), а внутри — гидрофобная зона жирнокислотных остатков фосфолипидов и циклопентанпергидрофенантроновых структур стероидов. В гидрофобной области мембраны ферменты практически не работают.

На рисунке представлены три последовательных этапа внутримембранного протеолиза интегральных «прошивающих» мембрану белков. А: интегральные мембранные белки передают сигналы через липидный бислой и регулируют как ядерные, так и цитозольные эффекторы. В: в случаях RIP внеклеточный домен отделяется ферментами шеддазами и освобождённый эктодомен (ED) может расщепляться или выполнять другие функции. Напомним, что доменом называют анатомически и функционально обособленную часть

белковой молекулы. С: после удаления эктодомена оставшийся сегмент трансмембранного белка становится доступным субстратом для внутримембранного протеолитического расщепления iCLiP. Действие iCLiP приводит к высвобождению внутриклеточного домена (ICD) в цитоплазму для регуляции ядерных и цитоплазматических процессов. I-CLiPs — это внутримембранные протеазы, которые 1) участвуют в сигнальных путях (например Notch), 2) обладают протеасомоподобной активностью, 3) удаляют белки, «засоряющие» мембраны.

На рисунке 6 показаны два варианта внутримембранного протеолиза, обеспечивающие разные сигнальные эффекты освобождённых белковых доменов.

Учитывая эпигенетическую направленность работ А. Снядецкого, отметим, что сегодня эпигенетические регуляторы — соединения, которые контролируют работоспособность генов, *не внося в них изменения*, а лишь позволяя или препятствуя таким ферментам, как РНК-полимераза, осуществлять процесс транскрипции. При транскрипции на основе ДНК синтезируются молекулы информационной РНК. Последние переносят информацию, содержащуюся изначально в генах, в рибосомы, где происходит образование белков. Обнаружено, что салициловая кислота и её производное — дифлунизал — подавляют два белка, которые контролируют активность генов в клетках всего организма. Белок р300 и CREB-связывающий белок (СВР) являются эпигенетическими регуляторами, поддерживающими оптимальное количество других белков, вызывающих воспалительные реакции или участвующих в размножении клеток. Салициловая кислота, блокируя р300 и

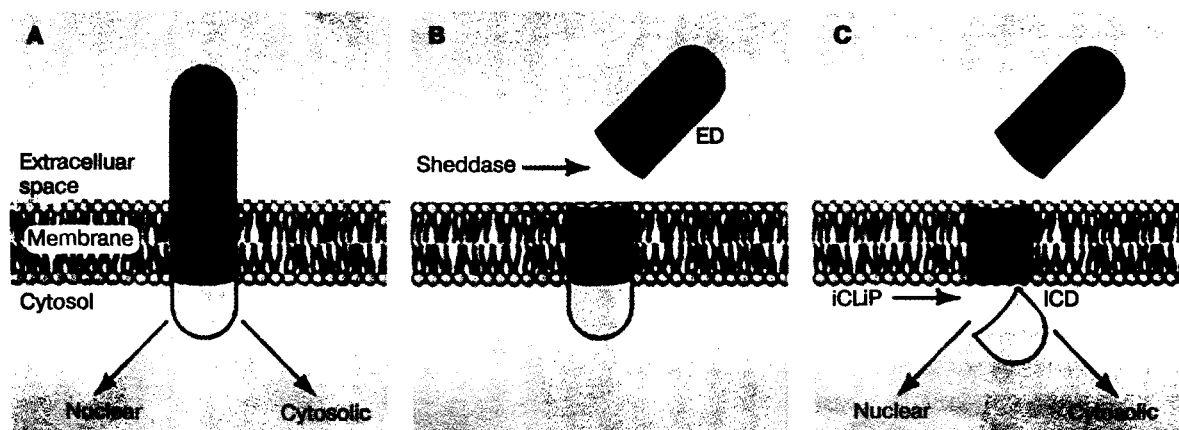


Рисунок 5 — Схема регулируемого внутримембранного протеолиза (RIP)

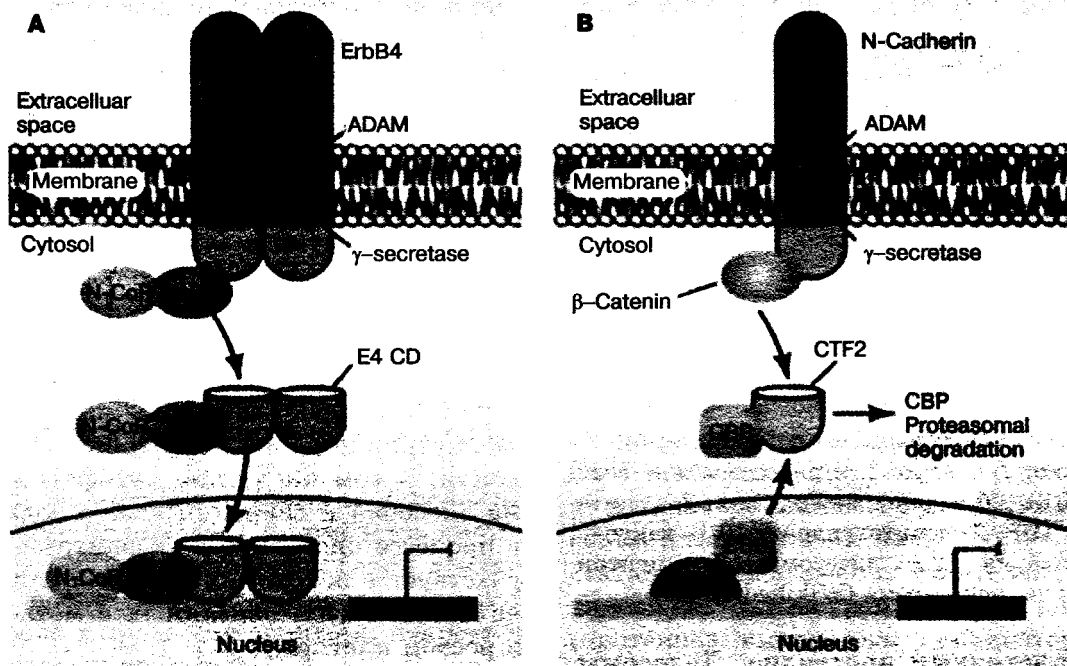


Рисунок 6 — Внутримембранный протеолиз в регуляции ядерных и цитозольных функций. А: прямая регуляция экспрессии генов ядра. Ферменты ADAM-17 и  $\gamma$ -секретаза отщепляют эндодомен E4ICD, который переносится в ядро и выступает как транскрипционный фактор. В: цитозольная функция и вторичные ядерные эффекты. Регулируемый внутримембранный протеолиз N-кадгерина ADAM-17 и  $\gamma$ -секретазой приводит к высвобождению эндодомена CTF2, который 1) вызывает цитоплазматическую транслокацию и протеасомную деградацию транскрипционного фактора CBP, 2) таким образом, подавляя CREB-опосредованную транскрипцию в ядре

CBP, предотвращает вызванное воспалением повреждение клеток.

Для реализации внутримембранного протеолиза широко используются ADAM-протеазы (рисунок 7). ADAM-протеазы (аббревиатура **A** Disintegrin **A**nd **M**etalloproteinase, «дезинтегрин и металлопротеиназа», КФ 3.4.24.46) представляют собой семейство белковых пептидаз, также известных как семейство адамализинов. Такие ферменты классифицируются как *шеддазы*, поскольку они расщепляют внеклеточный фрагмент мембранных белков (в результате скольжения по поверхности клетки). Например, ADAM17 расщепляет внеклеточную область фактора некроза опухоли, что приводит к активации последнего.

Данный рисунок целесообразно использовать при ознакомлении с доменной организацией

трансмембранных белков, активацией профермента путём удаления N-концевого домена и механизма отщепления эктодомена методом скольжения по внешней поверхности плазматической мембраны эукариотической клетки.

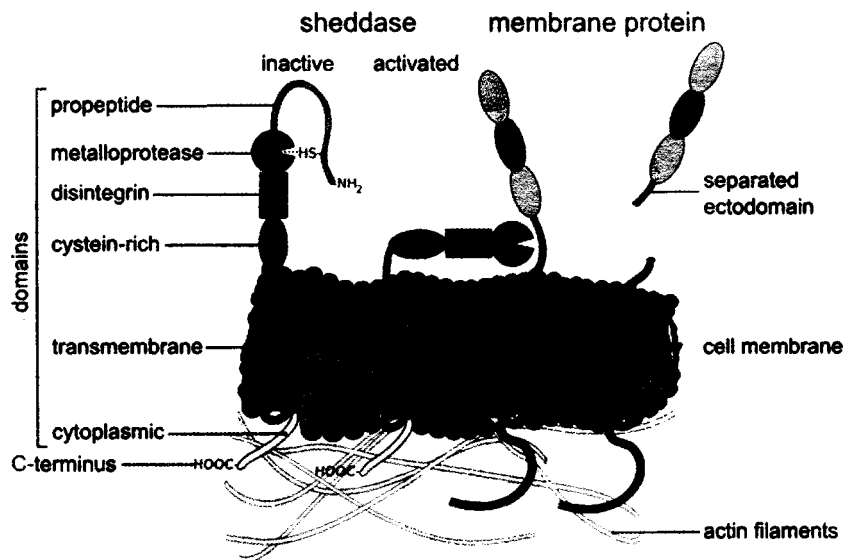
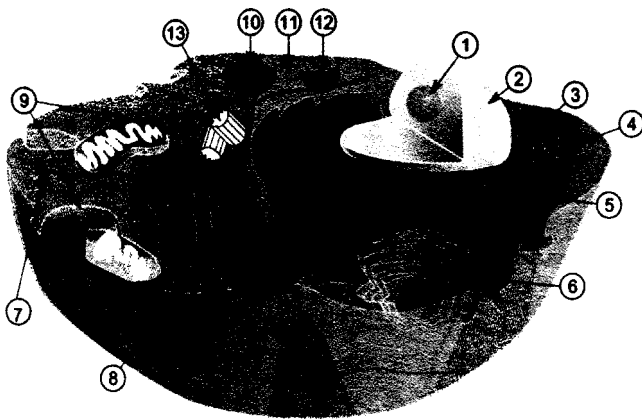


Рисунок 7 — ADAM-протеазы (Wikipedia)



**Рисунок 8** — Органеллы животной клетки:  
 1 — ядрышко; 2 — ядро; 3 — рибосома; 4 — везикула; 5 — ШЭР; 6 — аппарат Гольджи; 7 — цитоскелет; 8 — ГЭР; 9 — митохондрии; 10 — вакуоль; 11 — цитоплазма; 12 — лизосома; 13 — центриоль, центросома (Wikihedia)

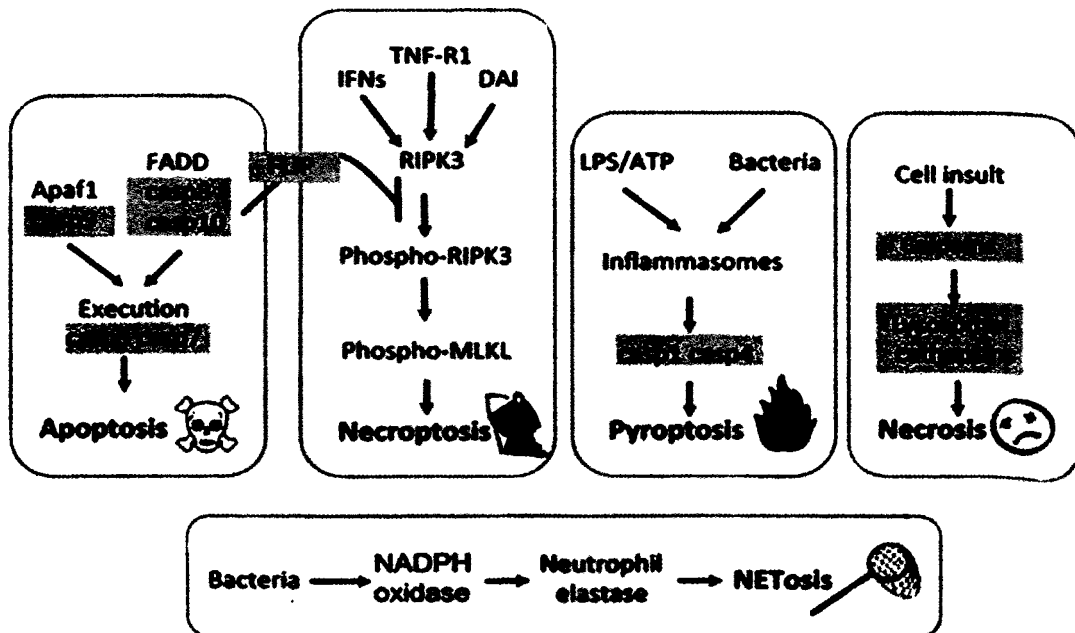
**Внутриклеточный протеолиз. Лизосомы.** На рисунке 8 схематично представлены 13 типов органелл животной клетки.

Двенадцатую позицию в списке одномембранных и двумембранных органелл занимают лизосомы. Лизосома — окружённый мембраной клеточный органоид, в полости которого поддерживается кислая среда (рН 4,5–5,0) и находится около 60 растворимых гидролитических ферментов. Это одномембранный органоид, который образуется путём «почкования» аппарата Гольджи и пузырьков

(эндосом), в которые попадают вещества при эндоцитозе. В образовании аутолизосом (аутофагосом) принимают участие мембраны эндоплазматического ретикулума, например при аутофагии состарившихся митохондрий. Все белки лизосом синтезируются рибосомами на внешней стороне мембран эндоплазматического ретикулума и затем проходят через его полость и через аппарат Гольджи. Лизосомы есть во всех клетках млекопитающих, за исключением эритроцитов. У растений к лизосомам по способу образования, а отчасти и по функциям близки вакуоли. Лизосома отвечает за внутриклеточное переваривание макромолекул, в том числе при аутофагии; лизосома способна к секреции своего содержимого в процессе лизосомного экзоцитоза; лизосома участвует в некоторых внутриклеточных сигнальных путях, связанных с метаболизмом и ростом клетки.

На рисунке 9 показаны основные типы клеточной смерти и некоторые сигнальные пути, запускаящие их.

**Примечание.** Нетоз (англ. NETosis) — это процесс программируемой клеточной гибели, сопровождающийся выбросом нейтрофилом внеклеточной нейтрофильной ловушки (NET — Neutrophil Extracellular Trap). Сходные с нейтрофильными ловушками структуры найдены также и при исследовании эозинофилов (EET), тучных клеток (мастоцитов — MCET), макрофагов, эноцитов насекомых, гетерофилов птиц,



**Рисунок 9** — Сигнальные пути и клеточная смерть (Salvesen G.S. et al., 2016)

клеток корневого чехлика растений. Поэтому введён более общий термин — этоз (от Extracellular Trap, ETosis) — для обозначения любого типа клеточной гибели, в результате которого образуется внеклеточная ДНК-содержащая сеть с адсорбированными белками. Было выяснено, что все эти структуры входят в систему врождённого антимикробного иммунитета.

Практически запрограммированные типы клеточной гибели (например, апоптоз, аутофагия и некоторые другие), а также процессы некроза и аутолиза тканей запускаются нерегулируемыми протеолитическими ферментами. К ферментам нерегулируемого протеолиза относят:

- каспазы (*caspase; cysteine-dependent aspartate specific protease*) — семейство цистеиновых протеаз, расщепляющих белки исключительно после аспартата. Каспазы играют важную роль в процессах апоптоза, некроза и воспалительных процессах;

- гранзимы (*granzymes*, лат. *gran(um)* — зерно, крупинка и греч. *zyme* — закваска, дрожжи) — семейство сериновых протеаз, экспрессирующихся исключительно в цитотоксических Т-лимфоцитах и в клетках натуральных киллеров, которые являются компонентами иммунной системы, защищающей высшие организмы от вирусной инфекции и клеточной трансформации. Гранзимы со-

ставляют около 90 % массы цитолитических гранул специализированных «секреторных» лизосом этих клеток;

- катепсины — в основном внутриклеточные протеазы. Большинство катепсинов проявляют активность внутри лизосом, разрушая захваченные клеткой молекулы. По строению активного участка катепсины разделяют на цистеиновые, сериновые и аспартатные протеазы.

Кальпаин/кальпастиновая протеолитическая система регулирует широкий спектр клеточных процессов. Она представлена во всех тканях млекопитающих основными формами  $Ca^{2+}$ -зависимых цистеиновых протеиназ —  $\mu$ - и  $m$ -кальпаинами (КФ 3.4.22.52 и 3.4.22.53 соответственно) и их ингибитором — кальпастином. Эта высокочувствительная и эффективная система из трёх основных компонентов (протеиназ, ингибитора и активатора —  $Ca^{2+}$ ) связана внутренней взаимной регуляцией. Дисбаланс этой системы связан чаще всего с повышением уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , что и приводит к нерегулируемой деградации внутриклеточных структур, а также к усилению кальпаинзависимых путей клеточной гибели.

Информация об активности этих внутриклеточных протеолитических ферментов при различных типах клеточной смерти представлена в таблице.

Таблица — Пептидазы при различных типах клеточной смерти (Salvesen G. S. et al., 2016)

| Протеазы                  | Апоптоз | Пироптоз | Некроптоз   | Некроз | Нетоз | Неопределённый |
|---------------------------|---------|----------|-------------|--------|-------|----------------|
| Каспазы 3, 6, 7, 8, 9, 10 | +++     | —        | (Каспаза-8) | —      | —     | —              |
| Каспазы 1, 4, 5           | —       | +++      | —           | —      | —     | —              |
| Гранзим А                 | —       | —        | —           | —      | —     | ++             |
| Гранзим В                 | +++     | +        | —           | —      | —     | —              |
| Катепсин С (DPPI)         | +++     | —        | —           | —      | +     | —              |
| Катепсин В                | +       | +        | —           | ++     | —     | ++             |
| Катепсин D                | +       | —        | —           | ++     | —     | +              |
| Эластаза нейтрофилов      | —       | —        | —           | —      | +     | —              |
| Кальпаин 1, 2             | +       | —        | —           | ++     | —     | +              |

**Сигнальные пути и регулируемый убиквитин-протеасомный путь деградации белков.** Сигнальный путь — последовательность молекул, посредством которых информация от клеточного рецептора передаётся внутри клетки. Сигнал передаётся от молекулы к молекуле в строго определённом порядке, что и позволяет говорить о сигнальном пути. Передача

сигнала внутри клетки представляет собой цепочку последовательных биохимических реакций, катализируемых ферментами, некоторые из которых активируются вторичными посредниками. Такие процессы обычно бывают быстрыми: их длительность порядка миллисекунд (в случае ионных каналов), минут (в случае активации протеинкиназ и липид-

опосредованных киназ) или часов (в случае экспрессии генов). Пути передачи сигналов, или сигнальные пути, часто организуются как сигнальные каскады: количество молекул белка и других веществ, участвующих в передаче сигнала, увеличивается на каждом последующем этапе, когда он удаляется от исходного рецептора. Ранее в журнале № 10 за 2018 год была представлена схема основных сигнальных путей PI3K-Akt, JAK-STAT, NF-κB, heterotrimeric G-proteins, Ras-MAPK / ERK, Wnt, Hedgehog, Fas.

В самом общем виде система внутриклеточного сигналинга регулирует три важнейших клеточных процесса: экспрессию генов, клеточное деление и запрограммированную гибель (например, апоптоз). Регуляторами этих процессов являются регуляторные белки. Отсюда следует, что отмена управляющего действия сигнального пути во многом зависит от протеолитического разрушения регуляторных белков, и этот этап системы сигналинга должен также регулироваться. Например, известны регуляторные белки клеточного цикла:

- положительные регуляторы: циклины, циклинзависимые киназы, транскрипционные факторы семейства E2F;

- отрицательные регуляторы: 1) семейство *cip/kip*, включающее гены белков p21, p27 и p57, которые останавливают клеточный цикл в фазе G1, связывая и инактивируя комплексы циклин-CDK. Белок p21 активируется «хранителем генома» белком p53 (что бывает при повреждениях ДНК), а белок p27 активируется трансформирующим фактором роста β (TGFβ), известным ингибитором роста клеток; 2) семейство INK4a/ARF включает p16INK4a, который связывается с CDK4 и останавливает цикл клеток в фазе G1 и p14ARF, что предотвращает деградацию p53.

Далее рассмотрим убиквитин-зависимый регулируемый путь протеолиза, тесно связанный с гидролизом АТФ. Деградация, обусловленная убиквитином, представляет собой процесс, который состоит из стадий, включающих убиквитин-активирующие ферменты (E1s), убиквитин-конъюгирующие ферменты (E2s) и убиквитин-лигазы (E3s). Известно, что один E1 активирует механизмы конъюгации убиквитина и существует большое количество конъюгирующих ферментов E2 и лигаз E3. Протеины, помеченные убиквитином, впоследствии распознаются протеасомой для расщепления и фрагментации. Ферментативная

природа множества E3s и их специфическое распознавание субстрата определяют их как цели терапии, например, опухолевых заболеваний. Сигналы протеолитической деградации более сложные и разнообразные, так как с их помощью не только маркируются белки, удаляемые с помощью протеолиза, но и определяются время удаления и скорость их протеолитического расщепления.

На рисунке 10 представлена ленточная модель убиквитина.

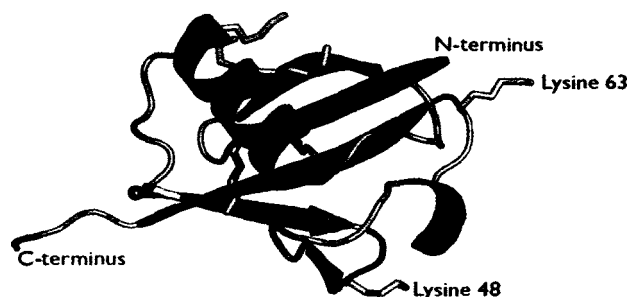


Рисунок 10 — Убиквитин

Убиквитин (от англ. *ubiquitous* — «вездесущий») — небольшой (8,5 кДа) консервативный белок эукариот, состоящий из 76 аминокислотных остатков. Он участвует в регуляции процессов внутриклеточной деградации белков (в протеасомах). Убиквитин имеет семь остатков лизина и N-конец, которые могут служить точками присоединения последующих молекул убиквитина: это остатки лизина в положениях K6, K11, K27, K29, K33, K48 и K63. *Моноубиквитинирование* — это присоединение одной молекулы убиквитина к белку-субстрату. *Полиубиквитинирование* — это образование полиубиквитиновых цепочек на единственном остатке лизина белка-субстрата. После присоединения самого первого остатка убиквитина к белку-субстрату следующие молекулы убиквитина могут присоединяться к первой; в результате образуется полиубиквитиновая цепочка. Эти цепочки формируются посредством образования изопептидной связи между карбоксильной группой C-концевого остатка глицина одной молекулы убиквитина и аминогруппой другой молекулы убиквитина, уже связанной с белком-субстратом.

Обобщённая схема мечения белков для регулируемого протеолиза представлена на рисунке 11.

Убиквитин-активирующий фермент (E1) связывает убиквитин, гидролизует АТФ и образует

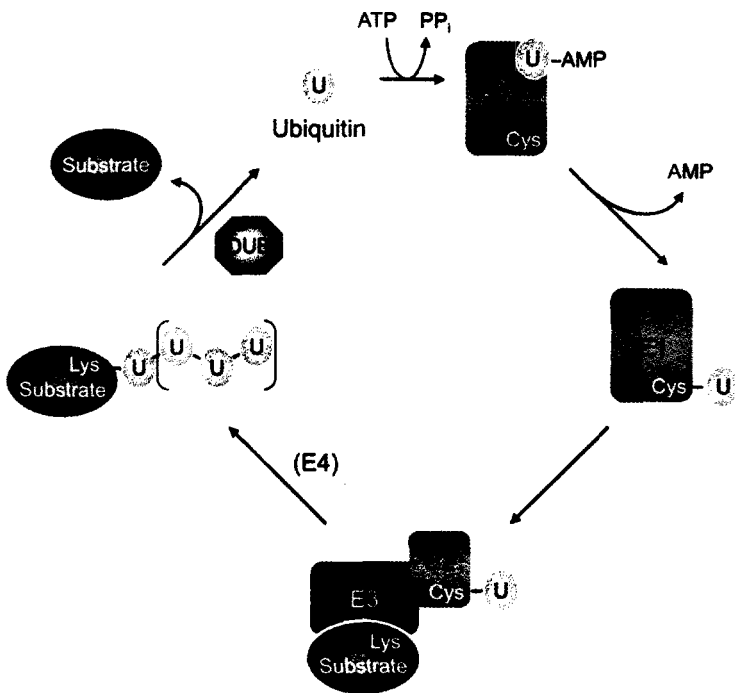


Рисунок 11 — Убиквитинирование белков как субстратов протеолиза

тиоэфирную связь между AMP и убиквитином с последующим переносом молекулы убиквитина на один из своих остатков цистеина (Cys). Молекула активированного убиквитина далее соединяется с одним из ферментов семейства убиквитин-конъюгирующих ферментов (E2) и часто вслед за этим с убиквитинлигазой (E3). Процесс конъюгации убиквитина с субстратом может катализироваться как самим E2, так и E2 совместно с E3. От меченого субстрата или его продуктов распада убиквитин может отделяться с помощью деубиквитирующего фермента (DUB) для повторного использования.

На рисунке 12 представлен SCF комплекс, который представляет собой многокомпонент-

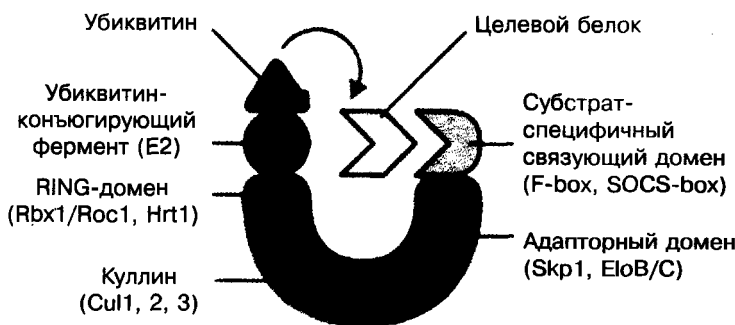


Рисунок 12 — SCF комплекс

ный E3 убиквитин-лигазный комплекс, катализирующий убиквитинирование белков, предназначенных для протеасомной деградации.

Комплекс SCF играет важную роль в управлении клеточным циклом, связывая механизмы сигналинга и управляемого протеолиза. SCF управляет переходами между фазами G1/S и G2/M. Кроме того, SCF-Skp2 убиквитинирует и деградирует белки p27 и p21, а также G1-/S-специфичный циклин E. SCF способствует также протеолизу в раннем митозе Emi1, ингибитора APC/Cdh1 и Wee1, ингибитора Cdr1, предотвращая вступление клетки в митоз при наличии серьезных нарушений в материнских хромосомах.

Все вышеперечисленные процессы необходимы для управляемого протеолиза меченого белка в протеасомах. Активная 26S протеасома состоит из коровой 20S-протеасомы и двух регуляторных частиц 19S (PA700), или 11S, которые присоединяются к торцам

коровой частицы. S — константа седиментации частицы при ультрацентрифугировании. Единицей константы седиментации является сведберг. Отношение скорости седиментации к центробежному ускорению (константа седиментации) — важная молекулярно-кинетическая характеристика системы. Она зависит от массы и формы частиц фазы или молекулярной массы макромолекул. С помощью константы седиментации получают как усредненную характеристику дисперсности, так и кривые распределения частиц по размерам или массам (для полимеров — молекулярно-массовое распределение).

Коровая часть состоит из 28 субъединиц, организованных в четыре семичленных кольца, уложенных друг на друга в виде стопки.

20S-протеасома состоит из двух копий семи разных  $\alpha$ -субъединиц и двух копий семи разных  $\beta$ -субъединиц. В протеасомах млекопитающих каталитически активными являются только  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- и  $\beta$ 5-субъединицы, обладающие *пептидил-глутамил-гидролизующей, трипсиноподобной и химотрипсиноподобной* активностями соответственно.

Регуляторная 19S-частица состоит из 19 отдельных белковых молекул, которые образуют 9-субъединичное основание, непосредственно взаимодействующее



с  $\alpha$ -кольцом 20S-коровой частицы, и 10-субъединичную «крышечку». Шесть из девяти белков основания являются АТФазами. Расщепление АТФ необходимо для денатурации белка (иначе он не проникнет в коровую полость), а также для сопряжения разных этапов деградации белка.

19S-частица обеспечивает открывание «ворот» в 20S, которые препятствуют входу субстратов внутрь протеасомы (рисунок 13).

Вид сбоку



Вид сверху



Рисунок 13 — 26S протеасома (Hochstrasser M., 2009)

Итак, 26S протеасома представляет собой большой многосубъединичный протеазный

комплекс, который 1) разлагает субстрат на небольшие пептиды и 2) рециркулирует метку убиквитина. 20S-протеасома, или коровая часть (средняя часть на рисунке), несёт протеолитические сайты во внутренней полости. Регуляторная частица 19S (крышечки сверху и основание снизу коровой части) содержит комплекс из различных полипептидов, включая полдюжины различных АТФаз, нескольких субъединиц, связывающихся с полиубиквитином, и деубиквитизирующих ферментов (DUB), которые расщепляют цепь убиквитина из субстрата для его повторного использования.

Общая схема АТФ-зависимого убиквитин-протеасомного пути деградации белков представлена на рисунке 14.

Клеточные процессы, которые зависят от конъюгации убиквитина по остаткам лизина 48 и 63 белков-субстратов, представлены на рисунке 15. Из анализа этого рисунка следует, что протеолиз белков, отвечающих за различные внутриклеточные процессы, требует разного мечения убиквитином. Для протеасомной деградации белков модификации гистонов, эндоцитоза, внутримембранного транспорта белков, репаративного синтеза ДНК и регуляции транскрипции требуется моноубиквитинирование белков-субстратов. Для протеасомной деградации многих белковых субстратов и регуляторов транскрипционных факторов требуется формирование цепей убиквитина по

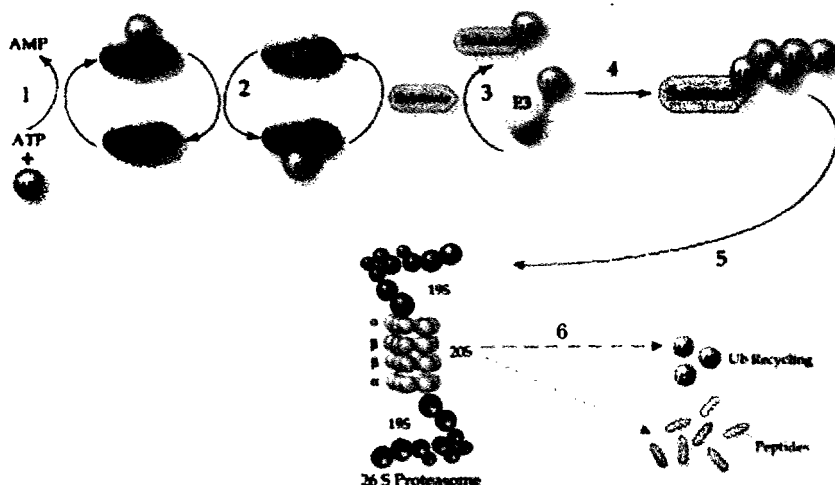


Рисунок 14 — Регулируемый АТФ-зависимый убиквитин-протеасомный путь распада белков (Burger A.V., Seth A.K., 2004). Основные этапы процесса: 1 — АТФ-зависимая активация убиквитина; 2–3 — присоединение молекулы убиквитина к субстрату-белку (моноубиквитинирование); 4 — полиубиквитинирование; 5 — перенос меченного убиквитином субстрата-белка в каталитическую полость коровой части протеасомы; 6 — освобождение убиквитина для повторного использования и выделение пептидов — продуктов протеолитического распада субстрата-белка

остаткам лизина-48. Полиубиквитирование по остаткам лизина-63 необходимо для протеолиза белков трансдукции сигналов, эндоцитоза, перемещения белков в мембранах и восстановления повреждений ДНК мутационного характера.

В последние годы вошёл в обиход термин «убиквитиновый код», поскольку существует высокая вероятность мечения белков-субстратов убиквитином по остаткам лизина в 6, 11, 27, 29 и 33 положениях, а также формирование разветвлённых полиубиквитированных цепей.

**Теоретическое значение регулируемого протеолиза для сигналинга** можно видеть на примере контроля клеточного цикла. Прогрессирование клеточного цикла контролируется упорядоченным действием циклинзависимых киназ (CDK), активированных конкретными циклинами, которые разграничивают фазы клеточного цикла. *Митотические циклины, которые сохраняются в клетке всего на несколько минут, имеют один из самых коротких периодов жизни всех внутриклеточных белков.* После того как комплекс CDK-циклин выполнил свою функцию, связанный с ним циклин будет полиубиквитинирован и разрушен протеасомой, что и обеспечивает направленность клеточного цикла. В частности, выход из митоза требует протеасомзависимой диссоциации регуляторного компонента циклина В из комплекса фактора promotора митоза.

Контрольная точка клеточного цикла G1/S фаза включает протеасомную деградацию циклина А, убиквитинизации которого способствует ассоциация, создающая анафазу (APC), E3-убиквитинлигазы. *APC и белковый комплекс Skp1/Cul1/F-box (комплекс SCF) являются двумя ключевыми регуляторами деградации циклинов в контрольных точках клеточного цикла.* SCF регулируется APC посредством убиквитинирования адаптивного белка Skp2, который предотвращает активацию SCF до перехода G1-S.

Отдельные компоненты частицы 19S протеасомы также

играют свои регулирующие роли. Так, онкобелок *ганкирин* является одним из компонентов 19S частицы, который также жёстко связывает циклинзависимую киназу CDK4 и распознаёт убиквитинированный белок p53 через его средство к ubiquitin ligase MDM2. *Ганкирин подавляет апоптоз, и он сверхэкспрессирован в некоторых типах опухолевых клеток, таких как гепатоцеллюлярная карцинома.*

Существует связь между функционированием протеасомы и хранителем генома белком p53. Активатор протеасом PA28γ (регулятор 11S) усиливает протеасомную деградацию белка p53 через содействие его взаимодействию с MDM2. Этот механизм ингибирует апоптоз после повреждения ДНК, ограничивая накопление p53 (отрицательный регулятор), и демонстрирует участие PA28γ в апоптозе и пролиферации клеток.

Таким образом, можно констатировать, что для нормальной пролиферации клеток необходима неповреждённая «здоровая» ДНК, которая может преодолеть три главных контрольных рубежа (G1-S, G2-M и ранний митоз). При наличии высокого уровня мутаций

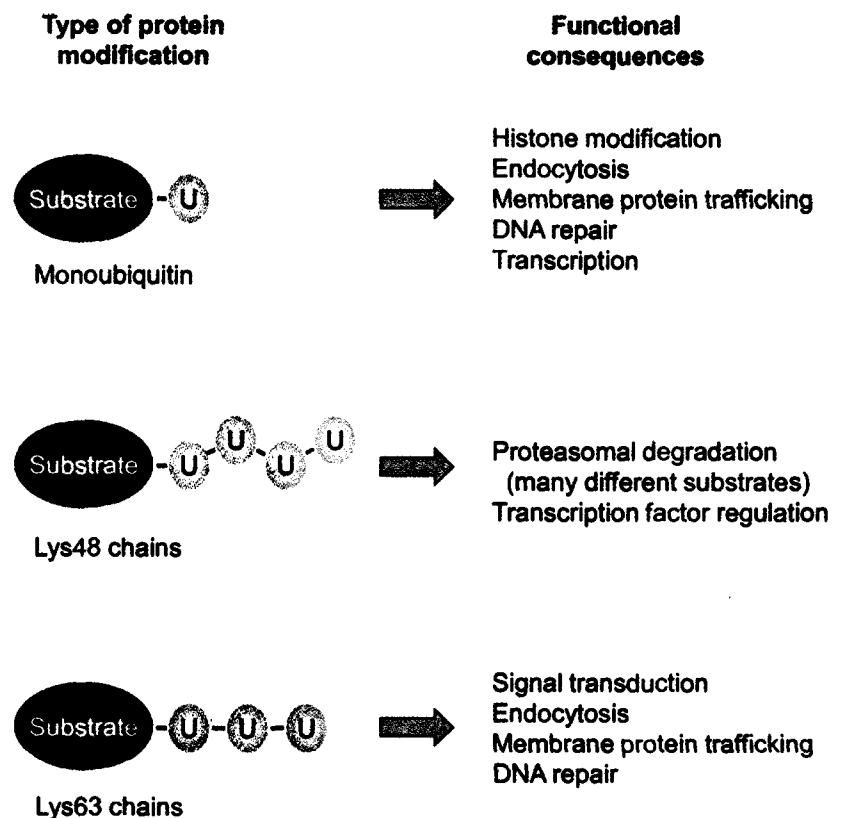


Рисунок 15 — Кодирование убиквитином белков, имеющих значение для регуляции важных внутриклеточных процессов


перемещение клетки по клеточному циклу останавливается для репарации ДНК. Если этого не происходит, клетка уничтожается по механизмам апоптоза. В то же время «бессмертные» опухолевые клетки научились обходить контрольные точки клеточного цикла и ускользать от апоптотического разрушения. В статье показана роль регулируемого и нерегулируемого протеолиза в этих процессах. Другой важный для теоретической биологии вывод можно сделать о том, что наряду с 1) нуклеотидным генетическим кодом включения аминокислот в полипептидные цепи, 2) углеводным кодом гликопротеинов для взаимодействия антигенов с антителами, рецепторов с лигандами и др. существует 3) убиквитинный код для целенаправленного мечения подлежащих уничтожению белков.

**Практическое значение регулируемого протеолиза для сигналинга** можно видеть на примере циркулирующих протеасом (ц-Протеасомы). Wada et al. (1993) были первыми, кто обнаружил ц-Протеасомы в человеческой сыворотке крови у пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями. Jakob et al. (2007) были первопроходцами в изучении прогностического значения уровня ц-Протеасом у больных раком. Они обнаружили, что средний уровень ц-Протеасом был значительно повышен у пациентов с недавно диагностированной активной множественной меланомой (ММ) по сравнению с «тлеющей» ММ, моноклональной гаммапатией неясного генеза (MGUS) и здоровыми донорами.

Интересно, что у пациентов с полным или частичным ответом на лечение был снижен уровень ц-Протеасом по сравнению с таковым до начала лечения. Если нет ответа на лечение, нет и значительного снижения ц-Протеасом. Было также отмечено, что у пациентов с уровнем ц-Протеасом выше 380 нг/мл была ниже общая выживаемость, чем у пациентов с нормальной концентрацией ц-Протеасомы после лечения (рисунок 16).

Автор статьи считает логичным и необходимым для

развития идеи взаимосвязей сигналинга и протеолиза посоветовать учителям и школьникам использовать даже в простейших работах международные базы данных. Назову две из них.

1. **Proteolysis MAP (PMAP)** представляет собой интегрированный веб-ресурс, ориентированный на протеазы. Логотип этой базы данных: .

PMPAP предназначен для помощи исследователям протеаз в обсуждении роли протеолитических сетей в метаболических путях. Публикация: «PMPAP: databases for analyzing proteolytic events and pathways». *Nucleic Acids Research*. 37: D611–D618. Базу можно найти по адресу, представленному в Wikipedia: doi:10.1093/nar/gkn683. PMC 2686432. PMID 18842634.

2. **MEROPS** является онлайн-базой данных для пептидаз (также известных как протеазы, протеиназы и протеолитические ферменты) и их ингибиторов [2]. Схема классификации пептидаз была опубликована Rawlings & Barrett в 1993 году [3], а для ингибиторов белка — Rawlings et al. в 2004 году [4].

Самая последняя версия, MEROPS 12.0, была выпущена в сентябре 2017 года [5]. Ссылки 1–5 в Википедии, свободная энциклопедия.

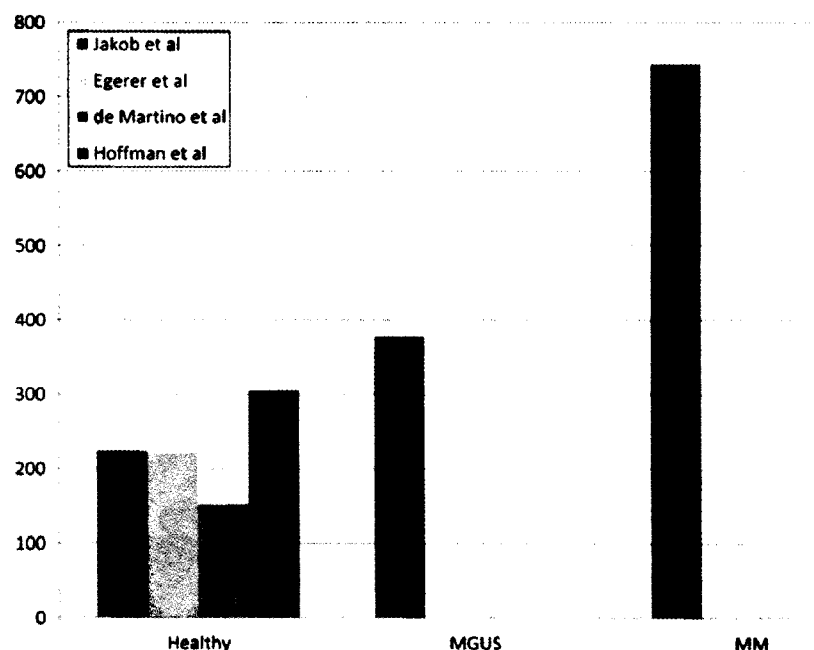


Рисунок 16 — Уровни ц-протеасом у здоровых людей по сравнению с больными моноклональной гаммапатией неизвестного генеза (MGUS) и множественной миеломой (ММ) (Elisabet E. Manasanch et al., 2014)

Команда MEROPS — Нейл Д. Ролингс и Алан Дж. Барретт в Европейском институте биоинформатики EMBL, Cambridge CB10 1SD, Великобритания (merops@ebi.ac.uk).

Авторы MEROPS пишут: «Многие исследователи считают полезным включить данные из MEROPS в свои публикации, и это то, для чего мы здесь, но, пожалуйста, *процитируйте соответствующую публикацию, а также URL-адрес*. Это Rawlings, N. D., Barrett,

A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A. & Finn, R. D. (2018). The MEROPS database включает ферменты, их субстраты и их ингибиторы на 2017 and в сравнении с пептидазами в the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 46, D624-D632».

В заключение следует отметить удобства широко внедряемой системы ссылок и поиска статей в формате Doi (см. список иностранной цитируемой литературы).

#### Список использованной литературы

1. Немова, Н. Н. К вопросу об эволюции протеолитических ферментов / Н. Н. Немова, Л. А. Бондарева // Биомедицинская химия. — 2008. — Т. 54. — В. 1. — С. 42–57.
2. Сорокин, А. В. Протеасомная система деградации и процессинга белков // А. В. Сорокин, Е. Р. Ким, Л. П. Овчинников // Успехи молекулярной биологии. — 2009. — Т. 49. — С. 3–76.
3. Цимоха, А. С. Протеасомы: участие в клеточных процессах / А. С. Цимоха // Цитология. — 2010. — Т. 52. — № 4. — С. 277–300.
4. Чиркин, А. А. Биология рака (информационные материалы для участников кампуса «Рак под контролем: идеи и методы современной онкологии» // Біялогія і хімія. — 2018. — № 10(70). — С. 25–40.
5. Шашова, Е. Е. Внутриклеточный и циркулирующий пулы протеасом: значение при злокачественных новообразованиях различных локализаций / Е. Е. Шашова, Е. С. Колегова, И. В. Кондакова, А. А. Завьялов // Сибирский Онкологический Журнал. — 2015. — № 6. — С. 76–82.
6. Burger, A. M. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications / A. M. Burger, A. K. Seth // Eur. J. Cancer. — 2004. — Vol. 40(15). — P. 2217–2229. — Doi :10.1016/j.ejca.2004.07.006.
7. McCarthy, A. J. Regulated intramembrane proteolysis: emergent role in cell signalling pathways / A. J. McCarthy, C. Coleman-Vaughan, J. V. McCarthy // Biochem Soc Trans. — 2017. — Vol. 45(6). — P. 1185–1202. — Doi : 10.1042/BST20170002.
8. Kohei, Oda. New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases // Oda Kohei // J. Biochemistry. — 2012. — Vol. 151(1). — P. 13–25. — Doi :10.1093/JB/mvr129.
9. Lai, M. Regulated intramembrane proteolysis: signaling pathways and biological functions / M. Lai, M. Caplan // Physiology (Bethesda). — 2011. — Vol.26(1). — P. 34–44. — Doi : 10.1152/physiol.00028.2010.
10. Salvesen, G. S. Protease signaling in animal and plant regulated cell death / G. S. Salvesen, A. Hempel, N. S. Coll // FEBS J. — 2016. — Vol. 283 (14). — P. 2577–2598. — Doi : 10.1111/febs.13616.

#### К сведению авторов!

Доводим до вашего сведения, что в связи с изменениями в налоговом законодательстве Республики Беларусь, присылая свои материалы в издательство, необходимо полностью указывать гражданство, адрес регистрации, паспортные данные (когда и кем выдан паспорт, номер паспорта, идентификационный номер), а также контактные телефоны. В противном случае статьи приниматься не будут.

