

УДК 57.017.642, 577.112.7, 577.218

Протеасомы в регуляции белкового гомеостаза плюрипотентных стволовых клеток

А. В. Селенина^{1,2}, А. С. Цимоха^{1*}, А. Н. Томилин^{1,2*}¹Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4²Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: #atsimokha@incras.ru; *a.tomilin@incras.ru

Поступила в редакцию 09.12.2016

Принята к печати 04.09.2017

РЕФЕРАТ Эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки представляют интерес не только для фундаментальных исследований, но и для медицины, в первую очередь, регенеративной медицины. Несмотря на большой интерес к плюрипотентным клеткам, механизмы поддержания в них белкового гомеостаза с помощью убиквитин-протеасомной системы изучены крайне слабо. Считается, что посредством посттрансляционных модификаций белков и их деградации в протеасомах убиквитин-протеасомная система контролирует практически все основные клеточные процессы: клеточный цикл, самообновление, передачу сигнала, транскрипцию, трансляцию, окислительный стресс, иммунный ответ, апоптоз и др. Поэтому изучение роли убиквитин-протеасомной системы и механизмов ее работы в плюрипотентных клетках позволит не только лучше понять их биологию, но также ляжет в основу новых подходов в регенеративной медицине.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА иммунопротеасома, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, протеасома, убиквитин-протеасомная система, эмбриональные стволовые клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИП – иммунопротеасома; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МЭФ – мышинные эмбриональные фибробласты; СЕ – субъединица; УПС – убиквитин-протеасомная система; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) – это культивируемые клетки, получаемые из клеток раннего эпибласта (первичной эктодермы) преимплантационных эмбрионов млекопитающих. ЭСК могут делиться в культуре бесконечно долго, не подвергаясь процессам старения и сохраняя свое недифференцированное состояние и способность дифференцироваться во все клеточные типы, за исключением двух внезародышевых (трофобласта и первичной эндодермы) [1, 2]. Исследование молекулярных механизмов контроля плюрипотентности в настоящий момент является одной из наиболее актуальных тем биологии. Изучение генно-регуляторных (транскрипционных) сетей занимает важное место в изучении плюрипотентности и выхода из этого клеточного состояния посредством дифференцировки. Уровень экспрессии транскрипционных факторов, таких, как Oct4, c-Myc, Nanog, Klf4 и Sox2, – важное регулирующее событие в судьбе плюрипотентных стволовых клеток [3–6]. Даже самые небольшие изменения в уровне экспрес-

сии этих транскрипционных факторов посредством взаимодействия с другими регуляторными белками могут приводить к дифференцировке или онкогенезу [4, 7–13]. Модификаторы хроматина и системы, обеспечивающие стабильность генома, также играют ключевую роль в функционировании ЭСК [14, 15]. Способность ЭСК избегать репликативного старения и в то же время поддерживать плюрипотентное состояние обеспечивается определенными клеточными системами контроля, которые работают в высокоинтенсивном режиме в данных клетках [3]. Так как именно плюрипотентные клетки раннего эпибласта (природные аналоги ЭСК) дают начало всему организму, включая зародышевую линию, они должны иметь жестко отлаженные процессы защиты генома от мутаций. Согласно некоторым исследованиям, ЭСК показывают повышенную устойчивость к повреждениям ДНК и низкую частоту геномных мутаций по сравнению с дифференцированными клетками [16–18]. Кроме того, ЭСК не только производят меньше активных форм кислорода [14, 19],

но также имеют механизмы, позволяющие избавляться от накопления гено- и протеотоксичных факторов [20]. Несмотря на большой интерес к исследованиям в области регуляции повреждений ДНК и ответа на окислительный стресс, новые данные показывают, что поддержание белкового гомеостаза играет одну из центральных ролей в функционировании ЭСК [21, 22]. Белковый гомеостаз представляет собой сложную сеть интегрированных и конкурирующих путей, которые поддерживают стабильность протеома клетки [23]. Данная сеть регулирует все клеточные процессы, вовлеченные в жизненный цикл белков, включая их синтез, фолдинг, перемещение, взаимодействие и деградацию. Нарушения в белковом гомеостазе приводят к накоплению поврежденных белков, которые, в свою очередь, негативно влияют на бессмертие и самообновление ЭСК [20]. Поэтому очевидно, что ЭСК должны иметь точно отрегулированный механизм поддержания белкового гомеостаза. Известно, например, что ЭСК чрезвычайно чувствительны к изменениям в транскрипции и деградации/фолдингу белков [24, 25]. Некоторые исследователи утверждают, что утрата регуляции белкового гомеостаза – отличительная черта старения, поэтому изучение ЭСК способствует пониманию такого явления, как возрастное понижение целостности протеома [26, 27]. Из-за некоторого сходства ЭСК и трансформированных клеток четкое понимание белкового гомеостаза ЭСК также может внести вклад в изучение онкологических заболеваний [27].

Одним из важных и открытых вопросов является получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) в процессе соматического репрограммирования [28, 29]. Обнаружение возможности получения иПСК из мышечных фибробластов с помощью форсированной экспрессии ключевых транскрипционных факторов – Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc – внесло неосценимый вклад в понимание молекулярных механизмов клеточного репрограммирования и открыло новые подходы к альтернативным исследованиям, неосуществимым по ряду причин на модельных животных [28, 29]. иПСК обладают сходной с ЭСК морфологией, пролиферативной способностью, набором эндогенных маркеров плюрипотентности и способны дифференцироваться *in vivo* и *in vitro* [30–32]. В настоящее время наибольшей эффективности репрограммирования достигают с помощью вирусной доставки факторов репрограммирования [28, 33–37]. Дальнейший прогресс в применении данной технологии в научных исследованиях и/или в медицине будет зависеть от возможности получать иПСК в отсутствие геномных модификаций. Некоторые исследования уже достигли определенных успехов в решении этой проблемы, например,

показана возможность репрограммирования с помощью эписомных векторов, таких, как аденовирусы, транспозоны, очищенные белки, модифицированные РНК, микроРНК и т.д. [34]. Несмотря на несомненный прогресс в получении иПСК, все еще необходимы знания и технологии, которые могли бы повысить эту эффективность и сделать процесс репрограммирования более безопасным и предсказуемым.

УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА

Убиквитин-протеасомная система (УПС) – ключевой участник поддержания белкового гомеостаза. УПС представляет собой протеолитический аппарат эукариотической клетки, регулирующий основные клеточные процессы, такие, как клеточный цикл, передача сигнала, транскрипция, трансляция, окислительный стресс, иммунный ответ и апоптоз [38, 39]. Функционирование УПС осуществляется через посттрансляционные модификации, которые образуются путем ковалентного присоединения убиквитина, организованного АТР-зависимым каскадом убиквитин-активирующих ферментов (E1), убиквитин-конъюгирующих ферментов (E2) и убиквитин-лигаз (E3) (рис. 1А) [40, 41]. Одиночный E1-фермент может взаимодействовать со всем многообразием E2-ферментов, а дальнейшие комбинации между E2 и E3 обеспечивают субстратную специфичность и регуляцию нижестоящих процессов. Моноубиквитинирование представляет собой метку для передачи сигнала и эндоцитоза, в то время как полиубиквитинирование приводит к АТР-зависимой деградации белка в протеасоме [42, 43]. УПС участвует в поддержании белкового гомеостаза как в течение жизни клетки, так и во время ее смерти; играет важную роль и в здоровых, и в больных клетках, например, при нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Альцгеймера), при сердечных дисфункциях (транзиторная ишемическая атака) или при аутоиммунных заболеваниях (синдром Шегрена) [44]. Важным компонентом УПС является мультисубъединичный протеолитический комплекс – протеасома (рис. 1Б). Центральная коровая часть протеасомы – 20S частица – представляет собой полый бочонок, состоящий из четырех колец, каждое из которых включает семь субъединиц (SE) α - или β -типов ($7\alpha, 7\beta, 7\beta, 7\alpha$). В клетках эукариот только три SE β -типа несут активный треониновый сайт (Thr1) на N-конце [45]: SE $\beta 1$ /PSMB6 обладает активностью по типу каспазы, $\beta 2$ /PSMB7 – трипсина и $\beta 5$ /PSMB5 – химотрипсина [39, 41, 46]. Коровая 20S частица может взаимодействовать с одной или двумя регуляторными 19S частицами, таким образом формируется 26S или 30S протеасома (рис. 2) [39]. Регуляторный комплекс 19S сформирован из «ос-

А

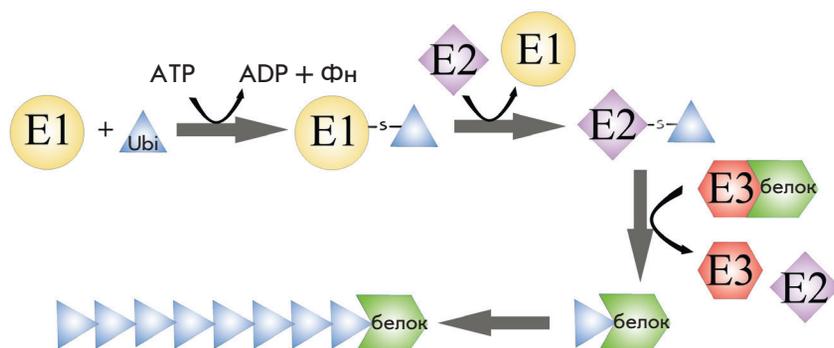
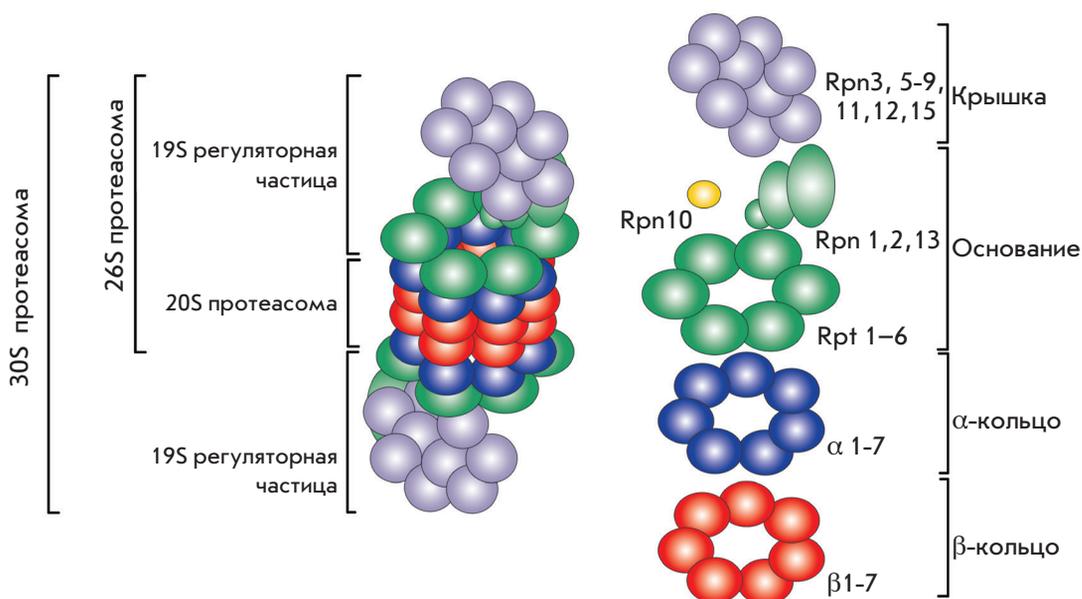


Рис. 1. Убиквитин-протеасомная система. А – ковалентное присоединение убиквитина АТР-зависимым каскадом убиквитин-активирующих ферментов (E1), убиквитин-конъюгирующих ферментов (E2) и убиквитин-лигаз (E3). Б – структура протеасомы (пояснения в тексте)

Б



нования» и «крышки», содержащих 18 СЕ, 13 из которых АТР-независимые (Rpn), а остальные шесть представляют собой ААА-АТР-азные (Rpt) [47]. Функции «крышки» регуляторной частицы 19S заключаются в захвате полиубиквитинированных белков с помощью СЕ Rpn10/PSMD4 и Rpn13/ADRM1 и последующем деубиквитинировании захваченного белка. «Основание» обеспечивает разворачивание белка, открытие ворот, сформированных α-кольцом, и пропускание белка в каталитическую полость 20S протеасомы [39, 47, 48]. 20S протеасома функционирует независимо от АТР, однако, она может взаимодействовать с полиубиквитинированными белками, как и 26S протеасома, но механизмы этого процесса еще не изучены [49]. 20S частица может активироваться не только за счет 19S частиц, но и с помощью другого регулятора – PA200 (рис. 2) [50]. Этот белок также связывается с 20S протеасомой, однако функции PA200 и механизмы регуляции мало изучены.

Известно, что этот белок преимущественно находится в ядре, способен увеличивать продукцию более коротких пептидов протеасомой, обеспечивать деградацию окисленных белков в процессе адаптации клетки к окислительному стрессу. Кроме того, экспрессия PA200 увеличивается в ответ на ионизирующее излучение [50]. Существует еще один регулятор активности протеасомы – PA28 (рис. 2), представляющей собой гетерогексамерный или гетерогептамерный комплекс, состоящий из трех СЕ PA28α и трех СЕ PA28β – PA28α3β3, или PA28α3β4, или PA28α4β3 [51]. С-Концы СЕ PA28 могут встраиваться в межсубъединичный карман между α-СЕ и таким образом контролировать и стабилизировать открытие ворот α-кольца, особенно во время иммунного ответа [39, 52]. Взаимодействие клеток с медиаторами воспаления провоцирует замену конститутивных СЕ β1/PSMB6, β2/PSMB7 и β5/PSMB5 индуцибельными каталитическими СЕ β1i/PSMB9, β2i/PSMB10 и β5i/

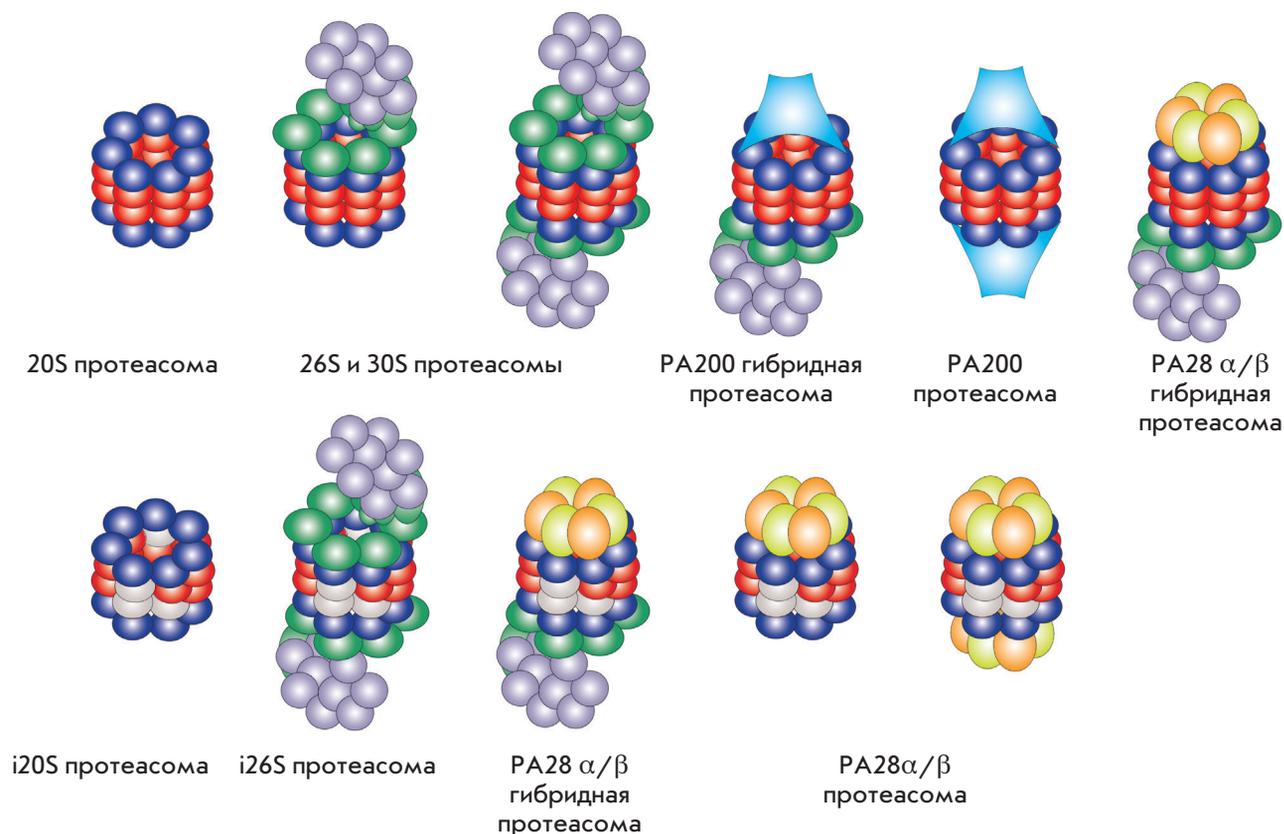


Рис. 2. Разнообразие протеасом в клетке млекопитающих. Каталитически активная 20S протеасома состоит из 4 колец, каждое из которых включает 7 субъединиц α - (синий цвет) или β -типов (7α , 7β , 7β , 7α , красный цвет). В особых условиях конститутивные каталитические субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ замещаются на индуцибельные $\beta 1i$, $\beta 2i$ и $\beta 5i$ (светло-серый цвет), формируя иммунопротеасому (i20S). 20S протеасома может взаимодействовать с одной или двумя регуляторными частицами 19S (фиолетовый и зеленый цвета), образуя соответственно 26S или 30S протеасомы, а также с другими регуляторными комплексами PA200 (голубой цвет) и PA28 (желтый и оранжевый цвета), формируя гибридные протеасомы. Иммунопротеасома также может взаимодействовать с регуляторами 19S и PA28, формируя гибридные формы, различающиеся по своей активности и специфичности (пояснения в тексте)

PSMB8. В таком случае протеасому называют иммунопротеасомой (ИП) (рис. 2). Замена каталитически активных SE меняет пептидазные активности протеасомы, увеличивая эффективность формирования эпитопов для главного комплекса гистосовместимости I (МНС I) [53–56]. Вариации эпитопов, производимых ИП, обусловлены расщеплением белков после основных и гидрофобных аминокислотных остатков (трипсин- и химотрипсин-подобные активности), тогда как расщепление после кислых аминокислотных остатков (каспаза-подобная активность), согласно некоторым источникам, отсутствует [49]. Первый скрининг транскрипционно-активных генов в ЭСК человека (чЭСК) выявил около 900 наиболее активных генов, в том числе ген индуцибельной протеа-

сомной SE $\beta 5i$ /PSMB8 [57]. В дальнейшем в транскриптомном профиле чЭСК обнаружили и другие гены УПС, что подтверждает гипотезу о роли этой системы и белкового гомеостаза в поддержании плюрипотентности ЭСК [58, 59].

ПРОТЕАСОМЫ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ

Плюрипотентные клетки, как уже упоминалось, способны давать начало клеткам всех типов, присутствующих в организме, и это предполагает существование жесткого контроля над самообновлением и плюрипотентностью. Эта программа включает транскрипционные факторы, сигнальные пути и микроРНК, тесно взаимодействующие с системой ре-

гуляторных белков и других специфических белков, участвующих в формировании структуры хроматина. Такое взаимодействие формирует уникальное состояние хроматина в плюрипотентных клетках [60]. Примечательно, что ингибирование протеолитической активности протеасом или нокдаун отдельных СЕ протеасом в ЭСК мыши (мЭСК) приводит к активации обычно неактивных криптических («скрытых») промоторов [61]. Показано также, что 19S комплекс регулирует экспрессию генов независимо от протеолитической активности протеасомы. Так, в мЭСК СЕ «крышки» Rpn12/PSMD8 контролирует сборку преинициаторного комплекса транскрипции, но только в присутствии СЕ «основания» Rpt3/PSMC4 [61]. Таким образом, протеасома действует в мЭСК как транскрипционный репрессор, предотвращая aberrantную инициацию транскрипции, которая, в свою очередь, могла бы привести к несанкционированному выходу из состояния плюрипотентности.

УПС активно участвует в регуляции уровня и (или) функционирования различных регуляторных белков в стволовых и половых клетках млекопитающих, особенно тех белков, которые участвуют не только в регуляции транскрипции, но и в работе сигнальных каскадов [22]. Быстрая модуляция времени жизни этих факторов позволяет стволовым клеткам реагировать на поступающие из окружающей среды сигналы, в ответ на которые они или сохраняют свойства плюрипотентности, или приступают к реализации программы дифференцировки. При участии УПС функционируют различные сигнальные пути: LIF/JAK/STAT3, Nodal/TGF β /активин, Wnt/ β -катенин, Notch и BMP. УПС вовлечена также в регуляцию активности транскрипционных факторов, таких, как Rel, и белков семейства GATA в различных стволовых и прогениторных клетках [62–66]. Примечательно, что все эти сигнальные каскады участвуют в регуляции клеточной плюрипотентности.

Замечено, что накапливающиеся в мЭСК белки, поврежденные активными формами кислорода, убиквитинированы, а значит, в дальнейшем должны подвергаться протеасомной деградации [67, 68]. Тем не менее, оказалось, что 20S протеасома уменьшает количество окисленных белков по АТР- и убиквитин-независимому пути [67]. Обнаружено также, что в деградации окисленных белков участвуют не только 20S протеасомы, но и ИП [69], что предполагает повышенную экспрессию индуцибельных СЕ и белков комплекса PA28 в мЭСК. Однако повышение уровней белков β 5i/PSMB8 и PA28 α/β было замечено лишь в процессе дифференцировки мЭСК [52]. Интересно, что в соматических клетках мыши, таких, как фибробласты кожи, эмбриональные фибробласты (МЭФ), клетки печени и мозговой ткани, уровень окислен-

ных белков зависит от активности ИП и гибридных PA28 протеасом [69–71]. Все это доказывает, что ИП и регулятор PA28 играют важную роль в деградации окисленных белков в соматических клетках и в процессе дифференцировки мЭСК, но не в самих плюрипотентных клетках.

Возможность получения ИПСК поставила еще один важный вопрос о роли УПС в процессе репрограммирования и в индукции плюрипотентности. Показано, что факторы плюрипотентности Oct4, Sox2, Nanog и c-Myc, а также Dax1, Rex1, Dnmt3l и Msh6 убиквитинируются [21, 72]. Более того, ингибирование протеасомной активности с помощью обратимого ингибитора MG132 вызывает сильное снижение эффективности репрограммирования МЭФ (наши неопубликованные данные) вплоть до полного ингибирования [21]. Важно иметь в виду, что не только убиквитинирование, но и фосфорилирование играет важную роль в поддержании самообновления и плюрипотентности мЭСК. Так, в числе идентифицированных фосфорилированных и убиквитинированных белков (всего более 280), немало так или иначе связанных с плюрипотентностью [21]. Известно, что УПС вовлечена в регуляцию клеточного цикла [73]. Убиквитин-лигаза Fbw7/Fbxw7, например, может направлять на деградацию важные регуляторы жизненного цикла клетки, такие, как c-Myc, c-Jun, циклин-Е и Notch [74]. Интересно, что, несмотря на одинаковый уровень этого белка в мЭСК и фибробластах, экспрессия Fbw7 увеличивается, а c-Myc снижается в процессе дифференцировки мЭСК. Кроме того, нокдаун Fbw7 в мЭСК вызывает повышение экспрессии c-Myc, Oct4, Nanog и Sox2 на ранних стадиях дифференцировки, а подавление экспрессии Fbxw7 в процессе репрограммирования приводит к повышению эффективности получения ИПСК [21]. В регуляцию плюрипотентности вовлечены не только убиквитин-лигазы E3, но также и СЕ регулятора 19S. Деубиквитинирующий белок Rpn11/PSMD14 этого регулятора является решающим фактором в поддержании плюрипотентности. Так, экспрессия Rpn11/PSMD14 падает при дифференцировке мЭСК, а нокдаун этой СЕ в МЭФ ингибирует их репрограммирование в ИПСК [21]. Интересно, что сверхэкспрессия Rpn11/PSMD14 в мЭСК предотвращала дифференцировку, удерживая клетки в состоянии плюрипотентности. Согласно нашим данным, в процессе репрограммирования наблюдается усиление экспрессии индуцибельных СЕ протеасом β 5i/PSMB8 и β 1i/PSMB9, причем ингибирование активности СЕ β 5i/PSMB8 снижало эффективность получения ИПСК (наши неопубликованные данные), что свидетельствует об участии ИП в репрограммировании.

ПРОТЕАСОМЫ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Анализ транскриптома с использованием микрочипов при нокадауне *Oct4* в чЭСК линии H1 выявил достоверное изменение уровней экспрессии 18 генов, связанных с УПС [75]. Причем известно, что ингибирование активности протеасом в чЭСК приводит к различным последствиям. Так, например, обратимый ингибитор протеасом MG132 влияет только на плюрипотентные стволовые, но не соматические клетки [24, 58, 76]. Различные временные интервалы воздействия (от 20 мин до 10 ч) даже высоких концентраций протеасомных ингибиторов (20 мкМ MG132 и 10 мкМ лактацитина) не изменяли ни жизнеспособность клеток, ни их морфологию [24, 61]. Интересно, что присутствие ингибитора протеасом MG132 даже в низких дозах полностью ингибировало репрограммирование МЭФ в иПСК [21] и снижало клонообразование в процессе репрограммирования фибробластов человека на фоне повышения экспрессии генов *Oct4* и *Nanog* [77]. Ингибирование активности протеасом в плюрипотентных клетках приводило к подавлению экспрессии генов плюрипотентности, таких, как *Oct4*, *Nanog*, *c-Myc*, *Sox2*, *SSEA-3*, *Tra-1-81* и *Tra-1-60*, в результате чего происходила потеря возможности самообновления при одновременной активации экспрессии генов дифференцировки, таких, как *FGF5* и *GATA4* [24, 58, 76].

Подобно СЕ «крышки» Rpn11/PSMD14 мыши, в чЭСК играет важную роль другая СЕ «крышки» – Rpn6/PSMD11. Данная СЕ стабилизирует весь 26S протеасомный комплекс, повышая сродство регулятора 19S к 20S частице через взаимодействие с СЕ $\alpha 2$ /PSMA2 [24]. Уровень экспрессии белка Rpn6/PSMD11 находится на высоком уровне в чЭСК и иПСК, однако, понижается при дифференцировке чЭСК в предшественники нервных клеток и в зрелые нейроны [24]. Наблюдаемое снижение экспрессии Rpn6/PSMD11 сопровождается спадом активности всей протеасомы, приводит к уменьшению числа собранных протеасомных комплексов и, следовательно, к накоплению убиквитинированных белков в клетке. Это наблюдение опять же доказывает роль протеасомы в поддержании белкового гомеостаза в плюрипотентных клетках. Анализ синтезируемых и функционально активных протеасом в чЭСК и в сравнении с предшественниками нейронов, зрелыми нейронами, фибробластами и астроцитами гиппокампа показал присутствие большего количества 26S протеасом с двумя 19S частицами (30S протеасом), в то время как свободных 20S частиц наблюдалось меньше [24]. Такие структурные перестройки протеасом вызывают понижение протеасомной активности как в полученных из чЭСК клетках (например, трофобластах),

так и в соматических клетках (например, фибробластах и клетках линии НЕК293Т). Известно, однако, что УПС играет важную роль в нейронах, особенно в передаче нервного импульса [78], поэтому до сих пор нет правдоподобного объяснения, почему в нейронах активность протеасом значительно ниже, чем в чЭСК.

В отличие от мЭСК [52, 67], плюрипотентные стволовые клетки человека содержат меньше окислительно-модифицированных белков, что выявляется при сравнении с неонатальными фибробластами человека, а также производными чЭСК и иПСК [79]. Увеличение числа свободных 20S частиц во время нейрональной дифференцировки чЭСК поднимает вопрос о том, может ли регуляторная частица PA28 принимать участие в этом процессе, как это происходит у мыши [52]. Вероятно, PA28 может взаимодействовать с 20S протеасомой, тем самым регулируя его протеолитическую активность. Однако появление комплекса PA28 должно сопровождаться и появлением индуцибельных СЕ, а следовательно, формированием ИП [69, 70]. Первоначально функционирование ИП связывают с процессингом антигенов, белковым гомеостазом и ответом на окислительный стресс [49, 70, 71]. Исследование роли ИП в поддержании плюрипотентности чЭСК показало, что во время дифференцировки этих клеток наблюдается подавление химотрипсин-подобной активности протеасом [76]. Интересно, что при дифференцировке мЭСК этот тип пептидазной активности протеасом напротив возрастает [52]. Данная активность осуществляется тремя СЕ: $\beta 5$ /PSMB5, $\beta 1i$ /PSMB9 и $\beta 5i$ /PSMB8 [56, 80, 81]. Во время дифференцировки уровень экспрессии генов конститутивных СЕ протеасомы $\beta 1$ /PSMB6, $\beta 2$ /PSMB7 снижается, однако, уровень белка $\beta 5$ /PSMB5 остается неизменным. Несмотря на выявленные изменения в экспрессии этих генов, на уровне белка изменений не происходит; в то же время наблюдается снижение экспрессии индуцибельных СЕ $\beta 1i$ /PSMB9 и $\beta 5i$ /PSMB8 как на уровне мРНК, так и на уровне белка [76]. Эти данные объясняют наблюдаемое снижение химотрипсин-подобной активности протеасом во время дифференцировки, однако, ответа на вопрос, опосредовано ли это участием ИП в поддержании плюрипотентности, до сих пор нет. С другой стороны, использование специфических для ИП ингибиторов UK101 ($\beta 1i$ /PSMB9) и PK957 ($\beta 5i$ /PSMB8) активировало экспрессию маркеров дифференцированных клеток и потерю плюрипотентности чЭСК [76], что свидетельствует о роли ИП в поддержании плюрипотентности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

УПС влияет на получение и поддержание плюрипотентности, на выход из этого состояния как челове-

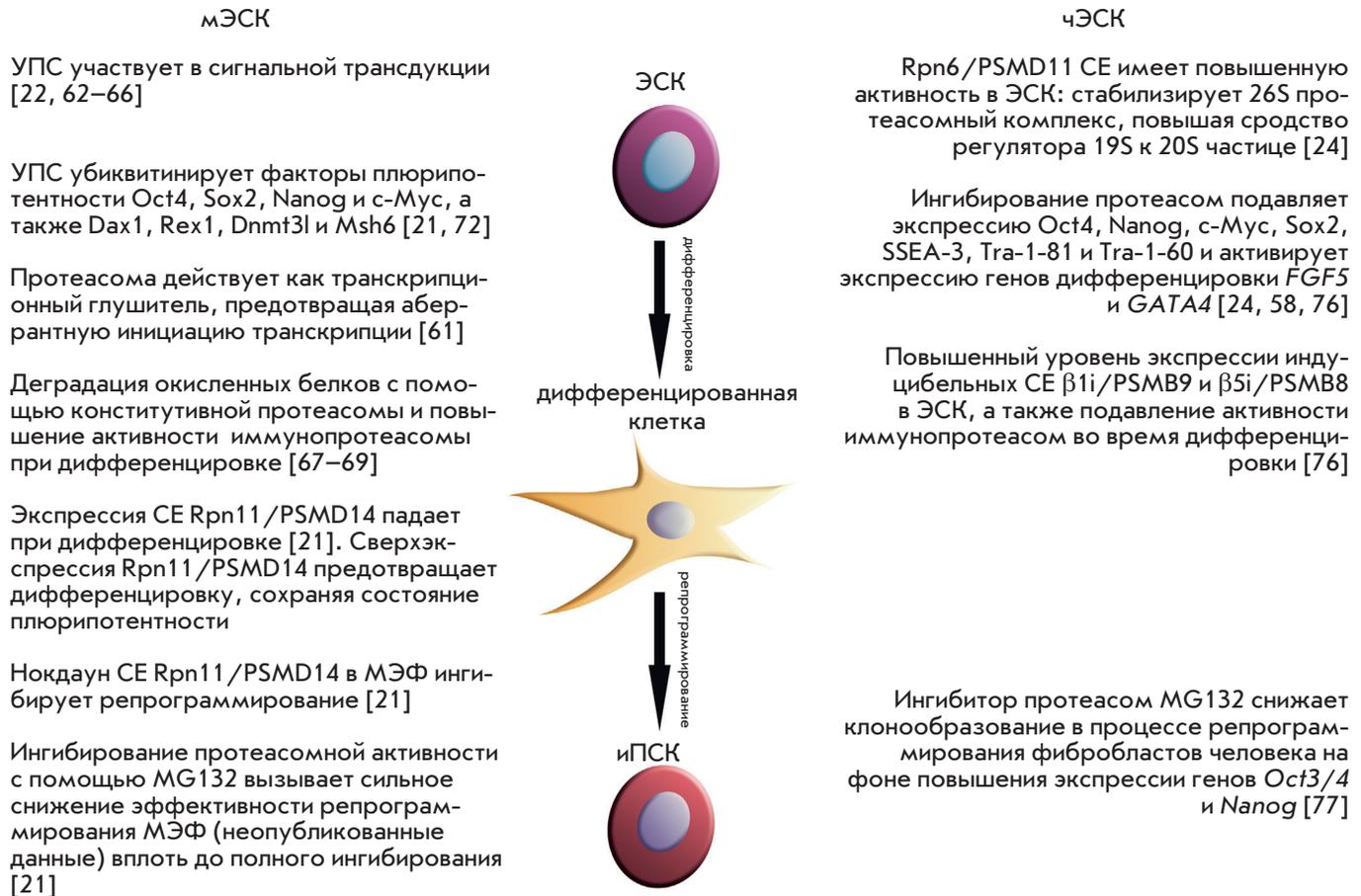


Рис. 3. Участие убиквитин-протеасомной системы (УПС) в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека, а также в ходе выхода и вхождения в состояние плюрипотентности. Суммируются наиболее важные сведения о роли УПС в указанных клеточных типах и процессах. В квадратных скобках приведены ссылки на литературу

ческих, так и мышечных клеток (рис. 3). Протеасомы и регулятор PA28 участвуют в деградации большей части окисленных белков при дифференцировке [52, 67], регулируют клеточный цикл ЭСК через E3-лигазы и деубиквитиназы [21], модулируют состояние плюрипотентности через убиквитинирование основных транскрипционных факторов плюрипотентности, например, Oct4, Nanog и c-Мус [21, 52]. Ингибирование протеасомной активности ведет к негативной регуляции факторов плюрипотентности и активации факторов, связанных с клеточной дифференцировкой [24, 58, 76]. Кроме того, ИП также принимают активное участие в поддержании белкового гомеостаза, клеточной пролиферации и дифференцировке, что говорит о том, что данные протеолитические комплексы играют немаловажную роль за пределами иммунного ответа [52, 58, 76]. На сегодняшний день функциональное значение ИП в поддержании плюрипотентности и самообновления

в ЭСК и иПСК остается по большей части неисследованным. Дальнейшие эксперименты должны внести ясность в роль данных протеолитических комплексов в индукции, поддержании и утери плюрипотентности. Также остается немало вопросов о роли УПС в таких процессах, как репрограммирование и транс-дифференцировка, ответы на которые позволят достичь больших успехов в прикладных областях медицины, включая регенеративную медицину, заместительную клеточную терапию и скрининг лекарственных препаратов [29].

Актуальной на сегодня темой является получение так называемых наивных плюрипотентных стволовых клеток человека, и в этом вопросе достигнуты определенные успехи [82, 83], однако как изменяется работа УПС, меняется ли работа протеасомы и ИП в этом процессе, пока остается неизвестным. Значение УПС определяется в быстрой модификации белков клеточного цикла, регуляции транскрип-

ции и трансляции, в контроле деградации поврежденных модифицированных белков для поддержания пролиферативного потенциала и белкового гомеостаза плюрипотентных клеток, тем не менее большая часть работы УПС в данных клетках остается неизученной.

ЭСК и иПСК имеют уникальную способность самообновления и являются плюрипотентными, т.е. они способны дифференцироваться во все типы клеток трех зародышевых листков: мезодермы, энтодермы и эктодермы [2]. ЭСК и иПСК мыши поддерживают плюрипотентность благодаря генной регуляторной сети, основанной на LIF и Wnt сигнальных путях [62], в то время как чЭСК зависят от FGF, TGF β /Nodal/

Activin сигнальных путей [63]. На сегодняшний день хорошо известно, что УПС имеет отношение к данным сигнальным путям [64–66, 84], и, таким образом, открытие новых узлов пересечения и механизмов регуляции данных путей в контексте УПС и плюрипотентных стволовых клеток является невероятно важным и требующим изучения аспектом в биологии и медицине. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда (№ 14-14-00718)
и гранта Российского фонда фундаментальных
исследований (№ 15-04-08128).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // Science. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
- Young R.A. // Cell. 2011. V. 144. № 6. P. 940–954.
- Fang L., Zhang L., Wei W., Jin X., Wang P., Tong Y., Li J., Du J.X., Wong J. // Mol. Cell. 2014. V. 55. № 4. P. 537–551.
- Sears R.C. // Cell Cycle. 2004. V. 3. № 9. P. 1131–1135.
- Xu H., Wang W., Li C., Yu H., Yang A., Wang B., Jin Y. // Cell Research. 2009. V. 19. № 5. P. 561–573.
- Tolkunova E., Malashicheva A., Parfenov V.N., Sustmann C., Grosschedl R., Tomilin A. // J. Molecular Biology. 2007. V. 374. № 5. P. 1200–1212.
- Li Y., McClintick J., Zhong L., Edenberg H.J., Yoder M.C., Chan R.J. // Blood. 2005. V. 105. № 2. P. 635–637.
- Gidekel S., Pizov G., Bergman Y., Pikarsky E. // Cancer Cell. 2003. V. 4. № 5. P. 361–370.
- Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B., Pesce M., Gentile L., Boiani M., Lomeli H., Nagy A., McLaughlin K.J., Schöler H.R. // EMBO Reports. 2004. V. 5. № 11. P. 1078–1083.
- DeVeale B., Brokman I., Mohseni P., Babak T., Yoon C., Lin A., Onishi K., Tomilin A., Pevny L., Zandstra P.W. // PLoS Genetics. 2013. V. 9. № 11. P. e1003957.
- Wu G., Han D., Gong Y., Sebastiano V., Gentile L., Singhal N., Adachi K., Fischedick G., Ortmeier C., Sinn M. // Nature Cell Biology. 2013. V. 15. № 9. P. 1089.
- Lengner C.J., Camargo F.D., Hochedlinger K., Welstead G.G., Zaidi S., Gokhale S., Scholer H.R., Tomilin A., Jaenisch R. // Cell Stem Cell. 2007. V. 1. № 4. P. 403–415.
- Saretzki G., Walter T., Atkinson S., Passos J.F., Bareth B., Keith W.N., Stewart R., Hoare S., Stojkovic M., Armstrong L. // Stem Cells. 2008. V. 26. № 2. P. 455–464.
- Watanabe A., Yamada Y., Yamanaka S. // Phil. Trans. R. Soc. B. 2013. V. 368. № 1609. P. 20120292.
- Hong Y., Cervantes R., Tichy E., Tischfield J., Stambrook P. // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2007. V. 614. № 1. P. 48–55.
- Nagaría P., Robert C., Rassool F.V. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2013. V. 1830. № 2. P. 2345–2353.
- Tichy E.D., Stambrook P.J. // Exp. Cell Res. 2008. V. 314. № 9. P. 1929–1936.
- Saretzki G., Armstrong L., Leake A., Lako M., von Zglinicki T. // Stem Cells. 2004. V. 22. № 6. P. 962–971.
- Vilchez D., Simic M.S., Dillin A. // Trends Cell Biol. 2014. V. 24. № 3. P. 161–170.
- Buckley S.M., Aranda-Orgilles B., Strikoudis A., Apostolou E., Loizou E., Moran-Crusio K., Farnsworth C.L., Koller A.A., Dasgupta R., Silva J.C. // Cell Stem Cell. 2012. V. 11. № 6. P. 783–798.
- Naujokat C., Šarić T. // Stem Cells. 2007. V. 25. № 10. P. 2408–2418.
- Powers E.T., Morimoto R.I., Dillin A., Kelly J.W., Balch W.E. // Annu Rev Biochem. 2009. V. 78. P. 959–991.
- Vilchez D., Boyer L., Morantte I., Lutz M., Merkwirth C., Joyce D., Spencer B., Page L., Masliah E., Berggren W.T. // Nature. 2012. V. 489. № 7415. P. 304–308.
- You K.T., Park J., Kim V.N. // Genes Dev. 2015. V. 29. № 19. P. 2004–2009.
- López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. // Cell. 2013. V. 153. № 6. P. 1194–1217.
- Finkel T., Serrano M., Blasco M.A. // Nature. 2007. V. 448. № 7155. P. 767–774.
- Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
- Шнайдер Т., Фишман В., Лисковых М., Понамарцев С., Серов О., Томили А., Аленина Н. // Цитология. 2014. Т. 56. № 12. С. 869–880.
- Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachechko R., Tchieu J., Jaenisch R. // Cell Stem Cell. 2007. V. 1. № 1. P. 55–70.
- Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. // Nature. 2007. V. 448. № 7151. P. 318–324.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R. // Science. 2007. V. 318. № 5858. P. 1917–1920.
- Carey B.W., Markoulaki S., Hanna J., Saha K., Gao Q., Mitalipova M., Jaenisch R. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009. V. 106. № 1. P. 157–162.
- González F., Boué S., Belmonte J.C.I. // Nature Reviews Genetics. 2011. V. 12. № 4. P. 231–242.
- Theunissen T.W., Jaenisch R. // Cell Stem Cell. 2014. V. 14. № 6. P. 720–734.
- Liskovych M., Chuykin I., Ranjan A., Safina D., Popova E., Tolkunova E., Mosienko V., Minina J.M., Zhdanova N.S., Mullins J.J. // PLoS One. 2011. V. 6. № 11. P. e27345.

37. Kostina A.S., Uspensky V.E., Irtyuga O.B., Ignatieva E.V., Freylikhman O., Gavriiliuk N.D., Moiseeva O.M., Zhuk S., Tomilin A., Kostareva A.A. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2016. V. 1862. № 4. P. 733–740.
38. Kloetzel P.-M., Soza A., Stohwasser R. // *Biol. Chem.* 1999. V. 380. № 3. P. 293–297.
39. Tanaka K. // *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2009. V. 85. № 1. P. 12–36.
40. Glickman M.H., Ciechanover A. // *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. № 2. P. 373–428.
41. Цимоха А.С. // *Цитология*. 2010. Т. 52. № 4. С. 277–300.
42. Mukhopadhyay D., Riezman H. // *Science*. 2007. V. 315. № 5809. P. 201–205.
43. Seifert U., Krüger E. // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. V. 36. № 5. P. 879–884.
44. Dahlmann B. // *BMC Biochemistry*. 2007. V. 8. № 1. P. 1.
45. Fenteany G., Standaert R.F., Lane W.S., Choi S. // *Science*. 1995. V. 268. № 5211. P. 726.
46. Orlowski M., Wilk S. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. V. 383. № 1. P. 1–16.
47. da Fonseca P.C., He J., Morris E.P. // *Mol. Cell*. 2012. V. 46. № 1. P. 54–66.
48. Smith D.M., Chang S.-C., Park S., Finley D., Cheng Y., Goldberg A.L. // *Mol. Cell*. 2007. V. 27. № 5. P. 731–744.
49. Ebstein F., Kloetzel P.M., Krüger E., Seifert U. // *Cell Mol. Life Sci.* 2012. V. 69. № 15. P. 2543–2558.
50. Pickering A.M., Davies K.J. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2012. V. 523. № 2. P. 181–190.
51. Zhang Z., Krutchinsky A., Endicott S., Realini C., Rechsteiner M., Standing K.G. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. № 17. P. 5651–5658.
52. Hernebring M., Fredriksson A., Liljevald M., Cvijovic M., Norrman K., Wiseman J., Semb H., Nystrom T. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 1381.
53. Strehl B., Seifert U., Krüger E., Heink S., Kuckelkorn U., Kloetzel P.M. // *Immunol. Rev.* 2005. V. 207. № 1. P. 19–30.
54. Krüger E., Kuckelkorn U., Sijts A., Kloetzel P.-M., The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing, *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Springer, 2003. P. 81–104.
55. Sijts A.J., Ruppert T., Rehmann B., Schmidt M., Koszinowski U., Kloetzel P.-M. // *J. Exp. Med.* 2000. V. 191. № 3. P. 503–514.
56. Boes B., Hengel H., Ruppert T., Multhaup G., Koszinowski U.H., Kloetzel P.-M. // *J. Exp. Med.* 1994. V. 179. № 3. P. 901–909.
57. Sato N., Sanjuan I.M., Heke M., Uchida M., Naef F., Brivanlou A.H. // *Dev. Biol.* 2003. V. 260. № 2. P. 404–413.
58. Assou S., Cerecedo D., Tondeur S., Pantesco V., Hovatta O., Klein B., Hamamah S., De Vos J. // *BMC Genomics*. 2009. V. 10. № 1. P. 1.
59. Baharvand H., Hajheidari M., Ashtiani S.K., Salekdeh G.H. // *Proteomics*. 2006. V. 6. № 12. P. 3544–3549.
60. Meshorer E., Misteli T. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 7. P. 540–546.
61. Szutorisz H., Georgiou A., Tora L., Dillon N. // *Cell*. 2006. V. 127. № 7. P. 1375–1388.
62. Ogawa K., Nishinakamura R., Iwamatsu Y., Shimosato D., Niwa H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 343. № 1. P. 159–166.
63. James D., Levine A.J., Besser D., Hemmati-Brivanlou A. // *Development*. 2005. V. 132. № 6. P. 1273–1282.
64. Greber B., Lehrach H., Adjaye J. // *Stem Cells and Development*. 2008. V. 17. № 6. P. 1065–1078.
65. Hatakeyama S. // *JAKSTAT*. 2012. V. 1. № 3. P. 168–175.
66. Miyazono K., Ten Dijke P., Heldin C.-H. // *Advances in Immunology*. 2000. V. 75. P. 115–157.
67. Hernebring M., Brolén G., Aguilaniu H., Semb H., Nyström T. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. V. 103. № 20. P. 7700–7705.
68. Dudek E., Shang F., Valverde P., Liu Q., Hobbs M., Taylor A. // *The FASEB J*. 2005. V. 19. № 12. P. 1707–1709.
69. Pickering A.M., Koop A.L., Teoh C.Y., Ermak G., Grune T., Davies K.J. // *Biochemical J*. 2010. V. 432. № 3. P. 585–595.
70. Seifert U., Bialy L.P., Ebstein F., Bech-Otschir D., Voigt A., Schröter F., Prozorovski T., Lange N., Steffen J., Rieger M. // *Cell*. 2010. V. 142. № 4. P. 613–624.
71. Ebstein F., Voigt A., Lange N., Warnatsch A., Schröter F., Prozorovski T., Kuckelkorn U., Aktas O., Seifert U., Kloetzel P.-M. // *Cell*. 2013. V. 152. № 5. P. 935–937.
72. Park J.-A., Kim Y.-E., Ha Y.-H., Kwon H.-J., Lee Y.-H. // *BMB Rep.* 2012. V. 45. № 5. P. 299–304.
73. Konstantinova I.M., Tsimokha A.S., Mittenberg A.G. // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2008. V. 267. P. 59–124.
74. Tu Y., Chen C., Pan J., Xu J., Zhou Z.-G., Wang C.-Y. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2012. V. 5. № 8. P. 726–738.
75. Babaie Y., Herwig R., Greber B., Brink T.C., Wruck W., Groth D., Lehrach H., Burdon T., Adjaye J. // *Stem Cells*. 2007. V. 25. № 2. P. 500–510.
76. Atkinson S.P., Collin J., Irina N., Anyfantis G., Kyung B.K., Lako M., Armstrong L. // *Stem Cells*. 2012. V. 30. № 7. P. 1373–1384.
77. Floyd Z.E., Staszkiwicz J., Power R.A., Kilroy G., Kirk-Ballard H., Barnes C.W., Strickler K.L., Rim J.S., Harkins L.L., Gao R., Kim J., Eilertsen K.J. // *Cell Reprogram*. 2015. V. 17. № 2. P. 95–105.
78. Cajigas I.J., Will T., Schuman E.M. // *EMBO J*. 2010. V. 29. № 16. P. 2746–2752.
79. Prigione A., Fauler B., Lurz R., Lehrach H., Adjaye J. // *Stem Cells*. 2010. V. 28. № 4. P. 721–733.
80. Kloetzel P.M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1695. № 1–3. P. 225–233.
81. Gaczynska M., Goldberg A.L., Tanaka K., Hendil K.B., Rock K.L. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 29. P. 17275–17280.
82. Ware C.B., Nelson A.M., Mecham B., Hesson J., Zhou W., Jonlin E.C., Jimenez-Caliani A.J., Deng X., Cavanaugh C., Cook S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 12. P. 4484–4489.
83. Nichols J., Smith A. // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. № 6. P. 487–492.
84. Wang T. // *Frontiers in Biosci: J. Virtual Library*. 2003. V. 8. P. d1109–1127.