

## ПРОТЕАСОМЫ И ИХ ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ВО ВНЕКЛЕТОЧНОМ ПРОСТРАНСТВЕ

© Ю. Я. Зайкова, И. Н. Евтеева, А. С. Цимоха

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru, vat-julia@yandex.ru*

Представлен обзор литературы, касающейся исследований внеклеточных протеасом и их возможных функций. Убиквитин-протеасомная система (УПС) отвечает за большую часть регулируемого протеолиза в клетке. 26S протеасома является центральным протеолитическим звеном УПС и представляет собой мультисубъединичный белковый комплекс, состоящий из коровой 20S протеасомы и ассоциированный с ней одним или двумя 19S регуляторными комплексами. Обнаружено, что протеасомы присутствуют во внеклеточном пространстве — в альвеолярном секрете, спинномозговой жидкости и в плазме крови. Внеклеточные протеасомы имеют аналогичную внутриклеточным частицам цилиндрическую структуру и обладают тремя типами пептидазной активности, специфическими для протеасом. Внеклеточные протеасомы присутствуют как у здоровых, так и у больных людей. Обнаружено, что у пациентов, страдающих от аутоиммунных заболеваний, злокачественных новообразований, сепсиса или травмы, концентрация внеклеточных протеасом в крови повышается, что коррелирует с прогрессированием заболевания и имеет как диагностическое, так и прогностическое значение.

**Ключевые слова:** внеклеточные протеасомы, протеасомы, протеолиз, убиквитин-протеасомная система, циркулирующие протеасомы, экзосомы.

**Принятые сокращения:** ЛДГ — лактатдегидрогеназа, УПС — убиквитин-протеасомная система, ЭР — эндоплазматический ретикулум.

Все внутриклеточные белки по окончании своего времени жизни расщепляются. Убиквитин-протеасомная система (УПС) является основной системой деградации белка в клетке эукариот (Ciechanover, Schwartz, 2004). Белки, помеченные полиубиквитиновой цепочкой с помощью каскада убиквитинилирующих ферментов, расщепляются затем до пептидов и отдельных мономеров убиквитина 26S протеасомой (Wolf, Hilt, 2004).

26S протеасома, часто называемая просто протеасомой, имеет вид симметричной гантелеобразной структуры, состоящей из корового цилиндрического 20S ядра (20S протеасомы) и одного или двух 19S регуляторных комплексов (активатора PA700) (Цимоха, 2010). 20S протеасома представляет собой полый цилиндр, состоящий из 14 пар различных, но гомологически схожих по своей структуре субъединиц  $\alpha$ - и  $\beta$ -типов, образующих 4 уложенных друг на друга гептамерных кольца. Субъединицы  $\alpha$ -типа образованы периферические кольца, а их N-концевые гидрофобные концы образуют физический барьер («ворота»), который ограничивает размер субстрата, способного проникать внутрь (Groll et al., 2000). Субъединицы  $\beta$ -типа образуют центральные кольца и протеолитическую полость 20S протеасомы, где осуществляется протеолиз белка (Orlowski, Wilk, 2000). На трех  $\beta$ -субъединицах ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$ ) из семи локализованы каталитически активные сайты протеасомы с разными субстратными специфичностями (каспаза-, трипсин- и химотрипсин-подобными соответственно). Воздействие  $\gamma$ -интерферона стимулирует экспрессию трех дополнительных ката-

литических  $\beta$ -субъединиц ( $\beta 1i/LMP2$ ,  $\beta 2i/MECL1$  и  $\beta 5i/LMP7$ ), называемых индуцибельными или иммунными, которые замещают соответствующие конститутивные  $\beta$ -субъединицы, что в свою очередь приводит к изменению продуктов расщепления белкового субстрата — образованию иммуногенных пептидов, выставляемых на молекулах главного комплекса гистосовместимости класса I (Kloetzel, 2004).

Процесс «маркировки» белка для его последующей деградации протеасомой состоит из трех этапов: АТФ-зависимой активации убиквитина с помощью убиквитинактивирующего фермента E1, переноса активированного убиквитина на убиквитинсвязывающий фермент E2 и дальнейшего формирования изопептидной связи между убиквитином и белком-субстратом с помощью убиквитинлигазы E3. Этот процесс повторяется несколько раз с целью создания полиубиквитиновой цепочки. Далее полиубиквитинилированный белок узнается и связывается 19S регуляторным комплексом 26S протеасомы, удаляется полиубиквитиновый хвостик, высвобождаются свободные молекулы убиквитина, белок разворачивается и проталкивается в протеолитическую полость 20S протеасомы, где расщепляется на пептиды. Совершенно очевидно, что УПС является не только утилизирующей машиной для контроля за временем жизни белка. За счет деградации специфических регуляторных белков УПС, кроме того, играет центральную роль в регуляции таких основных клеточных процессов, как клеточная дифференцировка и развитие, транскрипция и репарация ДНК, про-

движение клетки по клеточному циклу и пролиферация, иммунный и воспалительный ответы, апоптоз (Kloetzel, 2004; Collins, Tansey, 2006; Maupin-Furlow et al., 2006; Reed, 2006; Sikder et al., 2006; Ferdous et al., 2007; Konstantinova et al., 2008; Моисеева и др., 2010; Цимоха, 2010). УПС также участвует во многих патологических событиях, таких как опухолеобразование и метастазирование, воспалительные процессы, нейродегенеративные заболевания (болезни Паркинсона и Альцгеймера) (Ciechanover, Schwartz, 2004; Olanow, McNaught, 2006; Cecarini et al., 2007), вследствие чего компоненты УПС рассматриваются как фармацевтические мишени.

Первые исследования в этой области (Teicher et al., 1999) позволили вывести на рынок лекарств препарат Velcade (бортезомиб), являющийся ингибитором протеасом, который успешно используется в лечении онкологических больных. Этот ингибитор вызывает апоптоз в быстро пролиферирующих клетках с неправильными фенотипами, т. е. раковых клетках, в то время как нормальные клетки, как показано, нечувствительны или менее чувствительны к его проапоптотическому действию. Последующие факты, однако, указали на то, что регуляция апоптоза протеасомами более тонкая и комплексная, поскольку протеасомы обеспечивают в клетке баланс между про- и антиапоптотическими белками-регуляторами и, таким образом, являются центральными фигурами в равновесии между двумя противоположными путями клетки: выживание или апоптоз (Sohn et al., 2006а, 2006б; Yang et al., 2006). Далее исследования в этой области стали сосредотачиваться на поиске в УПС других мишеней для ингибирования, в частности специфических убиквитинлигаз, которые также позволили бы сдвигать равновесие между про- и антиапоптотическими белками, направляя раковые клетки в апоптоз (Vogel et al., 2012). Кроме того, возможна регуляция основных клеточных процессов специфическими популяциями протеасом, как например в случае иммунопротеасом (Bellavista et al., 2013), которые позволят выявить более специфическую мишень для терапевтического воздействия.

Представленный обзор литературы рассматривает такое явление, как внеклеточные протеасомы, которые присутствуют во внеклеточных жидкостях и плазме крови как здоровых, так и больных людей. Понимание роли внеклеточных протеасом и механизма их выхода из клетки позволит определить в дальнейшем их значимость для диагностики и исхода злокачественных или других заболеваний.

## Внеклеточные протеасомы

Согласно современным представлениям, протеасомы в клетке вездесущи: они находятся и в ядре, и в цитоплазме. Показано, что протеасомы связаны с мембраной (Rivett et al., 1992). В экспериментах *in vitro* обнаружено, что протеасомы связываются с фосфолипидными монослоями перпендикулярно к гидрофобной стороне слоя, образованной полярными головками молекул липидов (Newman et al., 1996). Исследования *in vivo* показали, что часть протеасом, связанных с эндоплазматическим ретикуломом (ЭР), устойчива к воздействию трипсина, что предполагает частичное проникновение протеасом внутрь мембраны (Hori et al., 1999). Интересно упомянуть, что протеасомы были обнаружены также на поверхности клеточной мембраны лейкозных клеток человека

линии U937 и человеческих Т- и В-лимфоцитов (Henry et al., 1996; Bureau et al., 1997). Кроме того, протеасомы присутствуют в сперматозоидах во фракции белков, связанных с мембранами (Wojcik et al., 2000).

Первое упоминание о присутствии протеасом в плазме крови датируется 1993 г. (Wada et al., 1993). В последние годы в литературе появились данные о том, что протеасомы обнаружены в различных внеклеточных жидкостях: альвеолярной (Sixt et al., 2007, 2009, 2012; Albright et al., 2009; Majetschak et al., 2009), спинномозговой (Mueller et al., 2012), в плазме крови (Lavabre-Bertrand et al., 2001; Stoebner et al., 2005; Sixt et al., 2007, 2009; Henry et al., 2009; Majetschak et al., 2010). Более того, протеасомы были идентифицированы в среде культивирования клеток (Куличкова и др., 2004; Зайкова и др., 2011, 2013). Обнаруженные в межклеточном пространстве протеасомы были названы внеклеточными, а за протеасомами из плазмы крови закрепилось название «циркулирующие протеасомы» (circulating proteasome) или ц-протеасомы (c-proteasome), несмотря на то что иногда их называют п-протеасомами (p-proteasome; от: plasma proteasome) (Henry et al., 2010, 2011, 2013).

Вообще говоря, протеасомы являются физиологическим компонентом плазмы крови и в норме присутствуют у всех здоровых людей (см. обзор: Sixt, Dahlmann, 2008). Так, измеренная с помощью иммуноферментного анализа, описанного рядом авторов (Dutaud et al., 2002; Majetschak, Sorell, 2008), концентрация ц-протеасом у здоровых людей находится, по данным одних исследователей, в диапазоне между 200 и 400 нг/мл (Majetschak et al., 2010; Heubner et al., 2011; Hoffmann et al., 2011), а по другим — между 2000 и 2700 нг/мл (Lavabre-Bertrand et al., 2001; Stoebner et al., 2005; Henry et al., 2009). Разница, по всей видимости, объясняется тем, что, во-первых, первые авторы измеряли концентрацию лишь 20S протеасом, в то время как их коллеги измеряли количество всех субтипов протеасом (20S и 26S протеасом). Во-вторых, такое различие можно также объяснить различными методами иммуноферментного анализа для определения количества ц-протеасом в крови.

Методом электронной микроскопии показано, что ц-протеасомы имеют аналогичную внутриклеточным частицам цилиндрическую структуру, с одного или двух концов ограниченную регуляторными комплексами (Zoeger et al., 2006). Кроме того, оказалось, что очищенные внеклеточные протеасомы обладают способностью расщеплять специфические для протеасом флуорогенные пептиды, которая подавлялась в присутствии протеасомных ингибиторов (Куличкова и др., 2004; Sixt et al., 2007; Зайкова и др., 2011). Данные масс-спектрометрии подтвердили присутствие в составе внеклеточной популяции протеасом всех субъединиц 20S протеасомы и 19S регуляторного комплекса — регуляторов PA200 и 11S (Зайкова и др., 2013).

С помощью специальной медицинской процедуры — бронхоальвеолярного лаважа — обнаружили в альвеолярной жидкости пептидазные активности, специфические для протеасом, которые подавлялись специфическим для протеасом ингибитором эпоксомидином (Sixt et al., 2007). Гель-фильтрация показала, что с этой протеолитической активностью ассоциированы комплексы с мол. массой около 600 кДа, которые взаимодействовали с антителами к 20S протеасомным субъединицам. Масс-спектрометрический анализ тоже показал наличие нескольких протеасомных субъединиц в каталитической фракции, что

напрямую свидетельствовало о том, что протеасомы являются компонентом внеклеточной альвеолярной жидкости. Контроль за тем, что во внеклеточной популяции протеасом не присутствуют протеасомы из клеток, которые были повреждены во время процедуры бронхоальвеолярного лаважа, проводили с помощью окраски клеток трипановым синим и измерением активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

Образцы спинномозговой жидкости, полученные от более чем 20 пациентов, направленных на спинномозговую миелографию, также содержали внеклеточные протеасомы в количестве 3.2—71.4 нг/мл (Mueller et al., 2012). Интересно, что концентрация  $\alpha$ -протеасом в крови у этих же пациентов находилась в диапазоне 83—2141.7 нг/мл.

Внеклеточные протеасомы, выделенные из среды культивирования клеток человека линий A431 и K562, также обладали тремя специфическими для протеасом пептидазными активностями (Куличкова и др., 2004; Зайкова и др., 2011) и специфической эндорибонуклеазной активностью (Куличкова и др., 2004).

### Функции внеклеточных протеасом

Попытки определить функциональную значимость внеклеточных протеасом показали, что образцы альвеолярной жидкости способны расщеплять альбумин *in vitro*, причем по АТФ- и убиквитиннезависимому пути, и этот протеолиз подавлялся с помощью специфического для протеасом ингибитора эпоксомидина (Sixt et al., 2007). Известно, что при легочной патологии в составе бронхиального секрета обнаруживаются как тканевые, так и сывороточные белки (в том числе альбумин), причем различные формы патологий характеризуются различными уровнями этих белков в секрете (Сухарев и др., 2004). Поэтому была сделана оценка количества внеклеточных протеасом в альвеолярной жидкости при остром респираторном дистресс-синдроме, при повреждении легких и при легочном саркоидозе в сравнении со здоровыми пациентами (Sixt et al., 2009).

Оказалось, что количество внеклеточных протеасом в альвеолярном секрете у больных острым респираторным дистресс-синдромом было заметно выше —  $1070 \pm 1194$  против  $61 \pm 50$  нг/мл у здоровых пациентов. В случае повреждения легких и легочного саркоидоза наблюдали незначительное повышение концентрации внеклеточных протеасом в альвеолярной жидкости ( $54 \pm 43$  и  $97.6 \pm 2.2$  нг/мл соответственно). Интересно, что, несмотря на такое увеличение количества внеклеточных протеасом в альвеолярном секрете при остром респираторном дистресс-синдроме, протеолитическая фракция была значительно менее активна при расщеплении специфических для протеасом флуорогенных субстратов, чем у здоровых пациентов. Кроме того, аналогичная картина наблюдалась при расщеплении альбумина *in vitro*. Интересно, что очищенные из альвеолярного секрета при патологии протеасомы обладали пептидазной активностью, сравнимой по интенсивности с активностью протеолитической фракции альвеолярной жидкости здоровых пациентов. Авторы полагают, что активность внеклеточных протеасом у пациентов с острым респираторным дистресс-синдромом ингибируется специальным неизвестным белком (Sixt et al., 2009).

Другая группа исследователей обнаружила, что на модели ушиба легких у крыс тоже повышается количест-

во 20S протеасом в альвеолярной жидкости, пик которого приходится на 24 ч после ушиба, а через 168 ч количество внеклеточных протеасом снижется до значения, полученного у нормальных животных (Majetschak et al., 2009). Далее получены интересные данные о том, что при ожоге и ингаляционной травме на фоне повышения содержания общего белка в альвеолярной жидкости абсолютные количества как 20S, так и 26S протеасом, а также протеасомной активности повышались по сравнению со здоровыми пациентами (Albright et al., 2009). Однако относительно 1 мг общего белка в составе альвеолярной жидкости после травмы наблюдаются повышение концентрации 20S протеасом, понижение количества 26S частиц и снижение протеасомной активности.

Интересно, что iTRAQ-масс-спектрометрический анализ протеасомных белков в препаратах протеасом, выделенных из цитоплазмы, и кондиционированной клетками среды показал, что количество субъединиц 20S протеасомы в среде в 2 раза выше, чем в цитоплазме, однако белков регулятора 19S, напротив, почти в 1.5 раза меньше. Это означает, что в среде популяция протеасом обогащена 20S протеасомами и (или) 19S комплекс заменен на другой протеасомный регулятор, как например 11S или PA200 комплексы (Зайкова и др., 2013).

Как мы уже упомянули выше, появляются все больше данных, указывающих на тот факт, что протеасомы являются физиологическим компонентом альвеолярной жидкости, причем воспалительные процессы в легких могут изменять их состав. Действительно, при остром респираторном дистресс-синдроме в составе внеклеточных протеасом выявлялись две индуцибельные субъединицы протеасом  $\beta 1i$  и  $\beta 5i$ , которые не присутствуют у внеклеточных протеасом у здоровых пациентов (Sixt et al., 2012). Помимо этого, субъединица  $\beta 5i$  появлялась в составе  $\alpha$ -протеасом у больных синдромом Шегрена и системной красной волчанкой (Egerer et al., 2002). Авторы поднимают вопрос о возможности процессинга антигенов, а следовательно, и об иммунном ответе, которые могут протекать во внеклеточном пространстве.

В некоторых исследованиях при измерении концентрации протеасом в альвеолярном секрете, или в спинномозговой жидкости, или при воспалительных процессах в легких проводились измерения количества протеасом в плазме крови (Sixt et al., 2009; Majetschak et al., 2010; Mueller et al., 2012). Оказалось, что при повышении количества протеасом в этих внеклеточных жидкостях при патологии также наблюдается увеличение концентрации протеасом и в плазме крови. Так, заметное увеличение концентрации  $\alpha$ -протеасом обнаружено у пациентов с сепсисом или травмой, однако в противоположность этому лишь незначительно выше была концентрация  $\alpha$ -протеасом у больных после брюшной хирургии (Roth et al., 2005). Неудивительно, что такое наблюдение открывает перспективы в диагностике патогенных процессов в организме, что подстегивает исследования, направленные на определение количества протеасом в плазме крови пациентов при различных заболеваниях.

При первом обнаружении сывороточных протеасом заметили прямую корреляцию между их количеством и тяжестью онкологического заболевания пациентов (Wada et al., 1993). Много позднее связь между различными опухолевыми патологиями и количеством протеасом в плазме крови исследовала группа французских ученых (Lavabre-Bertrand et al., 2001). Концентрацию протеасом в плазме крови измеряли у пациентов с твердыми опухоля-

ми, острым лейкозом, миелопролиферативным и миелодиспластическим синдромами, хроническим лимфоцитарным лейкозом, неходжкинской лимфомой, болезнью Ходжкина и с множественной миеломой. Оказалось, в сравнении со здоровыми донорами значительно повышалась концентрация  $\alpha$ -протеасом в плазме у пациентов только с твердыми опухолями (3-кратное увеличение), а у больных с миелопролиферативным и миелодиспластическим синдромами это увеличение было незначительным. Пациенты с лимфомами, напротив, имели более низкие значения количества протеасом в плазме крови, чем здоровые доноры, за исключением пациентов в острой фазе заболевания. Такой низкий уровень сохранялся и у пациентов, которые находились в состоянии полной ремиссии.

Некоторое повышение концентрации  $\alpha$ -протеасом было замечено у больных неинвазивным раком молочной железы (Hoffmann et al., 2011) и раком яичников (Heubner et al., 2011). Последующие исследования коснулись зависимости количества протеасом в плазме крови от стадии развития опухолевой патологии. Так, у пациентов со злокачественной меланомой наблюдали повышение количества протеасом в плазме крови на 3-й стадии заболевания, значительно возрастающее к 4-й стадии (Stoebner et al., 2005; Henry et al., 2010). Аналогичную картину наблюдали у больных раком почки: концентрация  $\alpha$ -протеасом возрастала в зависимости от стадии заболевания (De Martino et al., 2012). У больных циррозом печени заметное увеличение количества  $\alpha$ -протеасом наблюдали лишь в случае гепатомы, даже если размер опухоли был незначительным (Henry et al., 2009).

Крайне важно отметить, что уровень  $\alpha$ -протеасом в крови у пациентов с множественной миеломой, которые еще не подвергались никакому лечению, значительно выше, чем у здоровых доноров (Jakob et al., 2007). Однако после проведения стандартной или усиленной химиотерапии уровень  $\alpha$ -протеасом в крови тех пациентов, лечение для которых было успешным, значительно снижался; этого эффекта не обнаружено у не поддающихся химиотерапии больных. Более того, была определена важная для прогнозирования продолжительности жизни больного концентрация  $\alpha$ -протеасом в крови больных множественной миеломой (744 нг/мл). Все пациенты, у которых эта величина была ниже, имели большую продолжительность жизни, чем те, у которых эта величина была выше (Jakob et al., 2007).

Не все ученые в исследованиях  $\alpha$ -протеасом используют иммуноферментный метод для определения количества протеасом в плазме крови, некоторые измеряют лишь пептидазные активности протеасом. Так,  $\alpha$ -протеасомы больных хроническим лимфоцитарным лейкозом были значительно активнее  $\alpha$ -протеасом здоровых доноров по всем трем типам пептидазных активностей протеасом (Ma et al., 2008). Интересно, что, несмотря на повышенную протеолитическую активность  $\alpha$ -протеасом у больных хроническим лимфоцитарным лейкозом, количество  $\alpha$ -протеасом при этой патологии находилось в том же диапазоне, что и у здоровых доноров (Lavabre-Bertand et al., 2001). Тем не менее каспаза-подобная активность  $\alpha$ -протеасом в плазме крови больных хроническим лимфоцитарным лейкозом может рассматриваться в качестве прогностического параметра, поскольку повышенная активность этого типа коррелирует с более коротким предсказанным временем жизни (Ma et al., 2008).

Значительное повышение концентрации  $\alpha$ -протеасом наблюдается не только у раковых больных, но и у паци-

ентов, страдающих заболеваниями печени, такими как цирроз, острый или хронический гепатит, жировая дистрофия (Wada et al., 1993), а также аутоиммунными заболеваниями, такими как аутоиммунный миозит, системная красная волчанка, синдром Шегрена, ревматоидный артрит и аутоиммунный гепатит (Egerer et al., 2002). Однако следует отметить, что концентрация  $\alpha$ -протеасом у больных хронической идиопатической крапивницей не повышается (Stoebner et al., 2005; Henry et al., 2011). Кроме того, незначительно увеличивается количество протеасом в плазме крови у пациентов с тяжелыми формами псориаза.  $\alpha$ -протеасомы могут представлять собой новый маркер иммунологической активности и мышечной деградации при сепсисе и травме, а также могут быть полезны при мониторинге клинического эффекта ингибиторов протеасом (Roth et al., 2005).

Суммируя данные о концентрации  $\alpha$ -протеасом при различных заболеваниях, выделим 3 факта: 1) при патологии чаще всего повышается количество протеасом в плазме крови, 2) наибольший рост концентрации внеклеточных протеасом в крови происходит при прогрессировании заболевания (например, онкологического, начиная с 3-й стадии), 3) при улучшении клинической картины заболевания уровни  $\alpha$ -протеасом снижаются до уровня здоровых доноров.

### Механизм выхода протеасом из клеток

Критическим моментом в исследовании внеклеточных протеасом является вопрос об их происхождении, иными словами, вопрос о том, что является «прямым поставщиком» внеклеточных протеасом — живые или поврежденные мертвые клетки. Так, например, существует мнение о том, что протеасомы могут попадать в плазму крови из апоптотических клеток при нарушении механизма фагоцитоза (Mountz, 2002). Прямых доказательств секреции протеасом живыми клетками в настоящее время нет, однако исследователи не раз пытались в своих экспериментах опровергнуть утверждение об исключительно внутриклеточной протеасомной локализации. Так, были предприняты попытки сравнения внутри- и внеклеточных протеасом (Zoeger et al., 2006; Зайкова и др., 2011), и, поскольку эти субпопуляции различались, был сделан вывод о том, что поврежденные клетки не могли стать источником протеасом во внеклеточном пространстве (в противном случае эти популяции были бы идентичными).

Другие исследователи определяли взаимосвязь между появлением протеасом во внеклеточном пространстве и лизисом клеток (Sixt et al., 2007) и пришли к выводу о том, что поврежденные клетки не являются основным источником внеклеточных протеасом. Мы также не увидели прямой связи между этими процессами, поскольку при повреждении клеток в среде, кондиционированной клетками, мы наблюдали увеличение количества протеасом наряду с появлением других внутриклеточных белков, в частности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. В нормальном же состоянии клетки продолжали секретировать протеасомы, которые мы наблюдали в среде культивирования, в то время как других внутриклеточных белков выявлено не было (неопубликованные данные).

Поскольку выше говорилось о возможных диагностическом и даже прогностическом значениях внеклеточных протеасом, важно иметь представление о происхождении

этих протеасом во внеклеточных жидкостях именно при патологических состояниях. Как было рассмотрено выше, при патофизиологических состояниях организма часто повышается концентрация внеклеточных протеасом. Известно, что повышенная экспрессия протеасомных субъединиц наблюдается в различных трансформированных клеточных линиях (Kumatori et al., 1990; Bhui-Kaur et al., 1998), поэтому было сделано предположение о том, что, во-первых, раковые клетки с повышенной экспрессией протеасомных белков могут секретировать протеасомы во внеклеточное пространство, во-вторых, что протеасомы вне клеток — это результат распада опухолевых клеток (Wada et al., 1993). Обычно в качестве маркера клеточного лизиса используют какой-нибудь внутриклеточный белок, например ЛДГ, а также окраску клеточной популяции трипановым синим, который выявляет лишь клетки с поврежденной мембраной.

Во многих упомянутых в настоящем обзоре исследованиях при измерении концентрации внеклеточных протеасом параллельно измеряли активность ЛДГ во внеклеточных фракциях. Важно отметить, что при исследовании отношения между концентрациями ЛДГ и ц-протеасом в плазме крови была выявлена некоторая прямая зависимость (Lavabre-Bertrand et al., 2001; Stoeber et al., 2005). В другой работе тоже нашли связь между активностью аланинаминотрансферазы и концентрацией ц-протеасом в крови (Wada et al., 1993). Эти исследования наводят на мысль, что источником внеклеточных протеасом являются поврежденные клетки. С другой стороны, концентрация ц-протеасом возрастает и в случае аутоиммунных заболеваний (Egerer et al., 2002), что предполагает, скорее, иммунологическую активность, а не только повреждение клеток как причину выхода протеасом во внеклеточное пространство при сепсисе или после тяжелых травм (Roth et al., 2005). Авторы тщательно сравнивали субпопуляции протеасом (ц-протеасом и протеасом из иммунокомпетентных клеток) и показали очевидные различия между ними как по составу, так и по активности (Zoeger et al., 2006).

Таким образом, несмотря на существование прямой корреляции между повышением клеточной гибели и появлением внеклеточных протеасом у больных с соответствующими заболеваниями, различия между внутри- и внеклеточными субтипами протеасом и их активностями при их практически постоянном уровне ставят под сомнение существование лишь такого источника внеклеточных протеасом. Одним из способов доказательства может стать определение механизма секреции протеасом клетками.

Некоторые авторы предполагают, что у трансформированных клеток может существовать специфический секреторный путь, по которому специальная популяция протеасом выходит во внеклеточное пространство (Lavabre-Bertrand et al., 2001). Однако тогда возникает вопрос о том, каким образом появляются внеклеточные протеасомы у здоровых людей? Протеомный анализ так называемой теперь секретомы (белков, секреторируемых клетками) миелоидных клеток мыши линии J774, культивируемых в бессывороточной среде, показал наличие протеасомных субъединиц (Chevallet et al., 2007). Секретомы клеток рака поджелудочной железы (Schiarea et al., 2010) и висцеральной жировой ткани человека (Alvarez-Llamas et al., 2007) тоже содержат протеасомные белки. Согласно современным представлениям, ни протеасомы, ни гистоны не являются классическими секреториру-

емыми белками. Поэтому полагают, что присутствие в секретоме как протеасомных субъединиц, так и актина или гистонов является результатом клеточного повреждения, если, конечно, для этих белков не будет в будущем описан специальный «неклассический» механизм секреции.

Классический секреторный механизм подразумевает существование у белка специального сигнального пептида для транслокации в ЭР и последующей его транспортировки с помощью аппарата Гольджи к плазматической мембране. Интересно, что протеасомы пока не обнаружены в ЭР или аппарате Гольджи (см. обзор: Wojcik, DeMartino, 2003), поэтому мало вероятно, что протеасомы секреторируются клеткой по этому пути. Однако такой классический путь секреции белков клетками не единственный (см. обзоры: Nickel, 2005; Frittoli et al., 2011). В этих обзорных статьях описаны способы транспорта белков через цитоплазматическую мембрану клеток млекопитающих, например с помощью экзосом или специальных экзозомул. Иммуноэлектронная микроскопия пневмоцитов II типа показала наличие протеасом внутри вакуолей, прилегающих к клеточной мембране, а также в вакуолях, которые, по-видимому, уже объединены с клеточной мембраной, что позволило авторам предположить экзцитозный механизм выхода протеасом из клеток (Sixt et al., 2009). Аналогичная картина получена в результате иммуноэлектронной микроскопии кубовидных эпителиальных клеток (Mueller et al., 2012). Однако авторы не исключают других секреторных путей: экзосомы, экзозомикулы и др., тем более что в протеоме экзосом из мезенхимных стволовых клеток человека линии huES9.E1, обнаружены все субъединицы 20S протеасомы, включая индуцибельные  $\beta$ -субъединицы, и некоторые субъединицы 19S регуляторного комплекса (Lai et al., 2012). Таким образом, поскольку протеасомы связаны с цитоплазматической мембраной, а в протеоме экзосом обнаружены протеасомные белки, вполне вероятно, что секреция протеасом клетками происходит по экзосомному транспортному пути.

## Заключение

В последнее время стали появляться исследования, посвященные внеклеточным протеасомам. Существуют различные точки зрения о протеасомах вне клетки. Одна из версий заключается в том, что накопление протеасом во внеклеточном пространстве связано прежде всего с необходимостью «расчистки территории» — избавлением от накапливающихся во внеклеточном пространстве белков и активацией секреторируемых клеткой белков-предшественников, а также процессингом антигенов (Sixt, Peters, 2010). Другие исследователи склонны полагать, что присутствие протеасом во внеклеточном пространстве является следствием поврежденных клеток и может рассматриваться в качестве диагностического маркера развития и лечения заболевания. Третьи рассматривают внеклеточные протеасомы как возможный прогностический параметр в исходе заболеваний. В любом случае очевидно, что исследования внеклеточных протеасом сегодня находятся на начальном этапе, имеющем крайне мало информации. Однако присутствие во внеклеточном пространстве биологически активных протеасом в нормальных физиологических условиях, возрастание количеств

внеклеточных протеасом при развитии воспалительных или злокачественных заболеваний, а также множество незакрытых вопросов о механизмах и функциональном значении процесса секреции протеасом клетками свидетельствуют об огромных функциональных возможностях УПС, которые не ограничиваются лишь регулируемым протеолизом в клетке.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (№ 8787) и правительства Санкт-Петербурга.

### Список литературы

- Зайкова Ю. Я., Куличкова В. А., Ермолаева Ю. Б., Боттрилл А., Барлев Н. А., Цимоха А. С. 2013. Характеристика внеклеточных протеасом и ассоциированных с ними белков методом iTRAQ-масс-спектрометрии. *Цитология*. 55(2):111—122.
- Зайкова Ю. Я., Куличкова В. А., Ермолаева Ю. Б., Гаузе Л. Н., Цимоха А. С. 2011. Сравнительный анализ вне- и внутриклеточных протеасом клеток человека линии K562. *Цитология*. 53 (6) : 459—465.
- Куличкова В. А., Миттенберг А. Г., Ермолаева Ю. Б., Цимоха А. С., Волкова И. В., Евтеева И. Н., Кожухарова И. В., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2004. Специфичность популяции протеасом, экскретируемых из клеток в культуральную среду. *Докл. РАН*. 399 (5) : 503—506.
- Мусеева Т. Н., Миттенберг А. Г., Барлев Н. А. 2010. Протеасомы и их роль в регуляции транскрипции. *Цитология*. 52 (3) : 195—203.
- Сухарев А. Е., Ермолаева Т. Н., Беда Н. А., Мамаева С. А. 2004. Иммунохимическое исследование бронхиального секрета в оценке степени эндобронхита. *Фундаментальные исследования*. 2 : 27—34.
- Цимоха А. С. 2010. Протеасомы: участие в клеточных процессах. *Цитология*. 52 (4) : 277—300.
- Albright J. M., Romero J., Saini V., Sixt S. U., Bird M. D., Kovacs E. J., Gamelli R. L., Peters J., Majetschak M. 2009. Proteasomes in human bronchoalveolar lavage fluid after burn and inhalation injury. *J. Burn. Care Res*. 30 : 948—956.
- Alvarez-Llamas G., Szalowska E., de Vries M. P., Weening D., Landman K., Hoek A., Wolffenbuttel B. H., Roelofs H., Vonk R. J. 2007. Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Mol. Cell Proteomics*. 6 : 589—600.
- Bellavista E., Andreoli F., Parenti M. D., Martucci M., Santoro A., Salvioli S., Capri M., Baruzzi A., Del Rio A., Franceschi C., Mishto M. 2013. Immunoproteasome in cancer and neuropathologies: a new therapeutic target? *Curr. Pharm. Des*. 19 : 702—718.
- Bhui-Kaur A., Therwath A., Henry L., Chiesa J., Kurkure A., Scherrer K., Bureau J. P. 1998. Increased prosomal proteins in breast cancer cells and in neighboring normal cells in Parsi and non-Parsi populations. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 124 : 117—126.
- Bureau J. P., Olink-Coux M., Brouard N., Bayle-Julien S., Huesca M., Herzberg M., Scherrer K. 1997. Characterization of proteasomes in human lymphocyte subpopulations and their presence as surface antigens. *Exp. Cell Res*. 231 : 50—60.
- Cecarini V., Ding Q., Keller J. N. 2007. Oxidative inactivation of the proteasome in Alzheimer's disease. *Free Radic. Res*. 41 : 673—680.
- Chevallet M., Diemer H., Van Dorssealer A., Villiers C., Rabilloud T. 2007. Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome. *Proteomics*. 7 : 1757—1770.
- Ciechanover A., Schwartz A. L. 2004. The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim. biophys. acta*. 1695 : 3—17.
- Collins G. A., Tansey W. P. 2006. The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr. Opin. Genet. Develop*. 16 : 197—202.
- De Martino M., Hoetzenecker K., Ankersmit H. J., Roth G. A., Haitel A., Waldert M., Klatt T. 2012. Serum 20S proteasome is elevated in patients with renal cell carcinoma and associated with poor prognosis. *Br. J. Cancer*. 106 : 904—908.
- Dutaud D., Aubry L., Henry L., Leveux D., Hendil K. B., Kuehn L., Bureau J. P., Ouali A. 2002. Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. *J. Immunol. Methods*. 260 : 183—193.
- Egerer K., Kuckelkorn U., Rudolph P. E., Rückert J. C., Dörner T., Burmester G. R., Kloetzel P. M., Feist E. 2002. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J. Rheumatol*. 29 : 2045—2052.
- Ferdous A., Sikder D., Gillette T., Nalley K., Kodadek T., Johnston S. A. 2007. The role of the proteasomal ATPases and activator monoubiquitylation in regulating Gal4 binding to promoters. *Genes Develop*. 21 : 112—123.
- Frittoli E., Palamidessi A., Disanza A., Scita G. 2011. Secretory and endo/exocytic trafficking in invadopodia formation: the MT1-MMP paradigm. *Eur. J. Cell Biol*. 90 : 108—114.
- Groll M., Bajorek M., Kohler A., Moroder L., Rubin D. M., Huber R., Glickman M. H., Finley D. 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol*. 7 : 1062—1067.
- Henry L., Baz A., Chateau M. T., Scherrer K., Bureau J. P. 1996. Changes in the amount and distribution of prosomal subunits during the differentiation of U937 myeloid cells: high expression of p23K. *Cell Prolif*. 29 : 589—607.
- Henry L., Fabre C., Guiraud I., Bastide S., Fabbro-Peray P., Martinez J., Lavabre-Bertrand T., Meunier L., Stoebner P. E. 2013. Clinical use of p-proteasome in discriminating metastatic melanoma patients: Comparative study with LDH, MIA and S100B protein. *Int. J. Cancer*. 133 : 142—148.
- Henry L., Lavabre-Bertrand T., Douche T., Uttenweiler-Joseph S., Fabbro-Peray P., Monsarrat B., Martinez J., Meunier L., Stoebner P. E. 2010. Diagnostic value and prognostic significance of plasmatic proteasome level in patients with melanoma. *Exp. Dermatol*. 19 : 1054—1059.
- Henry L., Lavabre-Bertrand T., Vercambre L., Ramos J., Carrillo S., Guiraud I., Poudroux P., Bismuth M., Valats J. C., Demattei C., Duny Y., Chaze I., Funakoshi N., Bureau J. P., Daurès J. P., Blanc P. 2009. Plasma proteasome level is a reliable early marker of malignant transformation of liver cirrhosis. *Gut*. 58 : 833—838.
- Henry L., Le Gallic L., Garcin G., Coux O., Jumez N., Rogger P., Lavabre-Bertrand T., Martinez J., Meunier L., Stoebner P. E. 2011. Proteolytic activity and expression of the 20S proteasome are increased in psoriasis lesional skin. *Br. J. Dermatol*. 165 : 311—320.
- Heubner M., Wimberger P., Dahlmann B., Kasimir-Bauer S., Kimmig R., Peters J., Wohlschlaeger J., Sixt S. U. 2011. The prognostic impact of circulating proteasome concentrations in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol*. 120 : 233—238.
- Hoffmann O., Heubner M., Anlasik T., Winterhalter M., Dahlmann B., Kasimir-Bauer S., Kimmig R., Wohlschlaeger J., Sixt S. U. 2011. Circulating 20S proteasome in patients with non-metastasized breast cancer. *Anticancer Res*. 31 : 2197—2201.
- Hori H., Nembai T., Miyata Y., Hayashi T., Ueno K., Koide T. 1999. Isolation and characterization of two 20S proteasomes from the endoplasmic reticulum of rat liver microsomes. *J. Biochem*. 126 : 722—730.
- Jakob C., Egerer K., Liebisch P., Turkmen S., Zavrski I., Kuckelkorn U., Heider U., Kaiser M., Fleissner C., Sterz J., Kleeburg L., Feist E., Burmester G. R., Kloetzel P. M., Sezer O. 2007. Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma. *Blood*. 109 : 2100—2105.
- Kloetzel P. M. 2004. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim. biophys. acta*. 1695 : 225—233.
- Konstantinova I. M., Tsimokha A. S., Mittenberg A. G. 2008. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol*. 267 : 59—124.
- Kumatori A., Tanaka K., Inamura N., Sone S., Ogura T., Matsumoto T., Tachikawa T., Shin S., Ichihara A. 1990. Abnormally

high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 87 : 7071—7075.

Lai R. C., Tan S. S., Teh B. J., Sze S. K., Arslan F., de Kleijn D. P., Choo A., Lim S. K. 2012. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. *Int. J. Proteomics.* 2012 : 971—907.

Lavabre-Bertrand T., Henry L., Carillo S., Guiraud I., Ouali A., Dutaud D., Aubry L., Rossi J. F., Bureau J. P. 2001. Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies. *Cancer.* 2 : 2493—2500.

Ma W., Kantarjian H., O'Brien S., Jilani I., Zhang X., Estrov Z., Ferrajoli A., Keating M., Giles F., Albitar M. 2008. Enzymatic activity of circulating proteasomes correlates with clinical behavior in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 112 : 1306—1312.

Majetschak M., Sorell L. T. 2008. Immunological methods to quantify and characterize proteasome complexes: development and application. *J. Immunol. Methods.* 334 : 91—103.

Majetschak M., Sorell L. T., Patricelli T., Seitz D. H., Knoferl M. W. 2009. Detection and possible role of proteasomes in the bronchoalveolar space of the injured lung. *Physiol. Res.* 58 : 363—372.

Majetschak M., Zedler S., Romero J., Albright J. M., Kraft R., Kovacs E. J., Faist E., Gamelli R. L. 2010. Circulating proteasomes after burn injury. *J. Burn. Care Res.* 31 : 243—250.

Maupin-Furlow J. A., Humbar M. A., Kirkland P. A., Li W., Reuter C. J., Wright A. J., Zhou G. 2006. Proteasomes from structure to function: perspectives from Archaea. *Curr. Top. Develop. Biol.* 75 : 125—169.

Mountz J. D. 2002. Significance of increased circulating proteasome in autoimmune disease. *J. Rheumatol.* 29 : 2027—2030.

Mueller O., Anlasik T., Wiedemann J., Thomassen J., Wohlschlaeger J., Hagel V., Keyvani K., Schwieger I., Dahlmann B., Sure U., Sixt S. U. 2012. Circulating extracellular proteasome in the cerebrospinal fluid: a study on concentration and proteolytic activity. *J. Mol. Neurosci.* 46 : 509—515.

Newman R. H., Whitehead P., Lally J., Coffey A., Freemont P. 1996. 20S human proteasomes bind with a specific orientation to lipid monolayers *in vitro*. *Biochim. biophys. acta.* 1281 : 111—116.

Nickel W. 2005. Unconventional secretory routes: direct protease export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic.* 6 : 607—614.

Olanow C. W., McNaught K. S. 2006. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 21 : 1806—1823.

Orlowski M., Wilk S. 2000. Catalytic activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 383 : 1—16.

Reed S. I. 2006. The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control. *Results Probl. Cell Differ.* 42 : 147—181.

Rivett A. J., Palmer A., Knecht E. 1992. Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* 40 : 1165—1172.

Roth G. A., Moser B., Krenn C., Roth-Walter F., Hetz H., Richter S., Brunner M., Jensen-Jarolim E., Wolner E., Hoetzenecker K., Boltz-Nitulescu G., Ankersmit H. J. 2005. Heightened levels of circulating 20S proteasome in critically ill patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 35 : 399—403.

Schiarea S., Solinas G., Allavena P., Scigliuolo G. M., Bagnati R., Fanelli R., Chiabrando C. 2010. Secretome analysis of multiple pancreatic cancer cell lines reveals perturbations of key functional networks. *J. Proteome Res.* 9 : 4376—4392.

Sikder D., Johnston S. A., Kodadek T. 2006. Widespread, but non-identical, association of proteasomal 19 and 20 S proteins with yeast chromatin. *J. Biol. Chem.* 281 : 27 346—27 355.

Sixt S. U., Adamzik M., Szyrka D., Saul B., Hakenbeck J., Wohlschlaeger J., Costabel U., Kloss A., Giesebrecht J., Dahlmann B., Peters J. 2009. Alveolar extracellular 20S proteasome in patients with acute respiratory distress syndrome. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 179 : 1098—1106.

Sixt S. U., Alami R., Hakenbeck J., Adamzik M., Kloss A., Costabel U., Jungblut P. R., Dahlmann B., Peters J. 2012. Distinct proteasome subpopulations in the alveolar space of patients with the acute respiratory distress syndrome. *Mediators Inflamm.* 2012 : 204—250.

Sixt S. U., Beiderlinden M., Jennissen H. P., Peters J. 2007. Extracellular proteasome in the human alveolar space: a new housekeeping enzyme? *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 292 : L1280—L1288.

Sixt S. U., Dahlmann B. 2008. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin-incidence and relevance. *Biochim. biophys. acta.* 1782 : 817—823.

Sixt S. U., Peters J. 2010. Extracellular alveolar proteasome: possible role in lung injury and repair. *Proc. Amer. Thorac. Soc.* 7 : 91—96.

Sohn D., Totzke G., Essmann F., Schulze-Osthoff K., Levkau B., Janicke R. U. 2006a. The proteasome is required for rapid initiation of death receptor-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 26 : 1967—1978.

Sohn D., Totzke G., Schulze-Osthoff K., Janicke R. U. 2006b. Friend or foe? The proteasome in combined cancer therapy. *Cell Cycle.* 5 : 841—845.

Stoebner P. E., Lavabre-Bertrand T., Henry L., Guiraud I., Carillo S., Dandurand M., Joujoux J. M., Bureau J. P., Meunier L. 2005. High plasma proteasome levels are detected in patients with metastatic malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.* 152 : 948—953.

Teicher B. A., Ara G., Herbst R., Palombella V. J., Adams J. 1999. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 5 : 2638—2645.

Vogel S. M., Bauer M. R., Joerger A. C., Wilcken R., Brandt T., Veprintsev D. B., Rutherford T. J., Fersht A. R., Boeckler F. M. 2012. Lithocholic acid is an endogenous inhibitor of MDM4 and MDM2. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 109 : 16 906—16 910.

Wada M., Kosaka M., Saito S., Sano T., Tanaka K., Ichihara A. 1993. Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiologic significance. *J. Lab. Clin. Med.* 121 : 215—223.

Wojcik C., Benchaib M., Lornage J., Czyba J. C., Guerin J. F. 2000. Proteasomes in human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 23 : 169—177.

Wojcik C., DeMartino G. N. 2003. Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 : 579—589.

Wolf D. H., Hilt W. 2004. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim. biophys. acta.* 1695 : 19—31.

Yang W., Monroe J., Zhang Y., George D., Bremer E., Li H. 2006. Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 243 : 217—227.

Zoeger A., Blau M., Egerer K., Feist E., Dahlmann B. 2006. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clin. Chem.* 52 : 2079—2086.

## PROTEASOMES AND THEIR ROLE IN THE EXTRACELLULAR SPACE

*Yu. Ya. Zaykova, I. N. Evteeva, A. S. Tsimokha*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru, vat-julia@yandex.ru

The presented review concerns the intracellular proteasome and their possible functions. The ubiquitin-proteasome system (UPS) is responsible for the common regulated proteolysis in the cell. 26S proteasome is a central proteolytic unit of UPS and is a multisubunit protein complex consisting of a core catalytic complex, called 20S proteasome, capped at one or both ends by 19S regulatory complex. Proteasomes have been shown in the extracellular space: in alveolar and cerebrospinal fluids, blood plasma. Extracellular proteasomes are intact intracellular particles that exhibit three types of specific peptidase activity. Extracellular proteasomes have been detected in both healthy people and patients with different diseases. Its concentration has been found to be increased in patients suffering from autoimmune diseases, malignant tumors, trauma or sepsis and to correlate with the disease progression, which has both diagnostic and prognostic value.

**Key words:** circulating proteasomes, exosomes, extracellular proteasome, proteasomes, proteolysis, ubiquitin-proteasome system.

---