

Для корреспонденции

Мартынова Елена Александровна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории обмена веществ и энергии ГУ НИИ питания РАМН
Адрес: 109240, г. Москва, Устьинский пр-д, д. 2/14
Телефон: (495) 698-53-71

Е.А. Мартынова, М.М. Гаппаров

Энергозависимый протеолиз и регуляция обмена белка

ГУ НИИ питания РАМН, Москва

Энергозависимый протеолиз – это неотъемлемая часть обмена белка в клетке. Протеолиз необходим для посттрансляционного контроля качества сборки белков, поддержания структурной и функциональной активности клеток. Деградация белков осуществляется несколькими протеолитическими системами, в том числе АТФ-зависимыми 26S протеасомами. Скорость обновления белков в клетке регулируется характером питания. Изменение уровня белка или аминокислотного состава рациона, голодание, токсины пищи влияют на рецепторы клеток, сигнальные пути, факторы транскрипции и экспрессию генов, регулирующих ответ клетки на метаболический стресс. Активность многих АТФ-зависимых протеаз определяется поступлением пищевых веществ в организм. Образующиеся в результате протеолиза свободные внутриклеточные пептиды регулируют белковые взаимодействия и метаболические пути в клетке.

Energe-proteolysis and regulation of proten metabolism

E.A. Martinova, M.M. Gapparov

Energy- proteolysis is the integral part of cell protein turnover. Proteolysis controls the quality of protein post-translational modification, folding as well as the structural and functional cell activities. Several proteolytic systems including 26S proteasomes participate in the cell protein degradation. Human diet regulates the rate of protein turnover. Total protein level, amino acid composition, fasting, toxins, etc. modify the receptor expression, signal transduction, factor transcription activity and expression of genes to regulate the cellular response in metabolic stress. Activities of some ATPases are dependent on the nutritional factors. Free amino acid peptides released from proteasomes may control the protein – protein interaction and cellular metabolic pathways.

В 1979 г. А. Hershko, А. Ciechanover, I. Rose заявили об открытии новой АТФ-зависимой протеолитической системы, не сопряженной с лизосомальным протеолизом и не идентичной известным АТФ-зависимым протеазам [27, 28]. Был обнаружен полипептид, названный авторами APF-1, ответственный за формирование высокомолекулярных конъюгатов с белками-мишенями [11]. Теперь он известен как убиквитин – представитель семейства белков, которые посттрансляционно модифицируют внутриклеточные протеины и изменяет их локализацию в клетке. В 2000 г. это открытие было отмечено Нобелевской премией в области медицины. В настоящее время АТФ-зависимый протеолиз рассматривается как неотъемлемая часть обмена клеточного белка.

Обмен белка – фундаментальный биологический процесс, поддерживающий гомеостаз организма. Скорость обновления белков в клетке зависит от характера питания [1]. В организме пищевые факторы влияют на метаболизм печени, откуда сигналы передаются в другие органы и ткани. При изменении внутренней среды организма нарушается экспрессия генов, регулирующих ферменты, участвующие в процессе обмена белка [5].

Протеолиз необходим для посттрансляционного контроля качества сборки белков и поддержания структурной и функциональной активности клеток. Деградация белков осуществляется несколькими протеолитическими системами, в том числе АТФ-зависимыми протеазами. У млекопитающих – это 26S протеасомы, которые обнаружены во всех компартментах клетки, включая цитоплазму, митохондрии и яд-

ро. 26S протеасомы расщепляют прежде всего дефектные и сигнальные белки. Другие АТФ-зависимые протеазы выполняют иные специализированные функции. Например, энергетический гомеостаз клетки контролирует 5'-сАМФ-активированная протеинкиназа АМРК. При ее активации в ответ на снижение уровня АТФ происходит переключение сигнальных путей в сторону катаболизма и выключение АТФ-зависимых метаболических путей. Действие фермента АМРК временно и зависит от скорости поступления пищевых веществ в организм и их объема [16]. Образующиеся в результате деятельности протеаз свободные внутриклеточные пептиды регулируют белковые взаимодействия в клетке, факторы транскрипции и зависимость от них гены [15].

Обмен белка как отражение адаптации организма

Обмен белка характеризует жизнь. Он необходим для поддержания массы тела и сохранения постоянства внутренней среды организма. У взрослого человека массой тела 70 кг ежедневно обновляется около 280 г белка [20]. Содержание белка в организме определяется относительной скоростью синтеза и деградации, которые в норме находятся в подвижном равновесии. Обмен определенных пулов белка регулируется активацией сигнальных путей, вхождением клетки в клеточный цикл, стрессом [24].

Скорость адсорбции аминокислот (АК) из пищевых белков в желудочно-кишечном тракте равна 1,3–10 г в час, а расчетный уровень необходимого потребления белка для человека составляет 0,8 г на 1 кг массы тела в день (без учета затрат белка на энергетические процессы, протекающие в организме). Максимальный уровень потребления белка человеком не должен превышать 25% от энергетической ценности рациона и 2–2,5 г на 1 кг массы тела в день (при массе тела 80 кг это составляет 176 г белка в день, а теоретически максимум равен 285–265 г белка в день). При употреблении 200–400 г белка, или более 35% от общей энергетической ценности пищи, адсорбция превышает 5 г/кг, что выше возможности печени метаболизировать белок и конвертировать азот в мочевины. Это ведет к повышению в крови уровня аммиака и АК, а также к гиперинсулинемии и другим метаболическим нарушениям [6].

Резкое уменьшение калорийности суточного рациона повышает экспрессию ряда генов. Полное голодание приводит к накоплению реактивных метаболитов кислорода, которые активируют специфические факторы транскрипции и зависимые от них гены [41]. Индивидуальные генетические вариации и экспрессия отдельных аллелей генов определяют уровень утилизации пищевых веществ [49]. Факторы питания регулируют экспрессию генов цитохромов, элиминирующих патогены химической и

Сокращения, принятые в статье

AAA-белки – АТФазы, ассоциированные с другими клеточными активностями
5'-сАМФ – циклический аденозинмонофосфат
АМРК-5'-сАМФ – активированная протеинкиназа
АМФ – циклический аденозинмонофосфат
АТФ6 – короткоживущий трансмембранный гликопротеин – предшественник транскрипционного активатора стрессиндуцибельных генов
CHIP – белок, выполняющий функцию ко-шаперона и убиквитинлигазы E3
CHOP – белок, вторичный мессенджер сигнального пути инсулина
cdk – циклинзависимая киназа
Cip (Kip) – семейство ингибиторов циклинзависимых киназ
c-myc – протоонкоген
E1 – убиквитинактивирующий фермент
E2, E3 – убиквитинпротеинлигазы
2 E1, 4A – цитохромы
E12, E47 – продукты сплайсинга гена E2A
E-2F – семейство факторов транскрипции, регулирующих клеточный цикл
Elf4 – миелоидный Elf1-подобный фактор человека
elf2α – фактор транскрипции
FAT-10 – малый убиквитинподобный белок
FOXO – семейство белков – транскрипционных регуляторов, контролирующих клеточный цикл, репарацию ДНК, окислительный стресс и апоптоз
GABA – нейротрансмиттер гипоталамуса
GPI – гликозилфосфатидилинозитол
GTP – гуанозин-5-трифосфат
Hap1 – нейротрансмиттер гипоталамуса
Hif1 α – фактор гипоксии
HSP70 – белок теплового шока с M70
Id1 – ингибитор фактора транскрипции MyoD
IκB α – ингибиторная единица ядерного фактора транскрипции NF-κB
IGFBP-1 – белок – вторичный мессенджер сигнального пути инсулина
IFN- γ, β – интерферон гамма, бета
Ink-4 – семейство ингибиторов циклинзависимых киназ
IRF-1 – фактор транскрипции семейства IRF
JNK – киназа MAPK-киназного пути
Lys⁴⁸ – лизин в положении 48 аминокислотной цепи
MAPK – митогенактивированная протеиназа
NEDD8 – убиквитинподобный белок
NEDD4L – убиквитинлигаза
NF-κB – ядерный фактор транскрипции
Nrf-2 – фактор транскрипции, основной регулятор генов, кодирующих антиоксидантные белки в ответ на стресс
p38 – киназа сигнального пути MAPK-киназ
p27^{Kip1} – ингибитор киназной активности комплексов циклин/циклинзависимая киназа, контролирующая пролиферацию клеток
PA 26 – активатор, ассоциируемый с 19S субкомплексом протеасомы
PEST – сигнальная последовательность белка-мишени, состоящая из остатков пролина (P), глутаминовой кислоты (E), серина (S) и треонина (T)
PPAR-α, -δ, -γ – ядерные рецепторы (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)
pVHL – белок – рецептор фактора гипоксии Hif-1α
Rb – белок гена ретинобластомы – регулятор клеточного цикла
Rab – семейство белков, участвующих в мембранном движении
Rpn11 – деубиквитинирующий фермент
Sec 61 – транслоконы, которые действуют как каналы для переброски насцентных белков в эндоплазматический ретикулум
SRH – фрагмент белка, строение и локализация которого определяют его принадлежность к определенному семейству внутри суперсемейства AAA-белков
26S – протеасома – АТФ-зависимый мультикаталитический протеазный комплекс
SUMO – убиквитинподобный белок
19 S – регуляторный субкомплекс 26S протеасомы
TNFα – фактор некроза опухоли α
TRAF2 – TNF-рецепторассоциированный фактор
Ubp6, Ubp4 – деубиквитинирующие ферменты
UDP – убиквитинподобные домены
UPR – ответ клетки на белки с нарушением фолдинга

биологической природы. Экспрессия генов цитохромов 2E1 и 4A повышается при значительном избытке жира в диете, что сопряжено с накоплением в организме липидных радикалов и развитием в нем ряда метаболических синдромов [42].

У взрослого человека в ответ на ограничение белка в рационе снижается окисление разветвленных АК и активируется гидролаза, лимитирующая скорость их катаболизма [47]. При снижении в рационе человека уровня АК и глюкозы экспрессия гена аспарагинсинтазы в организме повышается [60]. В свою очередь, глутамин регулирует в энтероцитах уровень ретинолсвязывающего белка, орнитинаминотрансферазы, аполипопротеина A1, ацил-CoA-синтазы-5 и других белков, улучшающих метаболизм клеток [38]. В ответ на поступление в организм с пищей цистеина активность цистеиндеоксигеназы в печени вначале повышается, а затем фермент деградируется 26S протеасомой. Снижение концентрации аргинина, цистеина или лейцина регулирует экспрессию генов, кодирующих белки, – вторичные мессенджеры сигнальных путей инсулина, в частности белки IGFBP-1 и CHOP [8]. Дефицит белка в рационе приводит к снижению активности протеинкиназы C и нарушению передачи сигналов в клетке [4, 45].

Снижение калорийности рациона изменяет гормональную регуляцию организма и активирует ядерные рецепторы (PPAR- α , - δ , - γ), рецепторы витамина D и др. [9]. Факторы транскрипции, связывающие эти рецепторы, контролируют гены, которые регулируют гормональный фон и гомеостаз клеток, рост, защиту от патогенов. PPAR также отвечает за нейтрализацию ксенобиотиков и токсинов [31, 33].

Протеолиз белков, связанный с убиквитином, сопряжен с гормональной регуляцией. Так, в ответ на изменение в организме уровня инсулина и лептина гипоталамус контролирует его пищевые потребности за счет образования нейротрансмиттеров (GABA Нap1 и др.). Инсулин стимулирует действие убиквитина и увеличивает протеолиз Нap1, а также снижает его концентрацию [48]. С возрастом влияние факторов питания на метаболические пути уменьшается: после приема пищи снижаются пептидазная активность протеасом и убиквитинирование белка (присоединение полиубиквитиновой цепи) в скелетной мускулатуре [7].

Обогащение рациона лейцином восстанавливает возрастное ингибирование активности протеасом [12].

Посттрансляционная модификация белков

Изменение посттрансляционной модификации белков – один из основных ответов клетки на метаболический стресс. Активность синтеза ферментов модификации белка регулируется экспрессией специфических генов. Белки могут быть модифицированы присоединением остатков углеводоро-

дов, липидов, других химических соединений и металлов. Модификация белков может быть обратной или терминальной. Обратимая посттрансляционная модификация белков позволяет выявить у них несколько функций. Например, транскрипционные регуляторы семейства FOXO контролируют клеточный цикл, репарацию ДНК, стресс и апоптоз. После фосфорилирования в цитоплазме FOXO перемещается в ядро, где его ацетилирование и деацетилирование регулируют выбор программы транскрипции генов. Фосфорилирование FOXO в ядре снижает его ДНК-связывающую активность, а взаимодействие с другими коактиваторами подавляет сигнал FOXO, вызывая его перемещение в цитоплазму, где он модифицируется убиквитином и расщепляется 26S протеасомой [55].

Белки, содержащие цистеиновые и тиоловые группы, могут быть окислены реактивными метаболитами кислорода, донорами окиси азота и т.д., что изменяет их активность. Посттрансляционная модификация белков S-нитрозированием или S-глутатионированием используется для передачи сигналов в клетке, а также служит одним из механизмов изменения белков при старении клеток. Карбонилирование является терминальной модификацией, после которой белок должен быть расщеплен 26S протеасомой. Накопление в клетках центральной нервной системы нерасщепленных карбонилированных белков приводит к нейродегенеративным заболеваниям [43].

Присоединение углеводородного компонента к белку регулируется стационарными и индуцибельными генами. Дефекты гликозилирования обнаружены при ряде иммунных заболеваний, что указывает на важность процессов посттрансляционной модификации белков для поддержания функциональной активности иммунной системы.

Посттрансляционная модификация белков липидами (липидирование) необходима для проведения сигнала от плазматической мембраны к ядру клетки. Присоединение насыщенной пальмитиновой кислоты C16 к цистеину белка (пальмитоилирование) с химической точки зрения относится к S-ацетилированию. Этот процесс обратим и позволяет регулировать в клетке уровень модифицированных долгоживущих белков, в частности кальвеолина, связывающего холестерин при транслокации в caveолы.

Присоединение миристиновой кислоты C14 путем котрансляции к глицину N – концевому домену белка приводит к образованию амидной связи. Это относится к N-ацетилированию и регулируется N-миристилтрансферазой. Взаимодействие происходит с боковыми последовательностями белковой молекулы, что вызывает конформационные изменения и появление новых свойств. Последнее характерно для Ca^{+2} -связывающих белков, к которым, помимо C14 жирной кислоты, могут присоединяться и другие N-ацетильные группы.

Модификация белков пренилированием – это присоединение с помощью стабильной тиоэфирной связи изопреноидных липидов С15 фарнезина или С20 геранилгеранила к цистеину С-концевого домена белка. Пренилирование является терминальной модификацией, при которой удаляются 3 последовательности на С-концевом домене и метилируется СООН-группа пренилцистеина. Второй тип пренилирования известен для GTP-связывающих белков семейства Rab, участвующих в мембранном движении. Они геранилгеранилируются по 2 цистеинам на С-конце специфической Rab-GTPазой. Геранилгеранилтрансфераза-1 катализирует пренилирование сотни GTP-связывающих белков [3].

С точки зрения передачи сигналов в клетке важной модификацией является присоединение к гликопротеинам GPI-якоря. GPI (гликозилфосфатидилинозитол) – это фосфолипид, ассоциированный с этаноламином и сахарами, полностью собранный комплекс которого прикрепляется к С-концу белка (процесс происходит в эндоплазматическом ретикуле – ЭР). Многие белки имеют несколько мембранных форм, одна из которых GPI-заякоренная. Гликопротеин присоединяется к мембране остатками маннозы через этаноламин и фосфатдиэфирный мостик, что повышает скорость горизонтального перемещения GPI-заякоренных белков по мембране в десятки раз [18].

Терминально-модифицированные белки подвергаются протеолизу 26S протеасомой. При этом белок модифицируется действием убиквитина. Родственной модификацией белка является присоединение убиквитинподобных белков, которые также направляют белки-мишени для протеолиза к 26S протеасоме [61]. Ремоделирование хроматина и мембранное движение регулируются убиквитинзависимым протеолизом.

Механизмы селективного АТФ-зависимого протеолиза

Жизнедеятельность клетки определяется взаимодействием и проведением сигналов от многочисленных рецепторов на плазматической мембране клетки к ядру, что включает в себя фосфорилирование каскада белков – вторичных мессенджеров (посредников), подлежащих инактивации сразу после передачи сигнала. Дифференциальная, выборочная деградация белка в клетке контролируется АТФ-зависимой протеолитической системой.

АТФ-зависимые протеазы – это ферменты с функциями АТФаз и протеаз, которые контролируют клеточный метаболизм за счет расщепления короткоживущих регуляторных белков и контролируют качество белков в клетке посредством деградации дефектных, поврежденных или мутантных белков, образующихся в результате ошибок синте-

за, фолдинга или действия стресса. Контроль качества белков необходим для поддержания уровня функциональных белков и удаления измененных протеинов [2].

Все АТФ-зависимые протеазы, включая 26S протеасомы, относятся к суперсемейству AAA-белков (АТФазы, ассоциированные с другими клеточными активностями), которые участвуют в регуляции экспрессии генов, клеточного цикла, везикулярного транспорта, биогенеза органелл, перегруппировки цитоплазматических микротрубочек. AAA-белки в отличие от других протеолитических ферментов:

- 1) являются гомо- или гетероолигомерными ферментами;
- 2) проявляют высокую селективность в выборе белков-мишеней;
- 3) все фазы их протеолитической активности сопряжены с гидролизом АТФ;
- 4) деградация субстратов происходит по процессивному механизму без образования высокомолекулярных промежуточных продуктов [2].

AAA-белки характеризуются наличием Р-петли в нуклеотидсвязывающем центре и SRH-фрагмента, которые определяют принадлежность белка к определенному семейству внутри суперсемейства. АТФазные компоненты AAA-белков представлены ЗА-модулями и сенсорными остатками, участвующими в связывании и гидролизе нуклеотида. Специализированный α -домен взаимодействует с нуклеотидом и белком-мишенью и сопрягает АТФазную и функциональную активность AAA-белков. АТФаза находит мишень, связывает ее, разворачивает и высвобождает для последующего рефолдинга либо перемещает в протеолитическое ядро AAA-протеазы для деградации [2].

АТФ-зависимому протеолизу подлежат:

- 1) сигнальные белки, модифицированные киназами и фосфатазами и выполнившие свои функции;
- 2) белки, измененные в результате свободнорадикального окисления, температурной денатурации и т.д.;
- 3) белки, имеющие точечные или другие мутации, а также генетически модифицированные, образованные в результате слияния генов, смещения рамки считывания;
- 4) свободные субъединицы мультимерных комплексов при избытке синтезированных субъединиц;
- 5) вновь образованные белки с нарушенным фолдингом и т.д. [2].

Убиквитин – основной компонент АТФ-зависимого протеолиза

Убиквитин – это полипептид (76 аминокислотных остатков), ковалентно связывающий белки-мишени в комплекс для протеолиза. Он обнаруживается во всех клетках и связывает белки ядра, цитоплазмы, рецепторы, гистоны, денатурированные,

чужеродные, короткоживущие белки и др. Убиквитинирование необратимо изменяет функцию и локализацию белков в клетке [58]. Убиквитинзависимый протеолиз необходим для протеасомной деградации быстро нарастающих пулов регуляторных белков, участвующих в процессах клеточного цикла, а также киназ, фосфатаз, опухолевых супрессоров, ферментов репарации ДНК, активаторов ядерных факторов транскрипции. Расщепление указанных компонентов клеток под действием убиквитина необходимо для важнейших биологических процессов, включая посттрансляционную модификацию белков, метаболизм клетки, контроль качества белков, клеточный цикл, передачу сигналов в клетке, представление антигена и иммунный ответ, рецепторно-зависимый эндоцитоз и апоптоз [26].

При связывании рецепторов плазматической мембраны вторичные мессенджеры передают сигналы от мембраны к ядру. Каталитические сайты киназ сигнальных путей являются мишенями для регуляторов, протеинфосфатаз, а также убиквитина и убиквитинподобных белков. Убиквитинирование – механизм быстрого блокирования сигналь-

ных белков, который ограничивает длительность сигнала MAPK-киназного пути, разбирает комплексы киназ, изменяет их локализацию, приводит к деградации ферментов и их субстратов [37].

Формирование комплекса убиквитина с белком и перенос его на протеасому – многоступенчатый АТФ-зависимый процесс (см. рис.).

Активация убиквитина приводит к появлению тиоэфирной связи с убиквитинактивирующим ферментом E1. Комплекс убиквитин–E1 переносится на убиквитинконъюгирующий фермент E2, который трансэтерифицирует убиквитин. Перенос убиквитина к белку-мишени катализируется убиквитин-протеин-лигазой E3, которая специфически распознает аминокислотные окончания субстрата и фермента E2, катализирует образование изопептидной связи между убиквитином и белком-мишенью. Физическое взаимодействие между ферментами E2 и E3 не зависит от убиквитина или каталитического домена E3 [51]. Фосфорилирование ферментов E1 и E2 повышает АТФ-зависимое связывание всего комплекса. У млекопитающих найдена 1 форма фермента E1, более 10 изоформ E2 и несколько изоформ E3, но теоретически их

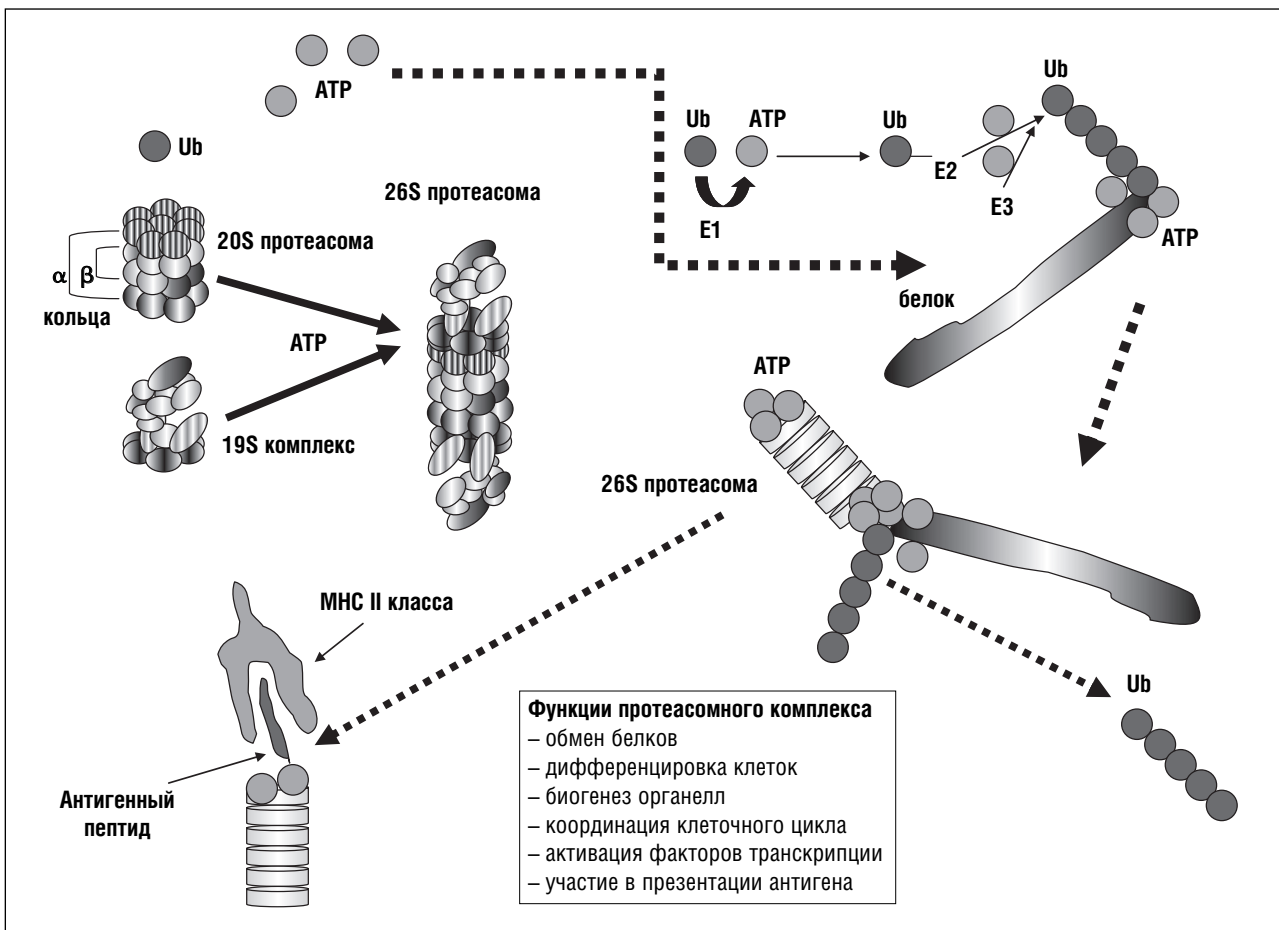


Схема активации убиквитина, сборки полиубиквитиновой цепи и убиквитинзависимого протеолиза 26S протеасомой.

Ub – убиквитин; АТФ – аденозинтрифосфат; MHC II класса – белки, кодируемые генами главного комплекса гистосовместимости II класса; E1 – убиквитинактивирующий фермент; E2 – убиквитинконъюгирующий фермент; E3 – убиквитинпротеинлигаза.