

ОГЛЯДИ

УДК: [612.1/.4+616.092](606.61)

Позаклітинні протеасоми

І.М. Прудніков¹, В.М. Цивкін¹, А.М. Смірнов¹, І.В. Прісташ¹, М.О. Сирко²

¹ Інститут фізіології НАНУ ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
e-mail: igor.prudnikov@biph.kiev.ua;

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ;
e-mail: myroslav@gmail.com

У цій роботі розглядаються маловідомі широкому колу спеціалістів подробиці функціонування одного із основних учасників клітинного метаболізму – комплексу нейтральних протеаз разом із їх регуляторами, який називається «протеасома». В огляді аналізуються праці останніх років, присвячені вивченню участі протеасом в міжклітинній сигналізації та катаболізмі регуляторних і сигнальних білків у позаклітинному просторі.

ВСТУП

Кожна клітина потребує швидких та селективних механізмів утилізації як певних регуляторних протеїнів, так і пошкоджених білків або тих, які перебувають у неправильній конформації [1]. Виділяють два основні протеолітичні механізми – тотальний і обмежений. Перший здебільшого проходить в лізосомах за участю гідролітичних ферментів, а другий опосередковується окремими специфічними білками з протеазною активністю, що організовані у протеасомні комплекси. Вперше дослідили та описали АТФ- та убіквітинзалежне розщеплення білків у другій половині минулого століття [2].

Протеасомна активність виявлена як у бактерій та архей, так і у всіх вивчених еукаріотичних організмів. Будова протеасом консервативна. Протеасома складається із корової частини, якій притаманна каталітична активність, та різноманітних регуляторних доменів. Такий білковий комплекс здійснює як убіквітин-, так і АТФ-залежну деградацію переважно денатурованих протеїнів [1].

Досліджено, що убіквітинзалежна протеасомна активність потрібна для регуляції диференціації, апоптозу, клітинного циклу

© І.М. Прудніков, В.М. Цивкін, А.М. Смірнов, І.В. Прісташ, М.О. Сирко

[3]. Проте вважається, що вона важлива не лише для внутрішньоклітинних процесів, про що свідчить наявність функціональних протеасом у плазмі крові, альвеолярній рідині, а також у культуральному середовищі деяких клітин [4, 5]. Виявлений зв'язок між концентраціями позаклітинних протеасом в плазмі крові та онкологічними патологіями, такими як гепатома або мієлома. Кількість протеасом та їх активність у позаклітинному просторі варіює залежно від стадії онкозахворювання. Ці показники можуть використовуватися для прогнозування тривалості життя онкохворих [6].

Аналіз сучасних тенденцій в розумінні функціонування молекулярних катаболітичних механізмів виявляє неочікувані деталі. Останнім часом з'явилася нова інформація про позаклітинний функціонал протеасом, це розширює горизонти бачення інтегральних фізіологічних процесів, про що йдеться у нашому огляді.

Клітинна протеасомна активність

Виділяють декілька різновидів протеасом, які дещо відрізняються молекулярною масою. 20S-протеасома є своєрідним ферментативним центром протеасоми. Вона зв'язується

з різноманітними регуляторами, зокрема з PA28, PA200, ESCM29, PI31, 19S, в такий спосіб утворюючи декілька форм різної молекулярної маси. Найбільш відомими та вивченими формами є 26S-протеасома, яка складається з субчастинок 19S та 20S, 30S-протеасома (19S, 20S та 19S), PA28-протеасома (PA28, 20S та PA28), гібридна протеасома (19S, 20S та PA28) [7].

Структура 20S-протеасоми нагадує циліндр, який містить наскрізний канал та три порожнисті камери, розташовані у центрі. Сам циліндр складається із чотирьох гектамерних структур, які мають форму кілець. Гектамерні кільця накладаються одне поверх іншого, утворюючи циліндричну форму 20S-протеасоми [2, 8]. Субодиноці, які входять до складу гектамерних кілець, бувають двох типів: α і β . Перші формують два зовнішні кільця, другі входять до складу двох внутрішніх кілець. На вході в канал 20S-протеасоми розташовані N-кінці субодиноць α -типу. Вони формують своєрідні ворота, які регулюють надходження субстрату всередину каналу. Якщо регуляторні білки відсутні або ж знаходяться в неактивному стані, ворота перебувають у закритій конформації, тобто не пропускають субстрат у внутрішній канал протеасоми [9].

Субодиноці β -типу, які формують внутрішні кільця, своїми N-кінцями утворюють активні каталітичні сайти протеазної активності. Відомо, що у еукаріотів лише три із семи субодиноць β -типу містяться у каталітичному центрі: субодиноці $\beta 1$, $\beta 2$ та $\beta 5$ [10]. Відповідно, еукаріотні протеасоми здатні до трьох різних типів каталізу. Субодиноця $\beta 1$ має каталітичну активність за типом каспази, білки гідролізуються одразу після негативно заряджених амінокислотних залишків. $\beta 2$ здатна до протеолізу зі специфічністю, подібною до трипсину: пептидний зв'язок розщеплюється одразу після амінокислотного залишку із позитивним зарядом. Субодиноці $\beta 5$ притаманна каталітична активність за типом хімотрипсину: розщеплення пептид-

ного зв'язку після ароматичних залишків амінокислот [11]. Завдяки вищеописаним активностям субстрат піддається протеолізу з утворенням невеликих фрагментів, довжина яких може варіювати від 3 до 24 амінокислот. 20S-протеасома здатна до убіквітиннезалежного протеолізу денатурованих білків. До типових субстратів 20S-протеасоми належать деякі декарбоксілази, c-Jun, c-Fos, I κ B α , Fra-1, Nif-1 α [12].

Каталітичні центри протеасоми не потребують для роботи АТФ та характеризуються невисокою специфічністю. Існує механізм, який захищає потрібні функціональні протеїни від деградації у протеасомі. Отвори входу в канал протеасоми вузькі, сягають близько 1,3 нм у діаметрі. Окрім того, вони мають досить складну структуру. Відповідно, щоб білок, який підлягає деградації, міг потрапити в протеасомний канал, він повинен бути хоч частково денатурованим. Завдяки таким структурним особливостям клітина захищає функціональні білки від випадкової деградації [8].

Відомо, що у складі протеасоми у ссавців наявні також особливі субодиноці, до яких належать $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$, $\beta 5t$, $\alpha 4s$ [13]. Перші три типи постійно утворюються в антиген-презентуючих клітинах, а також клітинах селезінки. Такі субодиноці не є додатковими до стандартного набору субодиноць α - та β -типу, вони переважно замінюють конститутивні. Очевидно, це призводить до зміни ферментативної активності протеасоми. Якщо вона містить субодиноці типу $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$, таку протеасому називають імунопроотеасомою, оскільки відома її властивість забезпечувати деградацію вірусних білків. Встановлено також, що продукти протеолізу такої імунопроотеасоми мають високу афінність до головного комплексу гістосумісності першого типу [14].

Особливістю 26S-протеасоми є ААА-АТФазне кільце (від англ. ATPases associated with various cellular activities), яке відповідає за перенесення субстрата через вузький отвір у внутрішню зону протеасоми, де розташова-

ний каталітичний центр [1]. Як згадувалося вище, 26S-протеасома складається із корової 20S-протеасоми, яка становить основу каталітичного комплексу, та регуляторних компонентів 19S (PA700, Protein Activator), які приєднані до 20S із боків. Останні і містять AAA-АТФазне кільце, а також спеціалізовані додаткові субодиниці. 19S-комплекс складається із двох структурно пов'язаних частин, одна з яких бере участь у впізнаванні мічених убіквітином поліпептидів та забезпечує їх деубіквітинування. Цю частину 19S-комплексу називають “кришкою”. Інша частина 19S-регулятора, яку називають “основою”, взаємодіє із 20S-протеасомою, активуючи її протеазну активність. Вона має структуру кільця, утвореного із шести відмінних між собою AAA-АТФаз: Rpt1, Rpt2, Rpt3, Rpt4, Rpt5 та Rpt6, до яких приєднані три АТФ-незалежні Rpn1, Rpn2, Rpn13 субодиниці. Остання є рецептором субстратів, мічених убіквітином, оскільки забезпечує його специфічне зв'язування. “Кришка” складається із дев'яти субодиниць Rpn. AAA-АТФазні С-кінцеві фрагменти здатні зв'язуватися субодиницями α -типу 20S-протеасоми, результатом чого є відкривання каналу. Rpn11 та Rpn8 містять металопротеази, із них до каталітичної активності здатна лише Rpn11 [1]. Обов'язковою умовою для активності протеасоми є наявність сигналу деградації, який переважно складається із ділянки, яка безпосередньо розпізнається та зв'язується протеасомою та ділянки ініціації денатурації, після якої відбувається переміщення субстрату всередину протеасоми до каталітичних центрів [15].

Молекули, які підлягають деградації, як ділянку розпізнавання містять поліубіквітиновий ланцюг. Убіквітин складається із 76 амінокислот і відіграє помітну роль у посттрансляційній модифікації протеїнів. Останню називають убіквітинуванням. Цей процес визначальний не лише для деградації поліпептидів, але й відіграє важливу роль у внутрішньоклітинних процесах сортування

білків, регуляції трансляції тощо [16]. Приєднання убіквітину до протеїну, який підлягає протеолізу, відбувається за рахунок каскаду ферментативних реакцій. Початковим процесом є АТФ-залежна активація убіквітину, що опосередкована ферментом E1. Продуктом реакції є інтермедіат, що містить макроергічний тіоефірний зв'язок. На фермент E2, якому притаманна убіквітинконьюгуюча активність, переноситься активований убіквітин. Після цього може відбуватися каталітичне приєднання убіквітину до субстрату за рахунок лігази E3 з доменом RING. Можливий також інший шлях, при якому E2 здійснює транслокацію убіквітину на лігазу E3 з доменом NECT. Результатом останнього є утворення перехідного високоенергетичного комплексу. Процес повторюється до утворення поліубіквітиного ланцюга, який зв'язаний з протеїном, що буде піддаватися протеолізу [17].

Доволі часто протеїни, які підлягають протеолізу, містять особливі сигнальні послідовності, які називають дегронами. Такі послідовності можуть бути досить різноманітними, проте всі вони впізнаються убіквітинпротеасомною системою. В результаті відбувається приєднання убіквітинових ланцюгів до білка, що містить дегрони. Протеїн, мічений убіквітином, зв'язується з 19S-доменом протеасоми, відбувається від'єднання убіквітину, розгортання білка і подальша його транслокація до каталітичного центру, розташованого у внутрішній порожнині 20S-протеасоми [9].

Повністю зібрані 26S-протеасоми не є статичними утвореннями і демонструють динамічну поведінку за допомогою дисоціації на вільні субчастинки 20S і 19S і навпаки, переміщуючись між цитоплазмою, ядром та між клітинними компартментами у відповідь на різні фактори росту, розвитку та інші сигнали довкілля. За допомогою маркування протеасомних білків GFP (зелений флуоресцентний білок), з'ясувалося, що більшість протеасомних субодиниць повністю включа-

ються у свої відповідні комплекси та існують у вигляді окремих 20S-протеасом, холо- або гетерогенних композицій 19S та 20S у вигляді 26S. Використовуючи репортерні білки GFP у досліджах на дріжджах, ссавцях та рослинах, з'ясували, що 26S та 20S дифузно поширюються по всьому цитозолу, є в плазмалемі, а також у ядрах, де часто накопичуються на внутрішній ядерній мембрані, поблизу комплексів ядерних пор [18–26].

Позаклітинні протеасоми

Протеасомна активність не є виключно внутрішньоклітинною. Проведені дослідження бронхоальвелярної рідини на предмет наявності активності протеасом показали, що протеоліз не пригнічувався лізосомальним інгібітором, проте змінювався при наявності епоксиміцину. Останній є специфічним інгібітором протеасом. Згодом була встановлена наявність протеасомних субодиниць α -типу у бронхоальвелярній рідині [5, 27]. В наступних поглиблених дослідженнях виявлена підвищена кількість протеасом в альвелярній рідині хворих на гострий респіраторний дистрес-синдром та саркоїдоз [27]. У хворих на саркоїдоз навіть спостерігалася наявність особливих імунопротеасом. Активні протеасомні комплекси виявлені у культуральному середовищі клітин людини, зокрема клітинних ліній A431 і K562 [28], у сироватці крові аутоімунних пацієнтів [29, 30].

Протеасоми було виявлено в спинномозковій рідині [4] та плазмі крові за допомогою специфічних імуноглобулінів. Останні також відомі як циркулюючі протеасоми. Підвищення їх кількості в крові спостерігається при мієлопроліферативних синдромах та наявності різноманітних пухлин. Проте були виявлені і зворотні показники при певних захворюваннях, наприклад, при гострій лейкемії вміст протеасом був нижчий за контрольні значення [29]. Переважно кількість циркулюючих протеасом стабільно зростає на третій-четвертій стадії онкозахворювання. Очевидно, що збільшення кількості протеа-

сом у плазмі крові не обов'язково свідчить про певне онкологічне захворювання. Зміна концентрації цього показника спостерігається при інших захворюваннях, зокрема патологіях печінки: цирозі, гепатиті, стеатозі та ревматоїдному артриті [30].

Механізми формування та функціонування екзосом, як одного з типів позаклітинних везикул

Яким чином внутрішньоклітинні протеасоми потрапляють в позаклітинний простір і наскільки така ситуація є фізіологічною? Для розуміння цього факту або артефакту, треба розглянути базову інформацію про те, що таке везикули, як вони формуються, секретуються і поглинаються.

Везикулярний міжклітинний транспорт біологічних речовин (у тому числі за участю екзосом) є способом регуляції клітинної фізіології, який зустрічається у різних організмів: від прокариотів та нижчих еукаріотів до багатоклітинних організмів. Фізіологічна роль екзосом включає механізми регуляції експресії геному, міжклітинну комунікацію, цитотоксичні ефекти. Відомо, що диференціація клітин залежить від сигнальних молекул, які переносяться в екзосомах до клітин-мішеней та індукують в них проліферацію і диференціювання. МікроРНК, яка була запакована в екзосоми, регулює експресію генів у клітинах, які поглинули ці екзосоми, і, таким чином, вони є мобільними сигнальними молекулами, що впливають на морфогенез [31–34]. Екзосомальна комунікація забезпечує взаємодію плоду та організму матері у ссавців. Комунікація існує при глобальній адаптації імунітету до плоду: у складі цих везикул було виявлено імуномодуляторні молекули головного комплексу гістосумісності класу I навіть у ембріонів [34], а також деякі види сигнальних мікроРНК [36]. Також екзосоми опосередковують міжклітинну комунікацію ракових клітин перенесенням онкогенних речовин [37].

Еукаріотні клітини продукують декілька

типів везикул, які істотно відрізняються між собою за способом утворення та своїми біохімічними й функціональними властивостями, зокрема екзосоми і екзосоми. Екзосоми утворюються відбруньковуванням від плазматичної мембрани. Екзосоми – це позаклітинні везикули, формування яких відбувається внаслідок злиття мультивезикулярних тіл із плазматичною мембраною [32, 36]. Механізми комунікації, які здійснюються за допомогою везикул реалізуються декількома способами, причому поглинуті клітиною-мішенню речовини можуть розщеплюватися в ендосомах або рециркулювати. Один із способів – опосередкована рецепторами внутрішньоклітинна сигналізація. За допомогою такого механізму везикулярний сфінгомієлін спричиняє проліферацію ендотелію [37]. Іншим механізмом везикулярної комунікації є доставка до клітини певного виду РНК, яка при цьому оточена біліпідним шаром і захищена від рибонуклеаз, що можуть міститись у позаклітинному середовищі [32, 36]. За допомогою регульованого екзоцитозу везикул здійснюється також передача нервового імпульсу між нейрональними клітинами. Регульований екзоцитоз забезпечує секрецію однакових протеїнів, зокрема сигнальних пептидів і низькомолекулярних медіаторів [38, 39].

Поглинання екзосом клітиною відбувається за допомогою злиття або ендоцитозу [40]. Наприклад, у випадку з дендритними клітинами екзосоми зв'язуються з плазматичною мембраною, доставляючи свій вміст після злиття, або за допомогою напівзлиття двох мембран. Подібним чином везикули доставляють свій вміст до тромбоцитів [40]. Взаємодія везикулярної та плазматичної мембран здійснюється за рахунок фузогенних ліпідів, що містяться в екзосомах, зокрема фосфатидної кислоти [41]. Серед ендоцитозних механізмів є макропіноцитоз, за допомогою якого плазмалема оточує та захоплює краплину рідини короткими виростами [42]. В результаті утворюються піноцитозні пухирці, які здатні

переміщуватися у внутрішньоклітинному просторі. Макропіноцитоз екзосом виявлений, наприклад, у мікроглії. Деякі екзосоми природним чином індукують макропіноцитоз. Вважають, що вміст екзосом здатний до селективної активації такого механізму, що призводить до підвищення власного поглинання рідини, в якій вони містяться [43, 44].

Велика кількість екзосом поглинаються за допомогою фагоцитозу, що опосередкований рецепторними механізмами, при участі певних білків, які є загальними для різних форм ендоцитозу: клатрин і кавеоліни [44, 45]. Клатрин за допомогою адапторних білків здатний до утворення везикул через полімеризацію в полігональну решітку, яка і захоплює везикулу. Адапторні білки сприяють його полімеризації та вигинанню клітинної мембрани [45]. Ще один спосіб ендоцитозу опосередковується ділянками плазмалеми, що збагачені стеролами та сфінголіпідами (рафти). В рафтах координується збірка сигнальних молекул, а також регулюються нейротрансмітерні процеси [46].

Для міжклітинної комунікації передача сигналів, поглинання речовин клітинною мембраною та подальший розподіл у ендосомах є критичними. Ендоцитовані молекули можуть рециркулювати, розщеплятися у лізосомах, або відправлятися до комплексу Гольджі внаслідок ретроградного сортування. Таке розподілення опосередковане розташованими на поверхні ендосом протеїнами, які утворюють у місцях, де є фібрилярні структури, ретромерний комплекс, що здатний деформувати ліпідний бішар [46]. Мембрани ендосом мають мозаїчну будову, оскільки можуть містити на своїй поверхні мікродомени, які не перекриваються [46]. Пізні ендосоми, які містять внутрішні везикули, називають мультивезикулярними тілами. Везикули, що знаходяться всередині цих тіл, можуть деградувати через лізис або виділятися клітиною у позаклітинний простір у вигляді екзосом. Останні секретуються злиттям мультивезикулярних тіл із плазмалемою [47, 48].

Особливості функціонування позаклітинних протеасом

Раніше вважалося, що протеасоми виділяються у позаклітинне середовище через руйнування клітини. Ця думка підтверджувалася тим, що захворювання, при яких значно підвищувався вміст позаклітинних протеасом, супроводжуються деградацією клітин. Ця теорія була спростована, оскільки в досліджуваному позаклітинному середовищі не виявлено інших внутрішньоклітинних маркерів, які могли б свідчити про такий спосіб секреції [27]. Відмінності в субодиночному складі між внутрішньоклітинними протеасомами та протеасомами позаклітинного простору, які були виявлені, підтвердили, що поява останніх не є наслідком руйнування клітини [49].

Отже, якщо протеасоми вивільнюються у міжклітинний простір не через лізис клітини, то відповідно клітини забезпечують їхню секрецію. Вивільнення протеасом класичним способом через просвіт гранулярного ендоплазматичного ретикулуму і комплекс Гольджі нині вважаються малоймовірним. Протеасоми не знайдені у порожнині гранулярного ендоплазматичного ретикулуму [26]. Проте накопичено чимало даних, які свідчать, що виділення протеасом у міжклітинне середовище відбувається внаслідок секреції позаклітинних везикул, зокрема екзосом. Протеасомні комплекси та їх протеазна активність неодноразово були виявлені у екзосомах [28, 40, 49–51].

Везикулярний транспорт забезпечує перенесення великої кількості міжклітинних сигнальних молекул, регуляторів, ферментів, в тому числі і протеасом. Наприклад, у кубічному епітелії судин шлуночків мозку були знайдені везикули, які містили протеасоми, що потрапляли до цереброспінальної рідини за допомогою екзоцитозу [4].

Протеом позаклітинних везикул мезенхімальних стовбурових клітин був досліджений на наявність протеасомних субодиноць. За допомогою мас-спектрометрії у екзосомах з

високою точністю встановлена наявність усіх субодиноць α - та β -типу 20S-протеасоми, які становлять каталітичне ядро 26S-протеасоми. Крім того, було виявлено три специфічні субодиноць імунпротеасоми. Функціональні протеасоми виділялися спільно із екзосомами мезенхімальних стовбурових клітин мишей, що підтверджує безпосередній зв'язок протеасомних комплексів та позаклітинних везикул [49–51].

Відомо, що концентрація позаклітинних протеасом, корелює із захворюваннями, що демонструє їх важливі фізіологічні та патологічні функції [52–54]. Вважається, що позаклітинні протеасоми відіграють важливу роль у руйнуванні пептидів розчинених у міжклітинній речовині, можуть зменшувати кількість неправильно згорнутих білків у серці після ішемії та реперфузійних пошкоджень. Існує теорія про те, що позаклітинні протеасоми здатні полегшувати перебіг певних захворювань через деградацію накопичених неправильно згорнутих протеїнів, зокрема амілоїдних тілець при захворюванні Альцгеймера, денатурованих білків при синдромі Паркінсона чи пріонних захворюваннях [52], дисстрес синдромі та інших хвороб легень [53, 54].

20S-протеасоми були очищені спільно з екзосомами. Ключем до розуміння особливостей функціонування позаклітинних екзосом є встановлення того, при яких умовах та для яких процесів клітини виділяють позаклітинні протеасоми [55]. Наприклад, наявність активних протеасом в екзосомах мезенхімальних стовбурових клітин позитивно корелює з „голодуванням” клітин при значному зниженні сироватки у культуральному середовищі [50, 51, 55].

Для отримання уявлення про молекулярні та функціональні відмінності між позаклітинними та клітинними протеасомами порівняли їх субодиночний склад, використовуючи кількісну протеоміку на основі iTRAQ (iTRAQ LC/MS-MS). Аналіз середовищ очищених від клітин K562, які містили протеасом-

ні комплекси, допоміг ідентифікувати та кількісно оцінити 114 білків, 19 з яких це білки 26S-протеасоми (всі субодиниці 20S-протеасоми і невелика кількість білків регуляторних частинок 19S), а ще 3 належали до убіквітинової системи. Шістдесят два білки, що взаємодіють із протеасомами були по-різному представленими для клітинних і позаклітинних протеасом. Аналіз показав, що позаклітинні протеасоми були функціонально пов'язані з біосинтезом білка і поєднувалися із шаперонами та АТФ-зв'язуючими білками. Крім того, було виявлено, що стехіометрія комплексів 20S і 19S у позаклітинних протеасомах була відмінною, порівняно із внутрішньоклітинними, і для них був характерний дефіцит 19S-субодиниць, що може вказувати на їх особливі біологічні функції [56, 57]. Схожа інформація була отримана стосовно 20S-субодиниць з ракових клітин [57], лімфоцитів [58] та тромбоцитів [59].

Використовуючи нещодавнє відкриття специфічного для нейрональних мембран протеасомного комплексу 20S, названого нейрональною мембранною протеасомою (NMP), було визначено як активність нейронів регулюється роботою NMP. Згідно з даними цього дослідження [60], 20S-протеасоми можуть бути вбудованими в плазматичну мембрану, де виконують паракринну модифікуючу функцію для активації NMDA-каналів.

Експерименти з ідентифікації функцій NMP проводилися на культурі кортикальних нейронів, які оброблялися протягом різних проміжків часу протеїназою К. Ця протеаза не здатна проникати у живі клітини, але може розщеплювати білки розташовані на зовнішньому боці плазматичної мембрани та у міжклітинному просторі. Після обробки протеїназою К, клітини гомогенізували з подальшим розділенням на цитоплазматичну і мембранну фракції. В мембранах було виявлено пошкоджені N-GluR1 і протеасоми, на відміну від цитоплазми, де протеасоми залишилися незмінними. Крім того, мікроскопія з використанням антитіл до субодиниці-β5

та β2 протеасом виявили їх у плазматичних мембранах, водночас антитіла до субодиниць Rpt5 і S2/Rpn1 показали їх відсутність в мембрані, і це доводить, що до мембран приєднані лише 20S-протеасоми. Також була знайдена асоціація мембранних 20S-протеасом із глікопротеїнами GPM6A та GPM6B. Радіоактивне мічення ³⁵S-метіоніном/серіном клітин дало змогу визначити рух новосинтезованих білків. Виявлено, що стимуляція нейрональної активності призводить до зростання радіоактивності культурального середовища із часом, що свідчить про вихід мітки назовні. Епоксоміцин (специфічний протеасомний інгібітор) зупиняв вихід радіоактивних пептидів. Останні були розміром 0,5–3 кДа, що вказує на включення мічених амінокислот у білкові продукти і деградацію останніх протеасомами, тобто збільшення радіоактивності відбувалося не через вихід вільних амінокислот з клітин.

Дія очищених із культурального середовища пептидів спричиняла вхід Ca²⁺ до цитоплазми і це надходження відбувається не за рахунок внутрішньоклітинних депо. Тетродотоксин і ніфедипін не діяли на вхід Ca²⁺, але на це впливала 2-аміно-5-фосфопентанова кислота, що свідчить про головну роль NMDA-каналів. Оброблені протеїназою К клітини на пептиди не реагували, а вхід Ca²⁺ також блокувався протеасомним інгібітором MG-132 [60, 61].

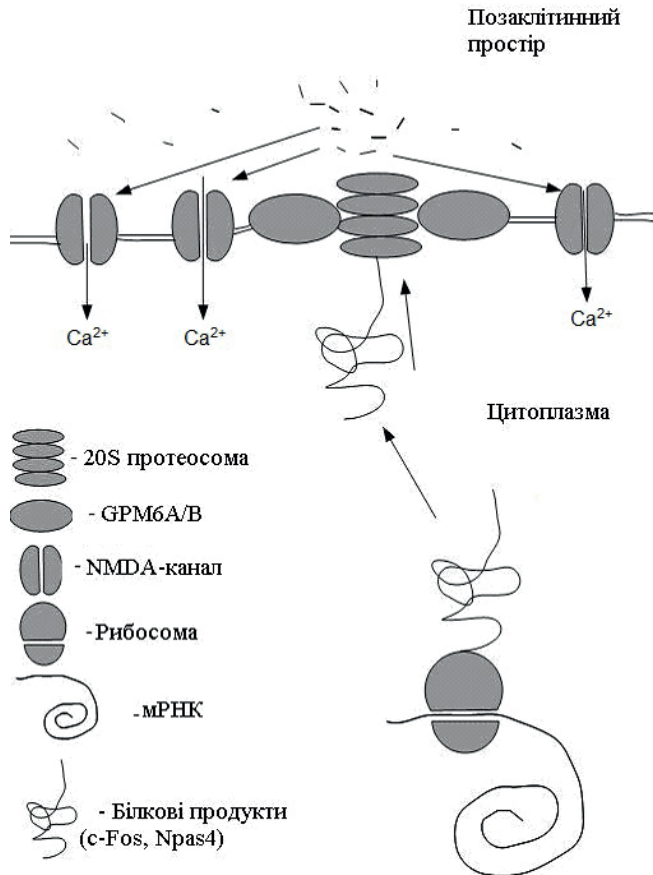
Отже, NMP розміщуються в плазмалемі за допомогою глікопротеїнів GPM6A або GPM6B, які здатні змінювати свої властивості після фосфорилування. Протеасоми здійснюють розщеплення *de novo* синтезованих цитоплазматичних білків, наприклад c-Fos, або Npas4 (які не потребують додаткових міток для деградації оскільки містять відповідну сигнальну послідовність), а продукти протеолізу вивільняються у міжклітинний простір. Короткі пептиди, які утворилися в результаті роботи 20S-протеасом активують NMDA-канали, які відкриваються і забезпечують надходження Ca²⁺ із зовнішнього

простору всередину клітини. На рисунку зображено схему цього процесу.

Можна стверджувати, що існує специфічний для нервової системи мембранний протеасомний комплекс, який безпосередньо та швидко модулює функцію нейронів, деградує внутрішньоклітинні білки на позаклітинні пептиди, які можуть стимулювати нейронну сигналізацію. Цей протеасомний комплекс тісно пов'язаний із нейрональними плазматичними мембранами, на нього впливає позаклітинний простір і він є каталітично активним. Селективне інгібування мембранного протеасомного комплексу непроникним для клітин інгібітором протеасом блокувало продукування позаклітинних пептидів та послабляло кальцієвий сигнал, викликаний

активністю нейронів. Крім того, пептиди, отримані від активності мембранних протеасом, були здатними до індукції нейронної кальцієвої сигналізації [61].

Каталітично активні протеасоми наявні у вільному вигляді в міжклітинному просторі не тільки в нервовій тканині. Є декілька робіт, що проливають трохи світла на це питання. З'ясувалося, що деградація ^{125}I -альбуміну в рідині з альвеол є незалежною від АТФ та убіквітину але інгібується епоксоміцином, що вказує на участь позаклітинних протеасом, які виявлені в альвеолах [62]. Оскільки альвеолярний простір є зовнішньою поверхнею, поступаючись лише шлунково-кишковому тракту в масштабі презентації антигенів з навколишнього середовища, можливо,



Новосинтезовані білки c-Fos і/або Npas4 деградує 20S-протеосома, що вбудована в плазматичну мембрану. Пептидні продукти вивільняються назовні, де активують NMDA-канал, який забезпечує надходження Ca^{2+} всередину клітини, внаслідок чого відбувається сигналізація. Протеасоми здатні знаходитися в мембрані за допомогою трансмембранних глікопротеїнів GPM6A/B

позаклітинні протеасоми в легенях, крім альбуміну, деградують і інші альвеолярні білки. Припускається, що HSPs (heat shock proteins) і шапероніни, також знайдені в альвеолярному просторі, можуть допомогти 20S-протеасомам у розгортанні та «перетравлюванні» білків-мішеней за відсутності адаптора 19S та внутрішньоклітинної системи убіквітину [62]. Дещо більше відомо про позаклітинну деградацію протизапального білка остеопонтину. Цей цитокін, бере участь у кількох захворюваннях, включаючи розсіяний склероз. В експериментах *in vitro* показано, що остеопонтин, який секретується, може розщеплюватися позаклітинними протеасомами, з утворенням фрагментів з новою активністю. Для ідентифікації цих активованих 20S-протеасомами фрагментів використовували мас-спектрометрію. Серед понад сотні ідентифікованих фрагментів було обрано шість. Ці пептиди аналізувалися на здатність викликати хемотаксис у HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell – ендотеліальні клітини пуповинної вени людини). Серед них 4 пептиди виявляють значну хемотаксичну дозозалежну активність щодо HUVEC. Зокрема, вони ефективні в дозі 100 нмоль/л, яка, ймовірно, є максимальною концентрацією фрагмента остеопонтину, що генерується позаклітинними 20S-протеасомами під час експериментів. Активність цих пептидів залежить від їх амінокислотної послідовності, оскільки контрольні пептиди з інвертованими послідовностями не мають активності щодо HUVEC. Схожа відповідь на 6 пептидів спостерігається для міграції клітин лінії плазмобластної лімфоми. Ці фрагменти остеопонтину також зменшують вивільнення протеасом ендотеліальними клітинами (але не клітинами лімфоми) в позаклітинний простір, діючи за принципом негативного зворотнього зв'язку. Останнє явище, здається, відбувається *in vivo* при розсіяному склерозі, де воно відображає чергування ремісії – рецидиву цього захворювання [63]. При експериментальному ауто-

імунному енцефаломієліті (модель розсіяного склерозу) було показано, що остеопонтин здатний викликати неврологічний рецидив, підтримуючи рекрутинг аутоімунних Т-клітин в ЦНС, стимулюючи експресію Th1 і Th17 цитокінів та інгібуючи Т-клітинний апоптоз через регуляцію експресії факторів транскрипції Foxo3 та NF- κ B. Крім того, активовані Т-клітини самі можуть виділяти остеопонтин підвищуючи, таким чином, Th1 та інгібуючи Th2-відповіді. Деградація остеопонтину позаклітинними протеасомами може опосередковувати прозапальний механізм, що задіяний у розсіяному склерозі, оскільки його фрагменти мають більшу активність ніж він сам. Згодом інгібування цими пептидами виділення протеасом ендотелієм призводить до зменшення концентрації пептидів і таким чином до послаблення запалення [63].

Слід відмітити, що хоча екзосоми містять протеасоми, лише незначна частина позаклітинних протеасом, яка є в сироватці крові, зберігається за допомогою везикул. Ця частка не корелює із загальною позаклітинною концентрацією протеасом, що спостерігається у хворих на розсіяний склероз. Припускається, що позаклітинні протеасоми спочатку секретуються у складі короткоживучих екзосом, які згодом повільно вивільнюються в позаклітинний простір через дію сфінгомелінази або фосфоліпаз [63].

ВИСНОВКИ

Протеасоми є еволюційно консервативною, інерційною та водночас здатною до тонкого регулювання, клітинним механізмом білкового катаболізму. Існує виправдана можливість того, що експортовані протеасоми можуть змінити катаболітичні властивості мішеней екзосом і це вказує на їх дуже високий регуляторний потенціал на рівні не тільки окремих клітин, але й організму в цілому. Інтригуючим є наявність протеасом у позаклітинному просторі не тільки в екзосомах, але і у вільній формі або ж існування мембранозв'язаної

форми. Останнє має значення для міжклітинної комунікації навіть для діючих нейронів. Наявність великого різноманіття уже відомих і потенційних функцій протеасом акцентує увагу на значенні їх у фізіології і тому потребує їх подальшого більш поглибленого вивчення. Розуміння явища позаклітинних протеасом має бути застосовано при розробці ліків, що містять у своєму складі протеасомні інгібітори або модулятори.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

**И.М. Прудников¹, В.М. Цывкин¹,
А.М. Смирнов¹, И.В. Присташ¹, М.О. Сырко²**

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПРОТЕАСОМЫ

В данной работе рассматриваются малоизвестные широкому кругу специалистов подробности функционирования одного из основных участников клеточного метаболизма - комплекса нейтральных протеаз вместе с их регуляторами, который называется «протеасома». В обзоре анализируются работы последних лет, посвященные изучению участия протеасом в межклеточной сигнализации и катаболизме регуляторных и сигнальных белков во внеклеточном пространстве.

**I. Prudnikov¹, V. Tsyvkin¹, A. Smirnov¹,
I. Pristash¹, M. Syrko²**

EXTRACELLULAR PROTEASOMES

¹ Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine; e-mail: igor.prudnikov@biph.kiev.ua;

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv; e-mail: myroslaav@gmail.com

Little-known to a wide range of specialists details of the functioning of one of the main participants in cellular metabolism – a complex of neutral proteases with their regulators, which is called “proteasome” – are observed in this paper. The review analyzes the works of recent years devoted to the study of the participation of proteasomes in intercellular signaling and catabolism of regulatory and signaling proteins in the extracellular space.

Key words: exosome; protease; proteasome; signalization.

REFERENCES

1. Maupin-Furlow JA, Humbard MA, Kirkland PA, Li W, Reuter CJ, Wright AJ, Zhou G. Proteasomes from structure to function: perspectives from Archaea. *Curr Top Dev Biol.* 2006; 75:125-69.
2. Naujokat C, Fuchs D, Berges C. Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Sep;1773(9):1389-97.
3. Konstantinova IM, Tsimokha AS, Mittenberg AG. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008; 267:59-124.
4. Mueller O, Anlasik T, Wiedemann J, Thomassen J, Wohlschlaeger J, Hagel V, Keyvani K, Schwieger I, et al. Circulating extracellular proteasome in the cerebrospinal fluid: a study on concentration and proteolytic activity. *J Mol Neurosci.* 2012;46:509-15.
5. Sixt SU, Beiderlinden M, Jennissen HP, Peters J. Extracellular proteasome in the human alveolar space: a new housekeeping enzyme? *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292:L1280-8.
6. Jakob C, Egerer K, Liebisch P, Türkmen S, Zavrski I, Kuckelkorn U, Heider U, Kaiser M, Fleissner C, Sterz J, et al. Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma. *Blood.* 2007;109:2100-5.
7. Ben-Nissan G and Sharon M. Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules.* 2014;4:862-4.
8. Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 1997;386:463-71.
9. Maupin-Furlow J. Proteasomes and protein conjugation across domains of life. *Nat Rev Microbiol.* 2011;10:100-1.
10. Budenholzer L, Cheng CL, Li Y, Hochstrasser M. Proteasome structure and assembly. *J Mol Biol.* 2017;429:3500-4.
11. Kisselev AF, Garcia-Calvo M, Overkleeft HS, Peterson E, Pennington MW, Ploegh HL, Thornberry NA, Goldberg AL. The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem.* 2003; 278: 35869-77.
12. Inobe T, Matouschek A. Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Curr Opin Struct Biol.* 2014;24:156-64.
13. Qian M-X, Pang Y, Liu CH, Haratake K, Du B-Y, Ji D-Y, et al. Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell* 2013;153:1012-4.
14. Kloetzel P-M. Ubiquitin and proteasomes: Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:179-87.
15. Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:679-690.
16. Daulny A, Tansey WP. Damage control: DNA repair,

- transcription, and the ubiquitin–proteasome system. *DNA Repair* 2009;8:444-8.
17. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002;82:373-428.
 18. Enam C, Geffen Y, Ravid T, Gardner RG. Protein quality control degradation in the nucleus. *Annu Rev Biochem.* 2018;87:725-49.
 19. Koch B, Yu HG. Regulation of inner nuclear membrane associated protein degradation. *Nucleus.* 2019;10:169-80.
 20. von Mikecz A, Chen M, Rockel T, Scharf A. The nuclear ubiquitin-proteasome system: visualization of proteasomes, protein aggregates, and proteolysis in the cell nucleus. *Methods Mol Biol.* 2008;463:191-202.
 21. Smoyer CJ, Jaspersen SL. Patrolling the nucleus: inner nuclear membrane-associated degradation. *Curr Genet.* 2019;65:1099-106.
 22. Reits EA, Benham AM, Plougastel B, Neeffjes J, Trowsdale J. Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J.* 1997;16:6087-94.
 23. Enenkel C, Lehmann A, Kloetzel PM. Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *EMBO J.* 1998;17:6144-54.
 24. Takeda K, Yanagida M. Regulation of nuclear proteasome by Rhp6/Ubc2 through ubiquitination and destruction of the sensor and anchor Cut8. *Cell.* 2005; 122:393-405.
 25. Albert S, Schaffer M, Beck F, Mosalaganti S, Asano S, Thomas HF, Plitzko JM, Beck M, Baumeister W, Engel BD. Proteasomes tether to two distinct sites at the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114:13726-31.
 26. Wójcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:579-89.
 27. Sixt SU, Dahlmann B. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin – incidence and relevance. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782:817-23.
 28. Kulichkova VA, Mittenberg AG, Ermolaeva YB, Tsimokha AS, Volkova IV, Evteeva IN, Kozyukharova IV, Gauze LN, Konstantinova IM. Specificity of the proteasome population secreted from cells into the culture medium. *Dokl Biol Sci Proc Acad Sci USSR Biol Sci.* 2004;399:503-6.
 29. Lavabre-Bertrand T, Henry L, Carillo S, Guiraud I, Ouali A, Dutaud D, Aubry L, Rossi JF, Bureau JP. Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies. *Cancer.* 2001; 92:2493-500.
 30. Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, Rückert JC, Dörner T, Burmester G-R, Kloetzel P-M, Feist E. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J Rheumatol.* 2002; 29:2045-52.
 31. Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun.* 2012; 80:1948-57.
 32. György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state- of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68:2667-88.
 33. Hayashi T, Hoffman MP. Exosomal microRNA communication between tissues during organogenesis. *RNA Biol.* 2017;14:1683-9.
 34. Giacomini E, Alleva E, Fornelli G, Quartucci A, Privitera L, Vanni VS, Viganò P. Embryonic extracellular vesicles as informers to the immune cells at the maternal-fetal interface. *Clin Exp Immunol.* 2019;198:15-23
 35. Choi DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics.* 2013;13:1554-71.
 36. Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21:575-81.
 37. Kim CW, Lee HM, Lee TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res.* 2002;62:6312-7.
 38. Bulgari D, Jha A, Deitcher DL, Levitan ES. Myopic (HD-PTP, PTPN23) selectively regulates synaptic neuropeptide release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115:1617-22.
 39. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol.* 2014;28:3-13.
 40. Aryani A, Denecke B. Exosomes as a nanodelivery system: a key to the future of neuromedicine? *Mol Neurobiol.* 2016;53:818-21.
 41. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiology. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841:108-20.
 42. Nakase I, Kobayashi NB, Takatani-Nakase T, Yoshida T. Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes. *Sci Rep.* 2015;5:10300.
 43. Nakase I, Noguchi K, Fujii I, Futaki S. Vectorization of biomacromolecules into cells using extracellular vesicles with enhanced internalization induced by macropinocytosis. *Sci Rep.* 2016;6:34937.
 44. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003;422:37-44.
 45. Fruhbeis C, Frohlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, Kirchhoff F, et al. Neurotransmitter triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol.* 2013;11:e1001604.
 46. El-Sayed A, Harashima H. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol Ther.* 2013;21:1118-30.
 47. Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor contains exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood.* 1989;74:1844-51.
 48. Hurler JH. The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem*

- Mol Biol. 2010;45:463-87.
49. Haraszti RA, Didiot M-C, Sapp E, Leszyk J, Shaffer SA, Rockwell HE, Gao F, Narain NR, DiFiglia M, Kiebish MA, Aronin N, Khvorova A. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:32570.
50. Haraszti RA, Miller R, Dubuke ML, Rockwell HE, Coles AH, Sapp E, Didiot M-C, et al. Serum deprivation of mesenchymal stem cells improves exosome activity and alters lipid and protein composition. *Science*. 2019;16:230-41.
51. Lai RC, Tan SS, Teh BJ, Sze SK, Arslan F, de Kleijn DP, Choo A, Lim SK. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. *Int J Proteomics*. 2012;2012:971907.
52. Zoeger A, Blau M, Egerer K, Feist E, Dahlmann B. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clin Chem*. 2006;52:2079-86.
53. Sixt SU and Dahlmann B. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin - incidence and relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782(12):817-23.
54. Sixt SU and Peters J. Extracellular alveolar proteasome: possible role in lung injury and repair. *Proc Am Thorac Soc*. 2010;7(1):91-6.
55. Bec N, Bonhoure A, Henry L, Berry L, Larroque C, Coux O, Stoebner P-E, Vidal M. Proteasome 19S RP and translation preinitiation complexes are secreted within exosomes upon serum starvation. *Traffic*. 2019;20(7):516-36.
56. Tsimokha AS, Zaykova JJ, Bottrill A, Barlev NA. Extracellular proteasomes are deficient in 19S subunits as revealed by iTRAQ quantitative proteomics. *J Cell Physiol*. 2017; 232(4): 842-51.
57. Kulichkova VA, Artamonova TO, Lyublinskaya OG, Khodorkovskii MA, Tomilin AN, Tsimokha AS. Proteomic analysis of affinity-purified extracellular proteasomes reveals exclusively 20S complexes. *Oncotarget*. 2017;8(60):102134-49.
58. Dieudé M, Bell C, Turgeon J, Beillevaire D, Pomerleau L, Yang B, Hamelin K, Qi S, et al. The 20S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection. *Sci Transl Med*. 2015;7(318): 318ra200.
59. De Paoli SH, Tegegn TZ, Elhelu QK, Strader MB, Patel M, Diduch LL, Tarandovskiy ID, Wu Y, et al. Dissecting the biochemical architecture and morphological release pathways of the human platelet extracellular vesiculome. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(20): 3781-801.
60. Ramachandran KV, Fu JM, Schaffer TB, Na CH, Delannoy M, Margolis SS. Activity-dependent degradation of the nascentome by the neuronal membrane proteasome. *Mol Cell*. 2018;71:169-77.
61. Ramachandran KV and Margolis SS. A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function. *Nat Struct Mol Biol*. 2017;24:419-30.
62. Sixt SU, Beiderlinden M, Jennissen HP, Peters J. Extracellular proteasome in the human alveolar space: a new housekeeping enzyme? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(5):L1280-8.
63. Dianzani C, Bellavista E, Liepe J, Verderio C, Martucci M, Santoro A, Chiochetti A, Gigliotti CL, et al. Extracellular proteasome-osteopontin circuit regulates cell migration with implications in multiple sclerosis. *Sci Rep*. 2017;7:43718.

*Матеріал надійшов
до редакції 12.06.2020*