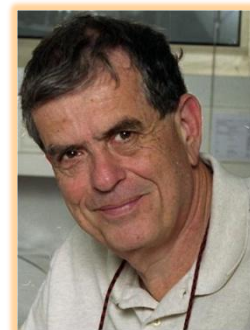


ЛЕКЦИЯ НОБЕЛЕВСКОГО ЛАУРЕАТА

Почему наши белки должны умирать, чтобы мы жили? Протеолитическая система убиквитина: механизмы – патогенез – лечение

Aaron Ciechanover

Cancer and Vascular Biology Research Center,
The Rappaport Faculty of Medicine and Research Institute,
Technion-Israel Institute of Technology, Хайфа, Израиль



Концепции обновления белка не более 70 лет. До ее появления белки человеческого организма рассматривались как практически стабильные компоненты, которые «изнашиваются» в минимальной степени. Белкам пищи отводилась роль энергетического топлива, считалось, что они не имеют никакого отношения к структурным и функциональным белкам организма. Экспериментальное изучение этого вопроса представлялось малореальным из-за отсутствия соответствующих технологий, а именно, стабильных изотопов. Технологии радиоактивных изотопов начал развивать еще в 1943 г. George de Hevesy, но большинство из них были нестабильными и не могли использоваться для изучения процессов метаболизма. Изначальную гипотезу о стабильности структурных белков и роли белков пищи только как энергетического топлива опроверг Rudolf Schoenheimer. Иммигрировав из Германии в США, этот ученый начал работать в отделении биохимии Колумбийского Университета [1–3], где познакомился с химиком Harold Urey, первооткрывателем дейтерия – тяжелого изотопа водорода. Открытие дейтерия позволило получить тяжелую воду. Вместе с David Rittenberg Urey и Schoenheimer предложили «использовать стабильные изотопы в качестве метки органических составляющих с тем, чтобы такой меченый агент оказался идентичен по своим биохимическим свойствам природному аналогу – промежуточному метаболиту того или иного пути» [1]. Позднее Urey удалось обогатить азот (^{15}N), благодаря чему Schoenheimer и Rittenberg получили возможность «метить» аминокислоты и, как следствие, исследовать динамику белков. С помощью ^{15}N -меченного тирозина им удалось показать на крысах, что с мочой выводится только около 50% этой аминокислоты, «в то время как половина задерживается в тканях организма и встраивается в белки» [4], причем в этом участвует только углеводородная цепь, а остальные фрагменты (преимущественно αNH_2 -группы) распределяются между другими фракциями. Таким образом, было однозначно доказано, что структурные белки человеческого организма находятся в динамическом состоянии синтеза и деградации, а аминокислоты постоянно претерпевают взаимное преобразование. Те же самые данные были получены с применением ^{15}N -меченного

лейцина [5]. Эта серия экспериментов пошатнула общепринятые представления, а именно: (1) потребляемые с пищей белки полностью метаболизируются, а продукты метаболизма экскретируются; (2) структурные белки человеческого организма стабильны и статичны. О своих революционных открытиях Schoenheimer рассказал в ходе лекции Edward K. Dunham в Гарвардском Университете. После его безвременной трагической смерти в 1941 г. Hans Clarke, David Rittenberg и Sarah Ratner опубликовали эти лекции в виде небольшой книги, которую озаглавили «Динамическое состояние составляющих человеческого организма». В книге была представлена новая гипотеза. Согласно ей, метаболизм белков сравнивали с принципами работы двигателя внутреннего сгорания. Однако многие ученые не приняли концепцию обновления белков, и до середины 1950 гг. ее оспаривали. Например, изучая кинетику β -галактозидазы у *E. coli*, Hogness и соавт. [7] не нашли никаких однозначных свидетельств в пользу того, что молекулы белков, содержащихся в тканях млекопитающих, находятся в динамическом состоянии. Более того, они продемонстрировали, что белки растущей *E. coli* статичны. Следовательно, по их мнению, синтез и поддержание состава белков в растущей клетке не ассоциируется с «динамическим состоянием». И хотя опыты проводились только с бактериальной β -галактозидазой, исследователи экстраполировали свои выводы и на белки млекопитающих, причем термин «динамическое состояние» использовался ими не случайно, он был взят из работ Schoenheimer.

Сегодня, после 70 лет исследований по внутриклеточному протеолизу, открытия лизосом и – совсем недавно – системы убиквитина-протеасом, уже нет никаких сомнений в том, что в этой области произошла настоящая революция. Сейчас известно, что внутриклеточные белки постоянно обновляются, причем этот процесс отличается высокой специфичностью, а стабильность многих белков регулируется строго индивидуально и варьирует в зависимости от условий. И если фагоцитоз представляет собой неконтролируемый и неспецифический процесс, то протеолиз внутриклеточных белков сложен, постоянно контролируется и тонко регулируется. Ему принадлежит одна из ключевых ролей в реализации ши-

рокого спектра фундаментальных реакций – клеточного цикла, дифференцировки, транскрипции, презентации антигенов, передачи сигналов, рецептор-опосредованного эндоцитоза, метаболических процессов. Соответственно, изменилось и мнение о том, что регуляция внутриклеточных процессов осуществляется преимущественно на этапе транскрипции и трансляции. Не менее важное значение стало придаваться механизмам регуляции процессов деградации белков. Учитывая, насколько широк спектр субстратов и процессов, не удивительно, что нарушения всех этих механизмов лежат в основе патогенеза злокачественных новообразований, нейродегенеративных, иммуноопосредованных и воспалительных заболеваний. Таким образом, систему протеолиза можно рассматривать в качестве платформы для создания лекарственных средств нового поколения. Действительно, эти препараты не только разрабатываются, а но и уже вышли на фармацевтический рынок.

Лизосомы и внутриклеточная деградация белка

В середине 1950 гг. Christian de Duve открыл лизосомы (рис. 1) [8, 9]. Впервые они были выделены из печени крыс и описаны как вакуолярные структуры, содержащие различные гидролитические ферменты, которые функционируют оптимальным образом в кислой среде. Благодаря наличию мембраны у лизосом их ферменты характеризуются латентным действием, что необходимо для защиты внутриклеточного содержимого от самопереваривания (см. ниже).

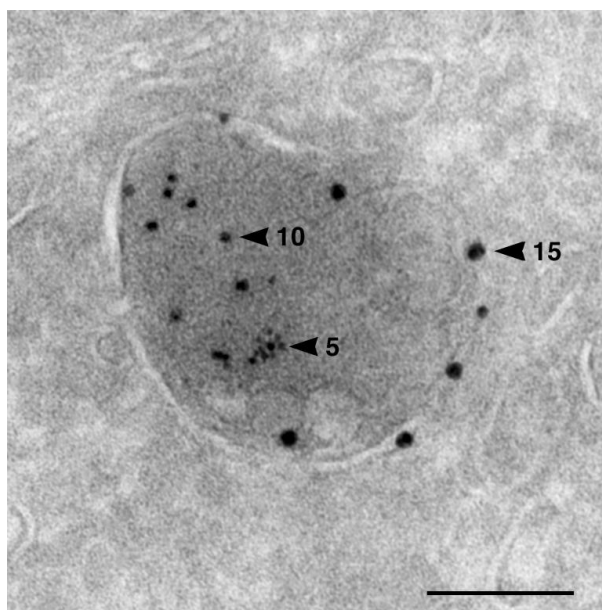


Рис. 1. Лизосома. Ультратонкий срез линии клеток PC12 крыс, которые в течение 1 часа «нагружали» бычьим сывороточным альбумином (БСА) с золотом (частицы размером 5 нм), а затем «метили» лизосомальным ферментом катепсином-В (частицы размером 10 нм) и лизосомальным мембранным белком LAMP1 (частицы размером 15 нм). С разрешения Viola Oorschot и Judith Klumperman (Отделение клеточной биологии Медицинского Центра Университета Утрехта, Голландия).

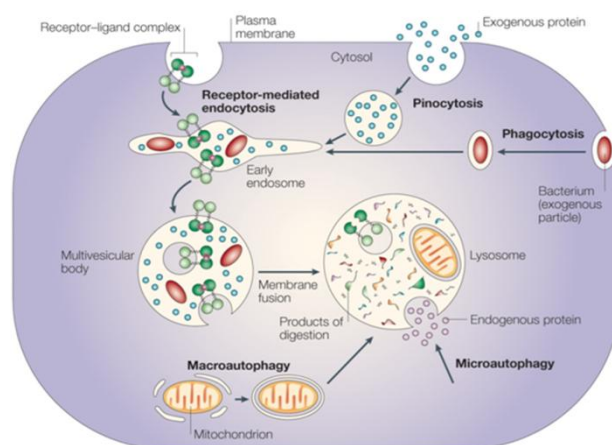


Рис. 2. Процессы переваривания, опосредованные лизосомами: (1) специфический рецептор-опосредованный эндоцитоз; (2) пиноцитоз (неспецифическое поглощение цитозольных пузырьков с внеклеточным содержимым); (3) фагоцитоз (внеклеточных компонентов); (4) микро- и макроаутофагия (внутриклеточных белков и органелл) [83; с разрешения Nature Publishing Group].

Со временем определение понятия «лизосомы» расширилось, поскольку было установлено, что процессы переваривания отличаются динамичностью и подразумевают многоэтапное созревание лизосом в сочетании с деградацией как экзогенных белков (которые служат мишенью для лизосом и разрушаются путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и пиноцитоза) и частиц (поглощаются в процессе фагоцитоза; эти процессы известны как гетерофагия), так и эндогенных белков и клеточных органелл (служат мишенью для реакций микро- и макроаутофагии; рис. 2). Как мы знаем, система лизосом/вакуолей представляет собой своего рода дискретную и гетерогенную пищеварительную систему, к которой также относятся структуры, лишенные гидролаз, в частности, ранние эндосомы (содержат эндоцитированные комплексы рецептора с лигандом и пиноцитированные/фагоцитированные экстракеллюлярные компоненты). Финальный этап этой системы включает остаточные тельца – конечные продукты завершения переваривания путем гетерофагии и аутофагии. Промежуточные звенья представляют собой (1) первичные/ранние лизосомы, которые не участвуют в процессах протеолиза; (2) ранние аутофагосомы, которые могут содержать внутриклеточные органеллы; (3) промежуточные/поздние эндосомы и фагоцитарные вакуоли/гетерофагосомы, которые содержат внеклеточные компоненты/частицы; (4) мультивезикулярные тельца, осуществляющие транспорт между эндосомами/фагосомами и пищеварительными лизосомами.

Открытие лизосом, а также результаты проводившихся в то же самое время независимых экспериментов, которые свидетельствуют в пользу непрерывного синтеза и деградации клеточных белков [10], впервые позволили ученым думать, что они обнаружили органеллу, потенциально опосредующую деградацию внутриклеточных белков. Наличие мембраны, которая служит барьером между протеазами и их субстратом, объясняет факт контролируемой деградации белков. Единственный вопрос,

на который осталось найти ответ, – каким образом субстраты попадают в просвет лизосом, где подвергаются действию лизосомальных протеаз и в конечном итоге деградации. Важной вехой в этой области стало описание фундаментального механизма функционирования лизосом – аутофагии [11]. В ходе метаболических реакций цитоплазма разделяется на отсеки, содержащие группы клеточных белков. Затем эти отсеки сливаются, образуя первичные лизосомы, а их содержимое переваривается. Этот процесс получил название микроаутофагии. В более экстремальных условиях (например, при голодании) митохондрии, мембраны эндоплазматического ретикулума, гликогеновые тельца и другие компоненты цитоплазмы поглощаются по механизму макроаутофагии [12]. Различные варианты функционирования лизосом при переваривании вне- и внутриклеточных белков отражены на рисунке 2.

Однако на протяжении более чем 20 лет, с середины 1950-ых гг. до конца 1970 гг., становилось все сложнее описывать различные аспекты внутриклеточной деградации белков, принимая во внимание только механизмы активности лизосом. Появлялось все больше экспериментальных данных в пользу того, что деградация по крайней мере некоторых классов клеточных белков не зависит от лизосом. Но несмотря на это, в отсутствие других альтернативных гипотез многие ученые продолжали находить в большей или меньшей степени обоснованные доводы в пользу концепции лизосом.

Постепенно выяснилось, что стабильность различных белков варьирует, а время полу-жизни колеблется в пределах от нескольких минут до многих дней. Например, для орнитиндекарбоксилазы оно составляет порядка 10 мин., а для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – 15 часов [13, 14]. Кроме того, было установлено, что скорость деградации ряда белков меняется в зависимости от физиологических условий, например, доступности, нутриентов или гормонов. С концептуальной точки зрения оказалось сложным соотнести данные о периоде полу-жизни различных белков с механизмом функционирования лизосом, поскольку было известно, что микроаутофагоцитарные пузырьки содержат когорты внутриклеточных (цитозольных) белков, которые, как предполагалось, должны деградировать с одинаковой скоростью. Аналогичным образом не вызывало сомнений, что при патофизиологических условиях (голодание или поступление нутриентов) стабильность всех клеточных белков меняется в равной степени. Естественно, как сейчас известно, это вовсе не так.

Другим источником сомнений относительно состоятельности лизосом как органелл, в которых разрушаются внутриклеточные белки, послужило открытие, что специфические и общие ингибиторы лизосомальных протеаз оказывают различное действие на те или иные пулы белков, т. е. конкретные классы белков служат мишенью для разных протеолитических механизмов. Так, деградация внеклеточных белков посредством эндоцитоза/пиноцитоза может заметно подавляться, в то время как эффект в отношении деградации длительно живущих клеточных белков будет лишь частичным, а процессы деградации короткоживущих и аномальных/мутированных белков почти не пострадают.

Наконец, с позиций термодинамики было сделано парадоксальное открытие: деградация клеточных белков

требует затрат метаболической энергии, причем в ходе реакций протеолиза энергия потребляется непосредственно. Это наблюдение не согласуется с описанным ранее принципом функционирования лизосомальных протеаз, которые работают в кислой среде и, равно как и другие протеазы, разрушают белки посредством экзотермических механизмов.

И тем не менее, предположение о том, что деградация внутриклеточных белков опосредована лизосомами, не лишено логики. Протеолиз является результатом непосредственного взаимодействия протеазы с мишенью (субстратом). Очевидно, что активные протеазы не могут находиться в цитоплазме в свободном состоянии, поскольку в этом случае произойдет саморазрушение клетки. Следовательно, любая система протеолиза, участвующая в деградации внутриклеточных белков, должна включать механизм, который реально или виртуально разграничивает протеазы и их субстраты, благодаря чему они взаимодействуют только тогда, когда это необходимо. Эту функцию выполняют мембраны лизосом. Никто не мог предположить, что не известный ранее вариант посттрансляционной модификации – убиквитинация – служит в качестве сигнала протеолиза, в отсутствие которого не меченные путем убиквитинации белки остаются не восприимчивыми к протеолизу.

Хотя строение лизосом подразумевает необходимость разграничения протеаз и их субстратов, а механизм аутофагии позволяет объяснить, как цитоплазматические белки попадают в просвет лизосом, еще множество феноменов остаются непонятными, а именно: (1) варьирующие периоды полужизни; (2) необходимость затрат энергии; (3) индивидуальный характер ответа различных пулов белков на ингибиторы лизосом. В соответствии с одной из моделей, все белки обладают различной чувствительностью к действию лизосомальных протеаз, а время их полу-жизни *in vivo* коррелирует с чувствительностью белков к эффектам лизосомальных протеаз *in vitro* [15]. Чтобы понять, почему белки с очень длительным периодом полу-жизни все же чувствительны к лизосомальным протеазам, или почему стабильность белков меняется в зависимости от физиологических условий, была выдвинута гипотеза о том, что хотя все внутриклеточные белки поглощаются лизосомами, деградации подвергаются только короткоживущие белки, а длительно живущие белки диффундируют обратно в цитоплазму. Возможность возвращения нативных компонентов обратно в экстрализосомальные отсеки – это феномен, который позволяет объяснить разницу во времени полу-жизни клеточных составляющих или одной и той же составляющей в зависимости от физиологического состояния [16].

Согласно другой модели, такая селективность обусловлена аффинностью связывания различных белков с мембранами лизосом, что служит способом контроля скорости проникновения белков в лизосомы и их последующей деградации [17]. Для некоторых белков дрожжей, таких как ферменты глюконеогенеза – фосфоенолпируват-карбоксикиназа и фруктозо-1,6-бисфосфатаза, – было сделано допущение (хотя и не вполне обоснованное), что деградация белков в вакуолях регулируется глюкозой по механизму, получившему название «катаболическая инактивация»; возможно, он подразумевает фосфорилирование этих белков. Впрочем, это объяснение

актуально только для небольшого и строго специфического пула белков [18, 19].

В более поздних исследованиях было показано, что при стресс-индуцированной макроаутофагии общая последовательность аминокислот KFFERQ регулирует проникновение различных цитоплазматических белков в просвет лизосом через связывание со специфическим «рецептором», влияя одновременно на активность цитоплазматических и лизосомальных шаперонов. Однако эта теория объясняет только то, почему обширные популяции белков, содержащих гомологичные последовательности, массово диффундируют в лизосомы, но не то, как конкретный белок становится мишенью реакции деградации в зависимости от тех или иных условий [20, 21].

Если говорить о затратах энергии на деградацию белков, то они являются непрямыми. Она требуется, например, для транспорта белков через мембраны лизосом [22] и/или работы H^+ -насоса и поддержания низкой кислотности среды в просвете лизосом, что является необходимым условием для оптимального функционирования протеаз [23]. Сейчас достоверно известно, что оба этих процесса энергозависимы. В отсутствие иных альтернативных гипотез и при наличии механизма лизосомальной деградации как наиболее логичного объяснения прицельного протеолиза всех известных классов белков, в середине 1960 гг. Christian de Duve заявил, что внеклеточное переваривание превращается во внутриклеточное, когда сочетается действие протеаз с ограниченными индивидуальными свойствами [24]. Феномен различной чувствительности конкретных групп белков к действию ингибиторов лизосом остается загадкой, разгадка которой – это шаг на пути к дальнейшему изучению систем нелизосомального протеолиза.

Долгое время поиск нелизосомальных систем протеолиза оставался безрезультатным из-за отсутствия бесклеточных препаратов, с помощью которых можно было бы достоверно воспроизвести события клеточного протеолиза, т.е. специфические энергозависимые процессы деградации белков. Важный прорыв в этой области удалось совершить Rabinovitz и Fisher, которые выяснили, что в ретикулоцитах кроликов происходит деградация аномального гемоглобина, содержащего в своем составе аналог аминокислоты [25]. Эксперименты этих ученых помогли смоделировать патологические состояния, известные под названием гемоглобинопатий. У таких пациентов происходит быстрое разрушение гемоглобина в ретикулоцитах, поскольку гемоглобин либо имеет неправильное строение из-за аномалий строения его цепей (например, при серповидно-клеточной анемии), либо синтезируется в избыточном количестве (в частности, при талассемии, когда парные цепочки гемоглобина не продуцируются вообще или продуцируются, но быстро разрушаются, из-за чего бигетеродимеры не образуются) [26, 27]. Ретикулоциты представляют собой конечную стадию дифференцировки красных кровяных клеток, особенность которых – отсутствие лизосом. С учетом вышеизложенного было сделано предположение о том, что деградация гемоглобина в этих клетках опосредовано нелизосомальными механизмами. Etlinger и Goldberg [28] впервые выделили из ретикулоцитов и охарактеризовали бесклеточные препараты. Общий экстракт избирательно разрушал аномальный гемоглобин, причем этот процесс

требовал гидролиза АТФ и протекал с оптимальной эффективностью при нейтральном pH. Эти факты подтверждают, что в данном случае протеолиз не зависит от лизосом. Позднее такие же удачные опыты были проведены Hershko, Ciechanover и соавт. [29]. В конечном итоге их исследования позволили выделить, очистить и охарактеризовать основные ферментативные компоненты из этих экстрактов, а затем и открыть убиквитин-зависимый механизм передачи сигнала (см. ниже).

Гипотеза о лизосомах ставится под сомнение

Как указывалось выше, известный на сегодняшний день механизм действия лизосом может объяснить ключевые особенности внутриклеточной деградации белка (гетерогенная стабильность конкретных белков, влияние нутриентов и гормонов на их разрушение, зависимость внутриклеточного протеолиза от метаболической энергии) лишь отчасти и не удовлетворяет ученых. Более того, такой уникальный феномен, как дифференцированный эффект селективных ингибиторов на деградацию различных групп внутриклеточных белков, вообще нельзя охарактеризовать с позиций лизосом.

В совокупности эволюция способов мониторинга кинетики белков в клетке и разработка ингибиторов лизосом специфического и неселективного действия позволили идентифицировать различные группы внутриклеточных белков – долго- и короткоживущих – и описать различный характер действия ингибиторов на них [30, 31]. В этой связи Brian Poole и его коллеги из Университета Рокфеллера провели интересный опыт. Они изучали влияние лизосомотропных агентов (слабых оснований, например, хлорида аммония или хлороквина), которые накапливаются в лизосомах, делая их среду с низким pH менее кислой. Предполагают, что таков же механизм фармацевтического действия хлороквина и подобных ему препаратов при малярии: они подавляют активность лизосом паразита, блокируя их способность разрушать гемоглобин клеток «хозяина» в ходе эритроцитарной шизогонии (фазы жизненного цикла малярийного плазмодия). В целях эксперимента Poole и соавт. поместили эндогенные белки живых макрофагов 3H -лейцином, а затем «накормили» их погибшими макрофагами, предварительно также меченными ^{14}C -лейцином. Ученые предположили – и вполне справедливо, – что фрагменты макрофагов и белки подвергнутся фагоцитозу живыми макрофагами, а затем разрушатся их лизосомами. Далее осуществлялся мониторинг эффектов лизосомотропных агентов в отношении долго- и короткоживущих белков, в частности, влияние слабых оснований хлороквина и аммония хлорида (который обладает способностью проникать в лизосомы и нейтрализовать ионы H^+) и ионофора X537A (который рассеивает градиент pH на мембранах лизосом). Установлено, что указанные агенты специфически ингибируют деградацию внеклеточных, но не внутриклеточных белков [32]. Суммировав полученные экспериментальные данные, Poole смог предсказать существование еще не открытой в то время системы нелизосомального протеолиза, благодаря которой происходит разрушение внутриклеточных белков. «Некоторые мак-

рофаги, меченные тритием, поглощали путем эндоцитоза погибшие макрофаги, меченные ^{14}C . Затем эти клетки отмывали и помещали в свежую среду. Таким способом оценивали степень переваривания белков из разных источников одним и тем же макрофагом: белки экзогенного происхождения подвергаются деградации в лизосомах, а эндогенные протеины в любом случае разрушаются в процессе обновления белков» [33].

Тот факт, что для деградации белка клеткам прокариот [34] и эукариот [10, 35] нужна метаболическая энергия, остается малопонятным. Внутриклеточный протеолиз представляет собой экзотермический процесс, для которого парадоксальным образом требуется термодинамическая энергия, и это заставляет исследователей думать, что энергия не может быть использована протеазами напрямую или для протеолиза как такового, она расходуется опосредованно. Simpson [10] делает заключение о том, что «высвобождение аминокислот из белков напрямую зависит от доступа к энергии. Аналогична гипотеза была выдвинута в ходе изучения реакций аутолиза в измельченных тканях, хотя полученные данные крайне трудно интерпретировать однозначно. Поскольку гидролиз белков, катализируемый ферментами семейств протеаз и пептидаз, является экзотермическим процессом, а аутолиз в измельченных тканях и извлеченных органах продолжается в течение нескольких недель (т. е. длительное время после прекращения реакций фосфорилирования или окисления), гипотеза о возможном прямом расходе энергии для каскада реакций, итогом которых является разрушение белка, становится маловероятной». Но опасаясь делать однозначные выводы, Simpson оставляет небольшую «лазейку», говоря о возможности реакции протеолиза, в ходе которой энергия используется напрямую. *«Полученные данные не исключают существования двух (или более) механизмов разрушения белков – гидролитического и энергозависимого»*. Поскольку одной из фаз любого протеолитического процесса является гидролиз, разница между гидролитическим и энергозависимым (т. е. негидролитическим) механизмами деградации белка малопонятна. Вполне возможно, что анализируя эти данные с исторической точки зрения и имея представления о механизме функционирования убиквитин-зависимой системы (который подразумевает потребление энергии на этапе конъюгации убиквитина, предшествующем гидролизу), Simpson имел ввиду не два разных, а единый двухстадийный механизм, но дал не вполне точное описание. В конце Simpson пытается объяснить, каким образом взаимосвязаны процессы деградации и синтеза белка, последний из которых, как известно, требует метаболической энергии. «Тот факт, что энергия нужна как для встраивания, так и высвобождения аминокислот из пептидной цепи, означает их тесную взаимосвязь. Это подтверждают и данные других экспериментов. Результаты первых опытов Benedict, Folin, Gamble, Smith и других ученых по изучению азотистого равновесия свидетельствуют о том, что скорость катаболизма белка варьирует в зависимости от интенсивности поступления белков с пищей. А поскольку количество потребляемых пептидов напрямую сказывается на синтезе, а не распаде белка, нарушение его катаболизма может быть спровоцировано и изменением скорости его синтеза» [10]. Открытие лизосом в клетках эукариот свидетельст-

вует о том, что энергия может использоваться, например, для транспорта субстратов в лизосомы или поддержания низкого pH внутри лизосом. Hershko и Tomkins сделано следующее наблюдение: активность тирозин-аминотрансферазы (ТАТ) стабилизируется в отсутствие АТФ [35]. Следовательно, не исключено, что энергия необходима на ранних этапах протеолитического процесса, до индукции собственно протеолиза, например: (1) для специфической модификации (фосфорилирования) ТАТ, в результате которой фермент становится восприимчивым к разрушению в лизосомах или к протеолизу по другому, пока еще не описанному механизму; (2) для модификации, на фоне которой активируются протеазы ТАТ. Возможно, энергия также требуется для запуска более глобального механизма с участием лизосом, который подразумевает транспорт ТАТ в лизосомы. В отсутствие энергии почти полностью прекращается деградация всех разновидностей внутриклеточных белков, что лишний раз подтверждает более ранние научные данные [10] и важную роль энергии в реакциях катаболизма белка. Что интересно, ингибиторы поступления энергии оказывают эффект, отличный от действия ингибиторов синтеза белка, который проявляется во влиянии только на индуцированный протеолиз (следствие дефицита стероидных гормонов), но не базальный.

Это открытие позволяет исключить существование тесной взаимосвязи между процессами синтеза и деградации белка. У бактерий нет лизосом, поэтому приводить аргумент о необходимости энергии для разрушения белка в лизосомах в данном случае нецелесообразно. Но у *E. coli* гидролиз АТФ может опосредованно влиять на протеолиз, поскольку затрагивает процессы фосфорилирования субстратов и/или протеолитических ферментов, поддержание состояния возбужденности клеточной мембраны и т. д. Согласно этой модели, белки приобретают восприимчивость к протеолизу за счет изменения своей конформации на фоне ассоциации с мембраной клетки, благодаря которой поддерживается локальный энергозависимый градиент определенных ионов. Несмотря на то, что возможность существования этого феномена была опровергнута [37], отсутствие данных за протекание в клетке реакций фосфорилирования заставило полагать, что по крайней мере у бактерий энергия расходуется в ходе протеолиза напрямую.

Как бы то ни было, потребление метаболической энергии для деградации белка – процесса, который с термодинамической точки зрения относится к экзотермическим, – позволяет с уверенностью утверждать, что клеточный протеолиз строго регулируется, причем ходе эволюции царств прокариот и эукариот сохранялся один и тот же принцип/механизм.

Учитывая гипотетическое прямое влияние АТФ на деградацию белков у бактерий, вполне резонно думать о существовании аналогичного механизма разрушения внутриклеточных белков и у представителей эукариот. В подтверждение этого можно сослаться на данные, известные о системе протеолиза в ретикулоцитах [28, 29] – клетках, лишенных лизосом, – в соответствии с которыми энергия расходуется непосредственно на реакцию протеолиза. Впрочем, и здесь механизм детально пока не описан.

Система убиквитина-протеасом

Бесклеточные протеолитические системы ретикулоцитов [28, 29] представляют собой великолепный субстрат для изучения и выделения ферментов, которые служат промежуточными звеньями системы убиквитина-протеасом. При фракционировании неочищенного клеточного экстракта ретикулоцитов на анионообменной смоле с диэтиламиноэтилцеллюлозой были выделены две фракции, каждая из которых была необходима для восстановления энергозависимой протеолитической активности нативного субстрата. Неадсорбированная фракция была обозначена как фракция I, а элюат адсорбированных белков с высоким содержанием солей – как фракция II [38]. Это стало первым шагом к тому, чтобы охарактеризовать систему убиквитина-протеасом. Было выдвинуто предположение о том, что данная система представляет собой не одну-единственную «классическую» протеазу, которая эволюционировала и стала энергозависимой (хотя позднее такие энергозависимые протеазы – протеасома 26S млекопитающих и продукт гена Lon прокариот – были описаны), а имеет как минимум два компонента. Открытие двухкомпонентной системы энергозависимых протеаз опровергло общепринятую парадигму. Чтобы раскрыть данный механизм в деталях, ученые стали выдвигать различные гипотезы, например, что фракции – это протеаза с ингибированной активностью и ее активатор. Мы продолжали восстанавливать активность фракций всякий раз, когда происходила ее потеря в процессе этапов очищения. Использование принципа биохимической «комплементации» позволило открыть и другие белки системы убиквитина-протеасом, присутствие которых необходимо в реакционной смеси для катализа многоступенчатого процесса протеолиза субстратами. Вначале мы подвергли очистке активный компонент фракции I. Им оказался термоустойчивый белок массой порядка 8,5 кД, получивший название АТФ-зависимого фактора протеолиза-1 (APF-1). Позднее выяснилось, что это и есть убиквитин. Решение об очистке фракции I было весьма верным, поскольку она содержала один-единственный белок – APF-1, который необходим для индукции протеолиза субстрата. В состав фракции II входит много таких факторов. Согласно результатам последующих исследований, фракция I имеет и другие компоненты, участвующие в деградации прочих субстратов, но не задействованные в восстановлении активности системы. Мы смогли не только очистить APF-1, но и расшифровать механизм его действия. Очистка фракции II представляет собой гораздо более трудную задачу.

Таблица 1

Распределение АТФ-зависимой протеолитической активности в неочищенном экстракте ретикулоцитов по двум взаимодополняющим вариантам [38]

Фракция	Деградация [³ H]глобина (%)	
	-АТФ	+АТФ
Лизат	1,5	10
Фракция I	0,0	0,0
Фракция II	1,5	2,7
Фракция I и фракция II	1,6	10,6

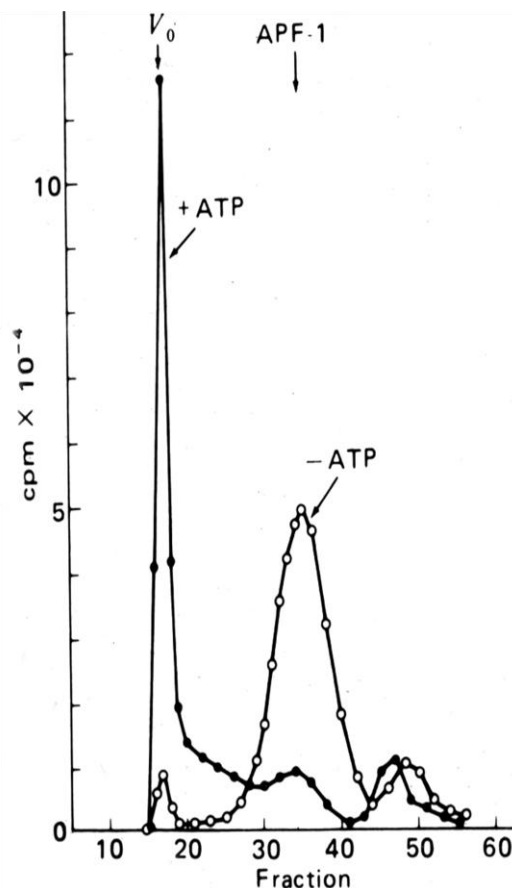


Рис. 3. При инкубации в экстракте неочищенных клеток, содержащем АТФ, APF-1/убиквитин распадается на высокомолекулярные компоненты. Меченный ¹²⁵I APF-1/убиквитин инкубировали с неочищенной фракцией II ретикулоцитов в отсутствие (незаштрихованные кружки) или присутствии (заштрихованные кружки) АТФ. Реакционную смесь разделяли посредством гель-хроматографии. Представлены результаты измерения радиоактивности каждой фракции. Как можно видеть, после добавления АТФ APF-1/убиквитин ковалентно связывается с одним или несколькими компонентами фракции II, которыми могут быть другие ферменты этой системы или его субстрат(ы) [39; с разрешения Proceedings of the National Academy of the USA].

Наиболее важным открытием, позволяющим продолжить исследования в этой области, является тот факт, что многочисленные субъединицы APF-1 ковалентно конъюгируют с субстратами-мишенями при инкубации в среде с фракцией II, причем для модификации требуется АТФ (рис. 3, 4) [39, 40]. Эта модификация обратима, а APF-1 можно удалить из смеси субстратов или продуктов их деградации [40].

Открытие того, что APF-1, ковалентно связанный с белковыми субстратами, стимулирует их протеолиз в присутствии АТФ и неочищенной фракции II, позволило разработать в 1980 г. модель, в соответствии которой модификация белкового субстрата под действием APF-1 превращает протеин в мишень для последующей деградации не известной в то время протеазой, не способной распознавать нативный субстрат, а APF-1 после разрушения белка высвобождается [40]. Результаты аминокис-

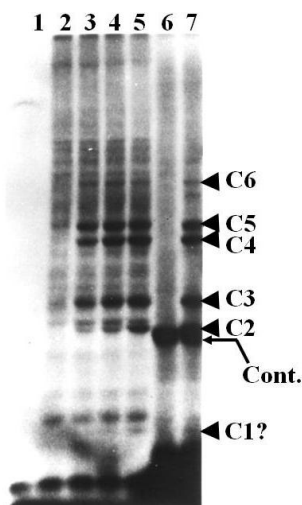


Рис. 4. Многочисленные молекулы APF-1/убиквитина конъюгируют с субстратами для протеолиза, что, возможно, служит сигналом для их деградации. С целью интерпретации данных, полученных в ходе эксперимента, который графически отображен на рис. 2, а также проверки гипотезы о способности APF-1 конъюгировать с субстратами-мишенями для протеолиза, ^{125}I -меченный APF-1/убиквитин инкубировали с неочищенной фракцией II (см. рис. 3 и пояснения в тексте) в отсутствие (1) или присутствии (2–5) АТФ и в отсутствии (1, 2) или присутствии (3–5) нарастающих концентраций немеченого лизоцима. Реакционные смеси, указанные в 6 и 7, инкубировали в отсутствие (6) или присутствии (7) АТФ; в состав этих смесей входили немеченый APF-1/убиквитин и ^{125}I -меченый лизоцим. C1–C6 обозначают специфические аддукты APF-1/убиквитина и лизоцима, в каждом из которых количество фрагментов APF-1/убиквитина, связанных с фрагментами лизоцима, возрастает от 1 до 6. Реакционные смеси разделяли посредством электрофореза в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфат натрия (SDS-PAGE), а визуализацию осуществляли путем наложения рентгеновской пленки (авторадиография) [40; с разрешения Proceedings of the National Academy of the USA].

лотного состава APF-1 в совокупности с данными по его молекулярной массе и прочими общими характеристиками заставили предположить, что APF-1 – это убиквитин [41], белок с ранее не известными ранее функциями. Позднее Wilkinson и соавт. подтвердили эту гипотезу [42]. Впервые убиквитин был описан как низкомолекулярный термоустойчивый белок с эволюционно высокостабильным строением (76 аминокислотных остатков). Он был очищен в ходе изоляции тимопоэтина [43]. Затем выяснилось, что он экспрессируется повсеместно всеми разновидностями живых клеток, в том числе прокариотами [44]. Исходно у убиквитина была обнаружена способность индуцировать дифференцировку лимфоцитов; это свойство относят за счет стимуляции аденилатциклазы [44, 45]. С учетом вышеизложенного белок получил название повсеместного иммунопоэтического полипептида (UBIP) [44]. Впрочем, последующими исследованиями было доказано, что убиквитин не участвует в иммунном ответе [46], а аденилатциклазную активность и способность индуцировать дифференцировку Т-лимфо-

цитов обладал загрязнивший белок эндотоксин. Более того, результаты секвенирования генома различных эубактерий и архебактерий и биохимического анализа этих микроорганизмов (неопубликованные данные) показали, что убиквитин экспрессируется только у эукариот. Обнаружение убиквитина у бактерий [44], скорее всего, было связано с контаминацией бактериальных экстрактов убиквитином дрожжей, источником которого служила среда для роста бактерий с экстрактом дрожжей. И хотя ретроспективно термин «убиквитин» оказался употребленным неправильно (поскольку этот белок имеется только в клетках эукариот, а следовательно, не является повсеместно распространенным, как считалось ранее), название все же прижилось. Возможно, члены номенклатурного комитета решили отдать дань традициям, ведь «убиквитин» был первым наименованием, данным указанному белку. В результате было принято решение продолжать обозначать вновь открываемые ферменты и звенья системы убиквитина, используя терминологию убиквитина.

Существенным достижением в изучении биологии убиквитина стало открытие, что его компоненты способны ковалентно конъюгировать с гистонами, в первую очередь с H2A и H2B. До последнего времени функция этих аддуктов оставалась неизвестной, хотя их структура была расшифрована еще в середине 1970 гг. Строение конъюгата убиквитина с H2A (uH2A, или протеина A24) было описано Goldknopf и Busch [47, 48] и Hunt и Dayhoff [49], которые установили, что белки взаимодействуют через вилкообразный разветвленный изопептид, который образует связь между С-концом глицина убиквитина (Gly76) и N-концом лизина гистона (Lys119). Предполагают, что изопептидная связь в аддукте гистона и убиквитина идентична связи между убиквитином и субстратом-мишенью протеолиза [50], а также между компонентами убиквитина полиубиквитиновой цепочки [51, 52], синтезируемой на субстрате и выполняющей функцию сигнала протеолиза для протеасомы 26S. Связь в полиубиквитиновой цепочке образуется между Gly76 одного компонента и Lys48 другого. Протеасома 26S распознает только цепочки убиквитина, основой которых является Lys48, поскольку они представляют собой сигнал протеолиза. В последние годы было продемонстрировано, что первый компонент убиквитина также может линейно присоединяться к N-концевому остатку субстрата-мишени протеолиза [53]. Прочие компоненты генерируют полиубиквитиновую цепочку на первой линейно конъюгированной субъединице. N-концевая убиквитинация необходима, чтобы превратить белки природного происхождения с небольшим содержанием лизина в мишени для деградации. Этому процессу также подвержены и некоторые лизин-содержащие белки, в частности, мышечный фактор транскрипции MyoD. По-видимому, у этих белков остатки лизина не доступны для действия родственных лигаз. Также описаны и другие разновидности полиубиквитиновых цепочек, которые не задействованы в конъюгации субстратов для протеолиза. Так, полиубиквитиновая цепочка на основе Lys63 необходима для активации различных транскрипционных факторов [54]. Роль моноубиквитинации гистонов также была раскрыта лишь недавно: эта модификация также вовлечена в регуляцию транскрипции, возможно, за счет модуляции структуры нуклеосом [55, 56].

Отождествление APF-1 с убиквитином и открытие высокоэнергетической изопептидной связи, аналогичной той, которая объединяет убиквитин с гистоном H2A и субстратом-мишенью для протеолиза, позволили ответить на вопрос, для чего именно затрачивается энергия в ходе внутриклеточного протеолиза, а также раскрыть комплексный механизм формирования изопептидной связи. Оказалось, что он очень схож с образованием пептидной связи. Эта реакция катализируется тРНК-синтетазой и индуцируется после активации аминокислот в процессе синтеза белка или нерибосомального синтеза коротких пептидов [57]. Ciechanover, Hershko и соавт. удалось выделить и очистить три фермента, участвующие в каскаде реакций конъюгации убиквитина. Этими ферментами оказались E1 (убиквитин-активирующий фермент), E2 (переносчик убиквитина) и E3 (убиквитин-протеинлигаза) [58, 59]. E3 представляет собой специфический субстрат-связывающий компонент, и этот факт служит ключом к решению проблемы варьирующей стабильности различных белков – они могут быть специфически распознаны лигазами и выступить в качестве их мишеней.

В течение короткого времени гипотеза о том, что убиквитин может служить своего рода «меткой смерти», получила неоспоримые доказательства. Так, Chin и соавт. ввели в клетки линии HeLa меченый убиквитин и гемоглобин, а затем денатурировали гемоглобин путем его окисления фенилгидразином. Они установили, что конъюгацию убиквитина с глобином значительно ускоряет денатурация гемоглобина, при этом концентрация конъюгатов глобина и убиквитина была пропорциональна скорости деградации гемоглобина [60]. Hershko и со-

авт. выявили аналогичную корреляцию, изучая аномальные короткоживущие пептиды, состоящие из аналогов аминокислот [61]. Finley, Ciechanover и Varshavsky обнаружили мутантные клетки, у которых остановился клеточный цикл. При достижении определенной температуры они лишаются аддуктов убиквитина с гистоном H2A [62], что позволяет защитить от разрушения термолabileльный компонент [63]. В результате такой тепловой инактивации у клеток теряется способность к деградации короткоживущих белков с нормальной структурой [64]. И хотя на основании представленных данных нельзя однозначно утверждать, что убиквитинация субстрата служит прямым сигналом деструкции, взаимосвязь между конъюгацией убиквитина и разрушением белка налицо. Единственным отсутствующим связующим звеном оставалась протеаза, которая специфически распознавала бы убиквитинированные субстраты. Tanaka и соавт. описали вторую стадию протеолиза в ретикулоцитах, которая требует энергии АТФ [65], а Hershko и соавт. продемонстрировали, что эта энергия расходуется на деградацию конъюгатов [66]. Важное открытие было сделано Nough и соавт.: им удалось частично очистить и охарактеризовать высокомолекулярную щелочную протеазу, которая опосредует разрушение аддуктов убиквитина и лизоцима (но не лизоцима без «метки» убиквитином) в АТФ-зависимым образом [67]. Эта протеаза, позднее названная 26S-протеасомой, обладала всеми необходимыми свойствами, чтобы считаться звеном специфического протеолиза системы убиквитина. Позднее это подтвердилось, и Waxman с соавт. дали описание этого фермента, который, в отличие от других известных науке протеаз, имел необычно большую длину – порядка 1,5 мДа [68].

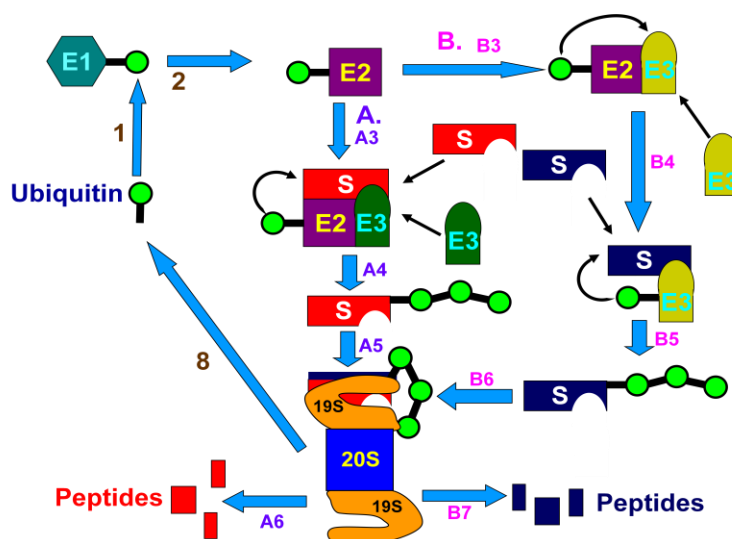


Рис. 5. Система убиквитина-протеасом. Убиквитин стимулируется под действием убиквитин-активирующего фермента E1 (1) и транспортируется к белку-переносчику убиквитина/убиквитин-конъюгирующему ферменту (UBC) E2 (2). E2 транспортирует активированные фрагменты убиквитина к белковому субстрату, который специфически связывается с уникальной убиквитин-лигазой E3 (A и B). В случае RING finger-лигаз этот трансфер осуществляется напрямую (A3). В результате конъюгации фрагментов убиквитина образуется полиубиквитиновая цепочка (A4), что служит сигналом для связывания (A5) 26S-протеасомы, которая расщепляет субстрат-мишень на пептиды (A6). В случае НЕСТ-доменных лигаз убиквитин генерирует на лигазе дополнительный промежуточный остаток тиолового эфира (B3), а лишь затем транспортируется по направлению к субстрату (B4). В результате конъюгации фрагментов убиквитина образуется полиубиквитиновая цепочка (B5), которая связывается с 26S-протеасомой (B6). Конечной этап этой реакции – расщепление белкового субстрата до пептидов (B7). Убиквитин, высвобождаемый под действием деубиквитирующих ферментов (DUB), может быть использован повторно [8].

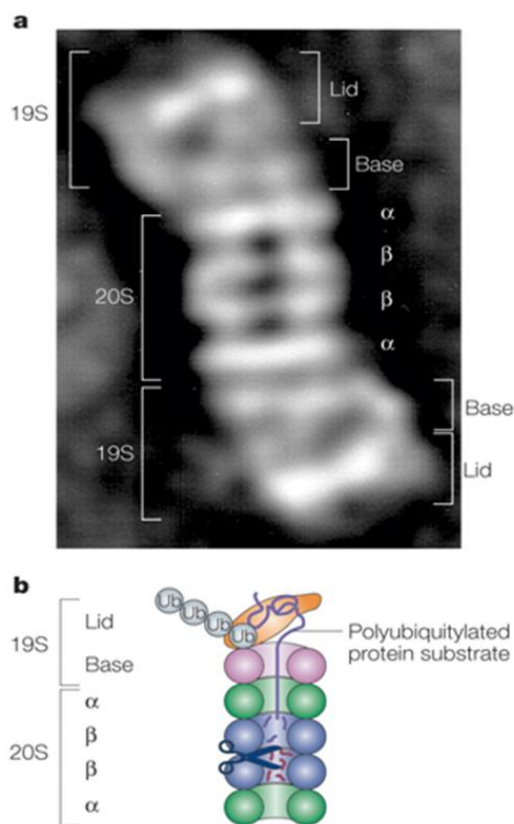


Рис. 6. Протеасома. Протеасома представляет собой крупномолекулярную 26S-мультикаталитическую протеазу, которая расщепляет полиубиквитинированные белки на мелкие пептиды. Она состоит из двух субкомплексов: каталитически активной коровой частицы 20S и регуляторной частицы 19S. Коровая частица 20S имеет бочкообразную форму и построена из четырех сложенных в стопку кольцевых структур – двух идентичных внешних α -колец и двух идентичных внутренних β -колец. У эукариот в состав каждого α - и β -кольца входят по 7 обособленных субъединиц, при сборке которых формируется общая структура комплекса 20S $\alpha 1$ -7 $\beta 1$ -7 $\beta 1$ -7 $\alpha 1$ -7. Каталитические сайты локализованы в β -субъединицах. С концами 20S ассоциированы 19S кэп-структуры, образованные 17 субъединицами: 9 в «основании» субкомплекса и 8 в «крышке». Одна из ключевых функций 19S – распознавание убиквитинированных белков и других потенциальных субстратов для протеасом. Идентифицировано несколько убиквитин-связывающих субъединиц 19S, хотя их биологическая роль и механизм действия по-прежнему остаются загадкой. Еще одна функция 19S заключается в открытии отверстия α -кольца, через которое субстраты проникают в протеолитическую полость. Свернутый белок не может проникнуть через узкое отверстие в протеолитический канал, поэтому было выдвинуто предположение, что частица 19S способствует разворачиванию субстрата и его прохождению через отверстие, образованное 20S. И раскрытие отверстия, и разворачивание субстрата требуют затрат метаболической энергии; и действительно, в «основании» 19S присутствуют 6 различных субъединиц АТФазы. В результате разрушения субстрата высвобождаются не только короткие пептиды, но и убиквитин, который может быть использован повторно [83; с разрешения Nature Publishing Group]. а. Электронная микрофотография 26S дрожжей *S. cerevisiae*. б. Схематическое изображение структуры и функций 26SA-протеасом.

Далее, было показано, что нейтральный комплекс 20S-протеазы, состоящий из нескольких субъединиц и меньший по размеру относительно комплекса 26S-протеазы, представляет собой не что иное, как мультикаталитический протеиназный комплекс (МСП) [69], который ранее был выделен Wilk и Orłowski из гипофиза телят [70]. 20S-протеаза функционирует независимо от АТФ и обладает различными вариантами каталитической активности, ассоциируемой с С-концами гидрофобных, основных и кислотных остатков. Nough и соавт. выдвинули предположение (хотя и не подтвердили его экспериментально), что 20S-протеаза является фрагментом более крупной 26S-протеазы, которая разрушает аддукты убиквитина [69].

В дальнейшем подтвердилось, что комплекс 20S действительно представляет собой каталитическое «ядро» комплекса 26S [71, 72]. Однако окончательные доказательства того, что активная «грибовидная» 26S-протеаза образуется при сборке двух различных субкомплексов – каталитического цилиндрического 20S МСП и фланкирующих шарообразных 19S-субкомплексов (которые предположительно несут регуляторные функции), – были получены только в начале 1990 гг. Hoffman и соавт. [73], которые смешали две очищенные частицы и получили активный 26S-фермент.

Протеасома представляет собой крупномолекулярную мультикаталитическую 26S-протеазу, которая расщепляет полиубиквитинированные белки на более мелкие пептиды. Она состоит из двух субкомплексов: каталитически активной коровой частицы 20S и регуляторной частицы 19S. Коровая частица 20S имеет бочкообразную форму и построена из четырех сложенных в стопку кольцевых структур – двух идентичных внешних α -колец и двух идентичных внутренних β -колец. У эукариот в состав каждого α - и β -кольца входят по 7 обособленных субъединиц, при сборке которых формируется общая структура комплекса 20S $\alpha 1$ -7 $\beta 1$ -7 $\beta 1$ -7 $\alpha 1$ -7. Каталитические сайты локализованы в β -субъединицах. С концами 20S ассоциированы 19S кэп-структуры, образованные 17 субъединицами: 9 в «основании» субкомплекса и 8 в «крышке». Одна из ключевых функций 19S – распознавание убиквитинированных белков и других потенциальных субстратов для протеасом. Идентифицировано несколько убиквитин-связывающих субъединиц 19S, хотя их биологическая роль и механизм действия по-прежнему остаются загадкой.

Еще одна функция 19S заключается в открытии отверстия α -кольца, через которое субстраты проникают в протеолитическую полость. Свернутый белок не может проникнуть через узкое отверстие в протеолитический канал, поэтому было выдвинуто предположение, что частица 19S способствует разворачиванию субстрата и его прохождению через отверстие, образованное 20S. И раскрытие отверстия, и разворачивание субстрата требуют затрат метаболической энергии; и действительно, в «основании» 19S присутствуют 6 различных субъединиц АТФазы. В результате разрушения субстрата высвобождаются не только короткие пептиды, но и убиквитин, который может быть использован повторно (убиквитин-зависимая система представлена на рис. 5, а структура 26S-протеасомы – на рис. 6).

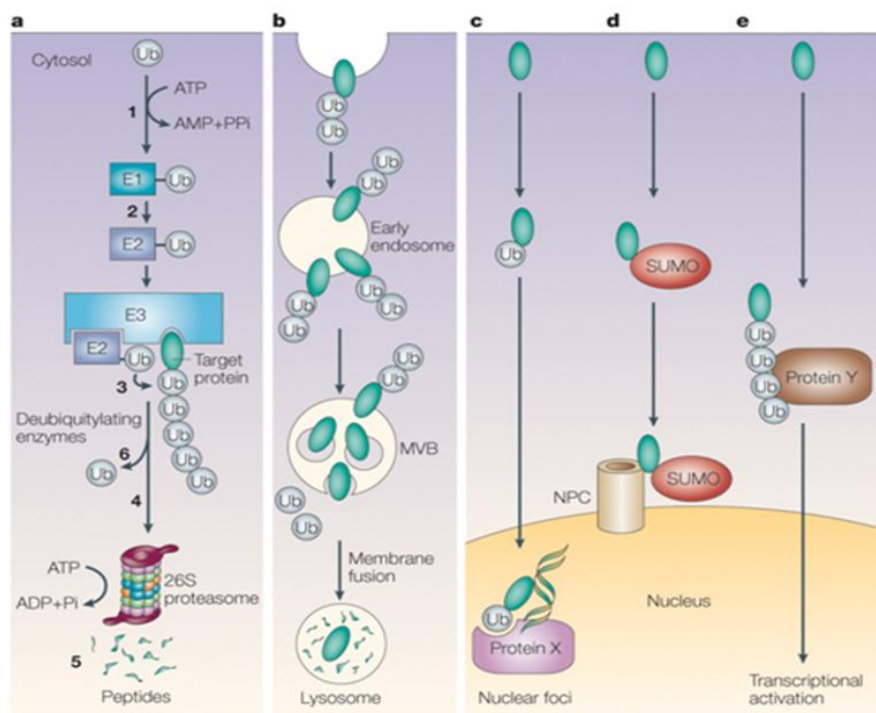


Рис. 7. Функциональные результаты модификации протеинов под действием убиквитина и убиквитин-подобных белков. **а)** Протеасомная деградация белков клетки (см. рис. 4). **б)** Моно- или олигоубиквитинизация мембранных белков-мишеней с их последующим разрушением в лизосомах/вакуолях. **в)** Моноубиквитинизация или **д)** одноразовая модификация под действием убиквитин-подобных белков (UBL), например, SUMO, превращает протеины в мишени для атаки на субклеточном уровне, например, ядерным поровым комплексом (NPC). Модификация под действием UBL может иметь и другие последствия, помимо протеолиза, например, она может способствовать защите белков от убиквитинации или активации комплексов E3. **е)** Образование полиубиквитиновой цепочки через Lys63 ведет к прямой или опосредованной (за счет привлечения других белков – на рисунке отображены как белок Y) активации транскрипционных факторов или киназ. Ub – убиквитин, K – остаток лизина, S – остаток цистеина [83; с разрешения Nature Publishing Group].

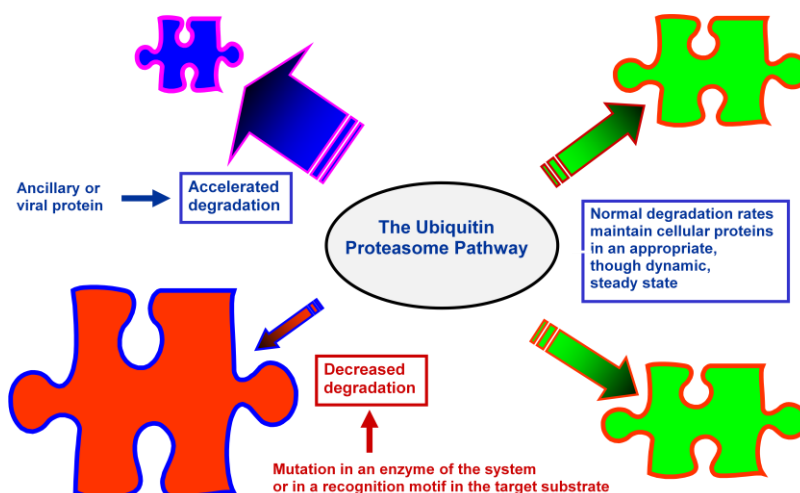


Рис. 8. Аберрации системы убиквитина-протеасом и патогенез заболеваний человека. В норме деградация клеточных белков происходит с постоянной скоростью, которая, впрочем, может изменяться в различных патофизиологических условиях (вверху и внизу справа). При усилении деградации белков вследствие повышения уровня E3 (например, для p27 этим ферментом служит Skp2) или гиперэкспрессии дополнительных белков, которые способствуют генерации комплекса с белковым субстратом и превращают его в мишень для деградации (онкопротеин E6 папилломавируса человека связывается с p53 и делает его мишенью для деградации E6-AP-лигазой; молекулы ГКГ I класса становятся мишенью для ERAD под действием ER-гликопротеинов цитомегаловируса US2 и US11), стационарная скорость разрушения белков снижается (вверху слева). Мутации убиквитин-лигазы (при аденоматозном полипозе толстой кишки), E6-AP (при синдроме Ангельмана) или мотива распознавания субстрата (β-катенина или ENAC) ведет к замедлению процессов деградации белков и избыточному накоплению субстрата-мишени.

Заключение

Трансформация представлений о протеолизе как одном из ключевых регулируемых универсальных процессов служит наглядным примером эволюции биологической концепции в современной науке, и было выдержано немало противостояний, прежде чем общепризнанные ранее парадигмы претерпели существенные изменения. Эта история развивалась на протяжении пяти десятилетий – с начала 1940 гг. до начала 1990 гг., и начиналась с горячих дискуссий относительно того, в каком состоянии пребывают внутриклеточные белки, т. е. статичны ли они (так считалось традиционно) или же претерпевают постоянное обновление. За доказательством того, что белки динамичны, последовало открытие лизосом, которые, как полагали в период с середины 1950 гг. до середины 1970 гг., служат органеллами, предназначенными для деградации внутриклеточных белков. Данные, полученные в серии независимых экспериментов, последовательно опровергли гипотезу о лизосомах и позволили сформулировать новую концепцию, согласно которой регулируемая деградация внутриклеточных белков опосредована каким-то иным, нелизосомальным механизмом. В конце 1970 – начале 1980 гг. была открыта убиквитин-зависимая система протеолиза. Что интересно, убиквитин-подобные белки задействованы и в лизосомальной деградации, в частности, на этапе образования аутофагосом и трассировки пузырьков в лизосомы; также одним из звеньев этого процесса является убиквитинация субстратов-мишеней. Наряду с фосфорилированием реакции убиквитинации рассматриваются как механизм образования на белках-мишенях элементов, которые распознаются и связываются эффекторами. Так, в случае генерации полиубиквитиновых цепочек через остаток Lys48 связывающим эффектором служит 26S-протеасома, которая разрушает меченные убиквитином белки. В других ситуациях модификации различного рода служат стадиями протеолитических (лизосомальных) и не-протеолитических процессов, таких как трассировка белков в субклеточные отсеки. К счастью, еще на заре наших исследований мы смогли провести четкую грань между лизосомальным и нелизосомальным протеолизом, еще не зная того, что оба эти процесса взаимосвязаны между собой и опосредованы аналогичными реакциями модификации белков. Если бы это было известно нам уже тогда, наша работа значительно усложнилась бы.

Благодаря открытию реакций и ферментов, участвующих в каскаде убиквитина-протеасом, в конце 1980 – начале 1990 гг. началась новая эра изучения процессов деградации белка. В частности, были запущены исследования, в ходе которых было показано, что мишенью указанной системы служат многие ключевые регуляторные белки, такие как регулируемые светом белки растений, факторы транскрипции, регуляторы клеточного цикла, супрессоры и промотеры опухолевого роста [74–78]. За ними последовали другие эксперименты, посвященные раскрытию механизмов деградации специфических белков, каждый из которых уникальным образом распознается и регулируется. Расшифровка человеческого генома помогла выявить сотни различных вариантов E3, что свидетельствовало о сложности, высокой специфичности и селективности системы убиквитина. Следующим ша-

гом стало открытие, во-первых, непротеолитических свойств убиквитина, таких как способность активировать транскрипцию и трассировку белков в вакуоли, а во-вторых, реакций модификации убиквитин-подобных белков, которые также вовлечены в реализацию непротеолитических функций – трассировки белков в субклеточные отсеки, защиты белков от убиквитинации, регуляции процессов аутофагии (рис. 7) [79]. Результаты всех этих исследований дали возможность установить, что такой способ ковалентного связывания – убиквитинация – играет роль ключевого регулятора широкого спектра клеточных событий (клеточного цикла, деления клеток, их роста и дифференцировки, активации и подавления транскрипции, апоптоза, иммунного и воспалительного ответа, передачи сигнала, рецептор-опосредованного эндоцитоза, метаболических реакций) через протеолитические и непротеолитические механизмы. И наконец, открытие того, что реакции убиквитинации, опосредованные специфическими и уникальными убиквитин-подобными белками, задействованы в трассировке белков в лизосомы/вакуоли и контролируют аутофагию, завершило исторический цикл, поскольку это открытие свидетельствовало о тесной взаимосвязи между системой убиквитина и лизосомальным каскадом. Мишенями убиквитина служат многочисленные процессы и субстраты, поэтому нет ничего удивительного в том, что абerrации системы убиквитина прямым или косвенным образом вовлечены в патогенез целого ряда заболеваний. Инактивация главного фермента этой системы, E1, влечет за собой гибель клетки, а мутации ферментов или распознающих мотивов субстратов, затрагивающие ее жизнедеятельность лишь частично, ведут к появлению самых разных вариантов фенотипов. Аналогичные явления происходят и в случае приобретенных изменений активности описываемой системы. Патологические состояния, ассоциированные с системой убиквитина, можно классифицировать по двум группам: (1) возникающие вследствие потери функций/мутаций ферментов системы убиквитина или распознающих мотивов субстратов-мишеней, что обуславливает аномальную стабильность отдельных белков; (2) возникающие вследствие активации функций ферментов системы убиквитина, из-за чего белковые мишени разрушаются аномально быстрее (рис. 8). Исследования, цель которых состоит в изучении последствий инактивации генов, кодирующих структуру специфических ферментов системы убиквитина и их субстратов, помогут сформировать более систематизированные представления о широком спектре патологических процессов, развивающихся на фоне возникновения абerrаций убиквитин-зависимого протеолиза. Описание компонентов этой системы и раскрытие механизмов деградации ключевых регуляторных белков позволяет начать разработку лекарственных препаратов с патогенетической направленностью действия, мишенями для которых будут только специфические белки. Первый из препаратов этой серии, специфический ингибитор протеасомы, уже вышел на фармацевтический рынок [80]. Мы вступаем в эру создания лекарственных средств нового поколения с совершенно иным принципом действия. В частности, уже сейчас мы способны ингибировать активность абerrантных Mdm2 и E6-AP супрессора опухолевого роста p53, восстанавливая тем самым его функции.

По различным аспекты работы убиквитин-зависимой системы опубликовано множество работ [81, 82]. Цель этой статьи заключалась в том, чтобы сформировать у читателя представление об эволюции концепции убиквитина. Отдельные фрагменты работы, в том числе некоторые рисунки, были опубликованы ранее [83].

Благодарности

Исследовательская работа в лаборатории Aaron Ciechanover поддержана грантами следующих лиц и организаций: Dr. Miriam and Sheldon G. Adelson Medical Research Foundation (AMRF), the Israel Science Foundation (ISF), the German-Israeli Foundation (GIF) for Scientific Research and Development, an Israel Cancer Research Fund (ICRF) USA Professorship, the Deutsche-Israeli Cooperation Program (DIP), and the Rubicon European Union (EU) Network of Excellence. Статья публикуется с разрешения Нобелевского комитета[©]. Статья основана на результатах, представленных автором в Нобелевской лекции в Стокгольме в декабре 2004 г. Оригинал опубликован: Ciechanover, A. (2005). *Les Prix Nobel. The Nobel Foundation, Stockholm, Sweden. pp. 151-175.*

Литература

- Clarke H.T. "Impressions of an organic chemist in biochemistry." *Annu Rev Biochem* **27**: 1–14, 1958.
- Kennedy E.P. "Hitler's gift and the era of biosynthesis." *J Biol Chem* **276**: 42619–42631, 2001.
- Simoni R.D., Hill R.L., Vaughan M. "The use of isotope tracers to study intermediary metabolism: Rudolf Schoenheimer." *J Biol Chem* **277** (43): e1-e3 (available on-line at: <http://www.jbc.org>, 2002.
- Schoenheimer R., Ratner S., Rittenberg D. "Studies in protein metabolism: VII. The metabolism of tyrosine." *J Biol Chem* **127**: 333–344, 1939.
- Ratner S., Rittenberg D., Keston A.S., Schoenheimer R. "Studies in protein metabolism: XIV. The chemical interaction of dietary glycine and body proteins in rats." *J. Biol Chem* **134**: 665–676, 1940.
- Schoenheimer R. "The Dynamic State of Body Constituents" (Cambridge, Massachusetts, USA: Harvard University Press) 1942.
- Hogness D.S., Cohn M., Monod J. "Studies on the induced synthesis of β -galactosidase in *Escherichia coli*: The kinetics and mechanism of sulfur incorporation." *Biochim Biophys Acta* **16**: 99–116, 1955.
- de Duve C., Gianetto R., Appelmans F., Wattiaux R. "Enzymic content of the mitochondria fraction." *Nature (London)* **172**: 1143–1144, 1953.
- Gianetto R., de Duve C. "Tissue fractionation studies 4. Comparative study of the binding of acid phosphatase, β -glucuronidase and cathepsin by rat liver particles." *Biochem J* **59**: 433–438, 1955.
- Simpson M.V. "The release of labeled amino acids from proteins in liver slices." *J Biol Chem* **201**: 143–154, 1953.
- Mortimore, G.E., Poso A.R. "Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply." *Annu Rev Nutr* **7**: 539–564, 1987.
- Ashford T.P., Porter K.R. "Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes." *J Cell Biol* **12**: 198–202, 1962.
- Schimke R.T., Doyle D. "Control of enzyme levels in animal tissues." *Annual Rev Biochem.* **39**: 929–976 1970.
- Goldberg A.L., St. John A.C. "Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2" *Annu Rev Biochem.* **45**: 747–803, 1976.
- Segal H.L., Winkler J.R., Miyagi M.P. "Relationship between degradation rates of proteins *in vivo* and their susceptibility to lysosomal proteases." *J Biol Chem* **249**: 6364–6365, 1974.
- Haider M., Segal H.L. "Some characteristics of the alanine-aminotransferase and arginase-inactivating system of lysosomes." *Arch Biochem Biophys* **148**: 228–237, 1972.
- Dean R.T. "Lysosomes and protein degradation." *Acta Biol Med Ger* **36**: 1815–1820, 1977.
- Müller M., Müller H., Holzer H. "Immunochemical studies on catabolite inactivation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem.* **256**: 723–727, 1981.
- Holzer H. "Proteolytic catabolite inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Revis Biol Celular* **21**: 305–319, 1989.
- Majeski A.E., Dice F. "Mechanisms of chaperone-mediated autophagy." *Intl J Biochem Cell Biol* **36**: 2435–2444, 2004.
- Cuervo A.M., Dice J.F. "Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases." *J Mol Med* **76**: 6–12, 1998.
- Hayashi M., Hiroi Y., Natori Y. "Effect of ATP on protein degradation in rat liver lysosomes." *Nature New Biol* **242**: 163–166, 1973.
- Schneider D.L. "ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes: Evidence for an ATP-driven proton pump." *J Biol Chem* **256**: 3858–3864, 1981.
- de Duve C., Wattiaux R. "Functions of lysosomes." *Annu. Rev. Physiol.* **28**: 435–492, 1966.
- Rabinovitz M., Fisher J.M. "Characteristics of the inhibition of hemoglobin synthesis in rabbit reticulocytes by threo- α -amino- β -chlorobutyric acid." *Biochim Biophys Acta* **91**: 313–322, 1964.
- Carrell R.W., Lehmann H. "The unstable haemoglobin haemolytic anaemias." *Semin Hematol* **6**: 116–132, 1969.
- Huehns E.R., Bellingham A.J. "Diseases of function and stability of haemoglobin." *Br J Haematol* **17**: 1–10, 1969.
- Etlinger J.D., Goldberg A.L. "A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes." *Proc Nat. Acad Sci USA* **74**: 54–58, 1977.
- Hershko A., Heller H., Ganoh D., Ciechanover A. "Mode of degradation of abnormal globin chains in rabbit reticulocytes." In: *Protein Turnover and Lysosome Function* (Eds.: H.L. Segal, D.J. Doyle) (Academic Press: New York) pp. 149–169, 1978.
- Knowles S.E., Ballard J. "Selective control of the degradation of normal and aberrant proteins in Reuber H35 hepatoma cells." *Biochem J* **156**: 609–617, 1976.
- Neff N.T., DeMartino G.N., Goldberg A.L. "The effect of protease inhibitors and decreased temperature on the degradation of different classes of proteins in cultured hepatocytes." *J Cell Physiol.* **101**: 439–457, 1979.
- Poole B., Ohkuma S., Warburton M.J. "The accumulation of weakly basic substances in lysosomes and the inhibition of intracellular protein degradation." *Acta Biol Med Germ* **36**: 1777–1788, 1977.
- Poole B., Ohkuma S., Warburton M.J. "Some aspects of the intracellular breakdown of exogenous and endogenous proteins." In: *Protein Turnover and Lysosome Function* (Eds.: H.L. Segal, D.J. Doyle) (Academic Press: New York) pp. 43–58, 1978.
- Mandelstam J. "Turnover of protein in growing and non-growing populations of *Escherichia coli*." *Biochem J* **69**: 110–119, 1958.
- Steinberg D., Vaughan M. "Observations on intracellular protein catabolism studied *in vitro*." *Arch Biochem Biophys* **65**: 93–105, 1956.
- Hershko A., Tomkins G.M. "Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture: Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence." *J Biol Chem* **246**: 710–714, 1971.
- Goldberg A.L., Kowit J.D., Etlinger J.D. "Studies on the selectivity and mechanisms of intracellular protein degradation." In: *Proteolysis and physiological regulation* (Eds.: D.W. Ribbons, K. Brew) (Academic Press: New York) pp. 313–337, 1976.
- Ciechanover A., Hod, Y., Hershko, A. "A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **81**: 1100–1105, 1978.

39. Ciechanover A., Heller H., Elias S., Haas A.L., Hershko A. "ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation." *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1365–1368, 1980.
40. Hershko A., Ciechanover A., Heller H., Haas A.L., Rose I.A. "Proposed role of ATP in protein breakdown: Conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis." *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1783–1786, 1980.
41. Ciechanover A., Elias S., Heller H., Ferber S., Hershko A. "Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes." *J Biol Chem* **255**: 7525–7528, 1980.
42. Wilkinson K.D., Urban M.K., Haas A.L. "Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes." *J Biol Chem* **255**: 7529–7532, 1980.
43. Goldstein G. "Isolation of bovine thymosin, a polypeptide hormone of the thymus." *Nature (London)* **247**: 11–14, 1974.
44. Goldstein G., Scheid M., Hammerling U., Schlesinger D.H., Niall H.D., Boyse E.A. "Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells." *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 11–15, 1975.
45. Schlesinger D.H., Goldstein G., Niall H.D. "The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells." *Biochemistry* **14**: 2214–2218, 1975.
46. Low T.L.K., Goldstein A.L. "The chemistry and biology of thymosin: amino acid analysis of thymosin α 1 and polypeptide β 1." *J Biol Chem* **254**: 987–995, 1979.
47. Goldknopf I.L., Busch H. "Remarkable similarities of peptide fingerprints of histone 2A and non-histone chromosomal protein A24." *Biochem Biophys Res Commun* **65**: 951–955, 1975.
48. Goldknopf I.L., Busch H. "Isopeptide linkage between non-histone and histone 2A polypeptides of chromosome conjugate-protein A24." *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 864–868, 1977.
49. Hunt L.T., Dayhoff M.O. "Amino-terminal sequence identity of ubiquitin and the non-histone component of nuclear protein A24." *Biochim Biophys Res Commun* **74**: 650–655, 1977.
50. Hershko A., Ciechanover A., Rose I.A. "Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown." *J Biol Chem* **256**: 1525–1528, 1981.
51. Hershko A., Heller H. "Occurrence of a polyubiquitin structure in ubiquitin-protein conjugates." *Biochem Biophys Res Commun* **128**: 1079–1086, 1985.
52. Chau V., Tobias J.W., Bachmair A., Mariott D., Ecker D., Gonda D.K., Varshavsky A. "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." *Science* **243**: 1576–1583, 1989.
53. Ciechanover A., Ben-Saadon R. "N-terminal ubiquitination: More protein substrates join in." *Trends Cell Biol* **14**: 103–106, 2004.
54. Muratani M., Tansey W.P. "How the ubiquitin-proteasome system controls transcription." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 192–201, 2003.
55. Zhang Y. "Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination." *Genes & Dev* **17**: 2733–2740, 2003.
56. Osley M.A. "H2B ubiquitylation: the end is in sight." *Biochim Biophys Acta* **1677**: 74–78, 2004.
57. Lipman F. "Attempts to map a process evolution of peptide biosynthesis." *Science* **173**: 875–884, 1971.
58. Ciechanover A., Elias S., Heller H., Hershko A. "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme." *J Biol Chem* **257**: 2537–2542, 1982.
59. Hershko A., Heller H., Elias S., Ciechanover A. "Components of ubiquitin-protein ligase system: Resolution, affinity purification and role in protein breakdown." *J Biol Chem* **258**: 8206–8214 (1983).
60. Chin D.T., Kuehl L., and Rechsteiner M. Conjugation of ubiquitin to denatured hemoglobin is proportional to the rate of hemoglobin degradation in HeLa cells." *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 5857–5861, 1982.
61. Hershko A., Eytan E., Ciechanover A., Haas A.L. "Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells: relationship to the breakdown of abnormal proteins." *J Biol Chem* **257**: 13964–13970, 1982.
62. Matsumoto Y., Yasuda H., Marunouchi T., Yamada M. "Decrease in uH2A (protein A24) of a mouse temperature-sensitive mutant." *FEBS Lett* **151**: 139–142, 1983.
63. Finley D., Ciechanover A., Varshavsky A. "Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85." *Cell* **37**: 43–55, 1984.
64. Ciechanover A., Finley D., Varshavsky A. "Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85." *Cell* **37**: 57–66, 1984.
65. Tanaka K., Waxman L., Goldberg A.L. "ATP serves two distinct roles in protein degradation in reticulocytes, one requiring and one independent of ATP." *J Cell Biol* **96**: 1580–1585, 1983.
66. Hershko A., Leshinsky E., Ganoth D., Heller H. "ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates." *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1619–1623, 1984.
67. Hough R., Pratt G., Rechsteiner M. "Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates." *J Biol Chem* **261**: 2400–2408, 1986.
68. Waxman L., Fagan J., Goldberg A.L. "Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates." *J Biol Chem* **262**: 2451–2457, 1987.
69. Hough R., Pratt G., Rechsteiner M. "Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate." *J Biol Chem* **262**: 8303–8313, 1987.
70. Wilk S., Orlowski M. "Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme." *J Neurochem* **35**: 1172–1182, 1980.
71. Eytan E., Ganoth D., Armon T., Hershko A. "ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin." *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7751–7755, 1989.
72. Driscoll J., Goldberg A.L. "The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1.500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins." *J Biol Chem* **265**: 4789–4792, 1990.
73. Hoffman L., Pratt G., Rechsteiner M. "Multiple forms of the 20S multicatalytic and the 26S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate." *J Biol Chem* **267**: 22362–22368, 1992.
74. Shanklin J., Jaben M., Vierstra R.D. "Red light-induced formation of ubiquitin-phytochrome conjugates: Identification of possible intermediates of phytochrome degradation." *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 359–363, 1987.
75. Hochstrasser M., Varshavsky A. "In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast α 2 repressor." *Cell* **61**: 697–708, 1990.
76. Scheffner M., Werness B.A., Huibregtse J.M., Levine A.J., Howley P.M. "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." *Cell* **63**: 1129–1136, 1990.
77. Glotzer M., Murray A.W., Kirschner M.W. "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." *Nature* **349**: 132–138, 1991.
78. Ciechanover A., DiGiuseppe J.A., Bercovich B., Orian A., Richter J.D., Schwartz A.L., Brodeur G.M. "Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system in vitro." *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 139–143, 1991.
79. Mizushima N., Noda T., Yoshimori T., Tanaka Y., Ishii T., George M.D., Klionsky D.J., Ohsumi M., Ohsumi Y. "A protein conjugation system essential for autophagy." *Nature* **395**: 395–398, 1998.
80. Adams J. "Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer." *Drug Discov Today* **8**: 307–315, 2002.
81. Glickman M.H., Ciechanover A. "The ubiquitin-proteasome pathway: Destruction for the sake of construction." *Physiological Reviews* **82**: 373–428, 2003.
82. Pickart C.M., Cohen R.E. "Proteasomes and their kin: proteases in the machine age." *Nature Rev Mol Cell Biol* **5**: 177–187, 2004.
83. Ciechanover A. "From the lysosome to ubiquitin and the proteasome." *Nature Rev Mol Cell Biol* **6**: 79–86, 2005.



ПОСЛЕСЛОВИЕ

В сентябре 2011 года в Москве, в Центре международной торговли под эгидой Всемирной организации по иммунопатологии (World Immunopathology Organization, WIPO) и Союза аллергологов и иммунологов СНГ проходил VI Всемирный конгресс по иммунопатологии и респираторной аллергии. От имени Всемирной организации по иммунопатологии я пригласил для участия в этом конгрессе лауреата Нобелевской премии профессора Aaron Ciechanover из Технологического университета Хайфы в Израиле, с которым у меня сложились многолетние научные и дружеские контакты.

Он любезно принял наше приглашение и 16 октября 2011 года выступил с актовой лекцией «Протеолитическая система убиквитина: от фундаментальных основ до факторов патогенеза заболеваний человека и мишеней для разработки лекарственных препаратов» на открытии конгресса.

После лекции я спросил профессора Aaron Ciechanover, не согласится ли он прислать свою лекцию на конгрессе в виде статьи для публикации в нашем журнале? Он любезно откликнулся на эту просьбу и прислал статью, русский перевод которой мы представили читателям «Вестника Союза физиологических обществ стран СНГ». Надеюсь, что данная публикация вызовет большой интерес читателей журнала.

После актовой лекции профессору Aaron Ciechanover был вручен диплом почетного члена Всемирной организации по иммунопатологии с мантией. Момент вручения диплома и мантии запечатлен на представленной фотографии.

В заключение необходимо отметить, что традиция участия лауреатов Нобелевских премий в организуемых нами научных конгрессах берет начало с 2001 года, когда по моему приглашению в Москву приехал лауреат Нобелевской премии профессор Rolf Zinkernagel из Швейцарии, который и был первым в истории Нобелевским лауреатом в области физиологии или медицины, посетившим Россию и СССР. Профессор Rolf Zinkernagel выступил с актовой лекцией на открытии Всемирного конгресса по иммунопатологии и Съезда аллергологов и иммунологов СНГ в Большом театре 9 сентября 2001 года.

Надеюсь, что традиция участия Нобелевских лауреатов в научных форумах, проводимых в России, будет продолжена.

Кроме того, в этом номере журнала представлены две мои статьи о лауреатах Нобелевской премии 2012 года в области физиологии или медицины, а также в области химии. Полагаю, что обе эти публикации заинтересуют читателей журнала.

Р.И. СЕПИАШВИЛИ