

БЕЛКИ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ МЕТАБОЛИЗМ ГЛИКОГЕНА: МАЛИН И ЛАФОРИН

Наумов А.В., Петушок Н.Э.

*УО «Гродненский государственный медицинский университет»,
Гродно, Республика Беларусь*

Каталитическая активность ферментов метаболизма гликогена, особенно гликогенсинтазы и гликогенфосфорилазы, контролируется комбинацией процессов посттрансляционной модификации и действием аллостерических активаторов. Белки малин и лафорин участвуют в модификации ключевых ферментов метаболизма гликогена, а также регулируют целый ряд других процессов в клетках.

Белок малин кодируется геном EPM2B/NHLRC1 (Epilepsy, Progressive Myoclonus 2B) в хромосоме 6q22 генома человека. Он состоит из 395 аминокислотных остатков, имеет массу 42 кДа, присутствует в ткани мозга, сердца, скелетных мышц, печени и поджелудочной железы.

Малин образует комплекс с лафорином и в таком виде принимает участие в регуляции метаболизма гликогена. В этом комплексе малин представлен в виде двух доменов (RING и NHLs) и связан с одним из E2-конъюгирующих ферментов [6].

В составе этого комплекса малин убиквитинилирует белки, непосредственно участвующие в метаболизме гликогена [7, 10]. Причём, в случае полиубиквитинилирования существует определённая топология (имеется в виду к какому из семи лизинов убиквитина – K⁶, K¹¹, K²⁷, K²⁹, K³³, K⁴⁸ или K⁶³ присоединяется следующий убиквитин), что определяет дальнейшую судьбу самого убиквитинилированного белка. Это может быть: распад в протеасомах, транслокация в органеллы клетки, запуск инициация митоза, аутофагии или эндоцитоза [4]. Субстратами малина являются [4, 7, 20]: гликогенсинтаза, регуляторные субъединицы протеинфосфатазы 1, АМФ-активируемая протеинкиназа, рецептор аутофагии p62, изоферменты M1 и M2 пируваткиназы, белок, содержащий крахмал-связывающий домен (STBD1), белок дисшевелд 2 (dishevelled 2, компонент сигнального пути Wnt), лафорин, гликогенветвящий фермент.

Лафорин у человека кодируется геном EPM2A (Epilepsy, Progressive Myoclonus 2A) в хромосоме 6q24, содержит 331 аминокислотный остаток, имеет массу 37 кДа, и распространён во всех тканях организма, особенно в тканях мозга, скелетных мышц, сердца и печени. Некоторые мутации гена EPM2A являются причиной прогрессирующей миоклональной эпилепсии или болезни Лафора, фатальной аутосомной, рецессивной, нейродегенеративной формы эпилепсии и гликогеноза. Альтернативный сплайсинг EPM2A даёт пять изоферментов, два из которых наиболее изучены.

Лафорин-331 – наиболее распространённый представитель, имеет фосфатазную активность и локализуется в цитоплазме и эндоплазматической сети. У минорной изоформы – лафорин-317 – отсутствует фосфатазная

активность и располагается он в ядре и цитозоле. Более того изоформы образуют гетеродимеры лишённые фосфатазной активности.

Лафорин имеет два важных домена: участок связывающий углеводы (carbohydrate binding module, CBM) на аминоконце полипептидной цепи (остатки аминокислот 1-124), относится к семейству CBM 20 и фосфатазный домен двойного назначения (dual specificity phosphatase domain, DSP) (остатки 157-326).

CBM домен лафорина способен связывать гликоген и амилопектины [10], [9], а домен DSP их дефосфорилирует (отсюда название лафорина – глюканфосфатаза). Лафорин относится к суперсемейству тирозинфосфатаз крупных белков (PTP) или цистеин-зависимых фосфатаз. Ввиду такой специфичности следует отметить, что фермент инактивируется в окислительных условиях.

Лафорин – это единственная фосфатаза человека, у которой домен связывания углеводов находится на одной полипептидной цепи с каталитическим фосфатазным доменом. Присутствие этих двух доменов определяет связывание и дефосфорилирование углеводных субстратов, а как следствие – мутации в CBM домене нарушают фосфатазную активность лафорина аналогично мутациям DSP домена [10].

Являясь фосфатазой, лафорин удаляет моноэфиры фосфата гликогена. При нарушении или отсутствии этой ферментативной активности в гликогене накапливаются остатки фосфата и удлиняются участки цепи без ветвления (фосфаты подавляют процесс ветвления). Гликоген в таком виде становится менее водорастворимым, напоминает крахмал – происходит формирование нерастворимых «телец Лафора» [16].

До недавнего времени считалось, что избыточное фосфорилирование гликогена, особенно появление C_6 -фосфомоноэфиров гликогена – причина эпилепсии (болезни Лафора) [10]. Дефосфорилирование гликогена связано с активностью комплекса белков лафорина и малина. Однако, результаты экспериментов Nitschke F. и соавторов показали, что гиперфосфорилирование гликогена не является прямой причиной образования нерастворимых полиглюкозанных телец. Более того они образуются даже при нормальном уровне фосфатов в гликогене [2]. Длина линейных цепей гликогена – основная характеристика, определяющая растворимость гликогена. Длинные цепи способствуют образованию участков с двойными спиралями, которые напоминают полукристаллическую структуру крахмала. У нокаут-мышей, лишённых гена лафорина или малина, действительно наблюдали наличие удлинённых неразветвлённых участков гликогена по сравнению с контрольной группой. Подобная картина имеет место при болезни Лафора и при болезни полиглюкозанных телец взрослых. Однако, даже при этих заболеваниях при отсутствии малина, лафорина или ветвящего фермента отмечалось наличие водорастворимого (нормального) гликогена [19].

Фосфорилирование гликогена – это скорее анахронизм, доставшийся клеткам животных от метаболических процессов, в которых участвует крахмал у растений. Поэтому, вероятно, так трудно найти определённую биологическую

функцию данного процесса. Одни авторы утверждают, что уровень фосфорилирования гликогена определяет возраст гранулы гликогена и является метаболическим маркером для лизосомальной деградации гликогена – гликофагии. Другие, что фосфорилирование определяет растворимость гликогена, но оказалось, что даже гиперфосфорилирование не оказывает влияния на этот процесс [19]. Возможно, фосфат может быть маркером, определяющим пути распада гликогена или фосфорилирование – просто незначительная побочная реакция, уровень которой контролирует глюкан фосфатаза – лафорин [10, 16].

Существует предположение, что возможно лафорин и гликогенфосфат играют определённую роль в восстановлении гранул гликогена после истощающих физических нагрузок. Показано, что содержание гликогенфосфатов у мышей контрольной группы после вызванного физической нагрузкой истощения гликогена оставалось низким, причём даже после восстановления уровня гликогена. Однако восстановление первоначального уровня ветвлений гликогена было нарушено у мышей с отсутствием гена лафорина [13].

У животных, лишённых лафорина и малина, показано одинаковое пропорциональное увеличение фосфатов C_6 и $C_2 + C_3$ в гликогене. А эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что лафорин дефосфорилирует глюкозу в гликогене в положении C_3 и C_6 [10]. Интересно, что в мышцах мышей и кроликов уровень фосфорилированного C_6 составлял ~20%. Удаление генов лафорина и малина у мышей повышало уровень фосфорилирования гликогена в 8 и 4 раза, соответственно, по сравнению с контрольными животными, однако доля фосфатов в положении C_6 оставалась неизменной [7]. Хотя в экспериментах *in vitro* было показано, что лафорин преимущественно дефосфорилирует гликоген в C_3 положении [12].

При истощении фосфатов мышечного гликогена после нагрузки, уровень фосфатов оставался сниженными даже после того, как уровень гликогена возвращался к норме [13]. У лафорин-дефицитных животных после физической нагрузки уменьшение гликогена было идентично с контрольной группой, но уровень фосфата оставался высоким. Это указывает на участие лафорина в дефосфорилировании гликогена при активной работе мышц.

Кроме дефосфорилирования гликогена лафорин в комплексе с малином и некоторыми другими факторами принимает активное участие в убиквитинилировании белков связанных с обменом гликогена [16].

При невозможности формирования комплекса малин/лафорин, синтез гликогена усиливается, и происходит накопление нерастворимой формы полисахарида с аномальной структурой, отличающейся редкими участками ветвления. [15].

Описан предполагаемый механизм действия малина на метаболизм гликогена. При нормальном метаболизме гликогена белок, направленно взаимодействующий с гликогеном (PTG), и гликогенсинтаза связывают частицы полисахарида. В процессе синтеза гликогенсинтаза присоединяет к гликогену один фосфат примерно на 10 000 мономеров глюкозы. Лафорин

воздействует на частицу гликогена и отсоединяет от него фосфат. Взаимодействие малина и лафорина усиливается фосфорилированием лафорина (Ser²⁵) через АМФ-активируемую протеинкиназу. После связывания с лафорином малин убиквитинирует лафорин, РТГ и гликогенсинтазу. Это убиквитинирование вызывает отделение всех трех ферментов от частицы гликогена, нацеливает их на протеасомозависимую деградацию, что и поддерживает нормальный метаболизм гликогена. [17].

Установлено, что убиквитинилирование малином гликогенсинтазы и гликогенветвящего фермента не ведёт к их разрушению в протеасомах [7] и биологическая значимость этого явления пока остается не понятной. Сложность проблемы заключается в том, что комплекс малин/лафорин участвует также в регуляции многих других физиологических процессов в клетках различных тканей: протеостазе, окислительном стрессе, нейровоспалениях, в ответе клетки на накопление несформированных белков, функционировании протеасом и в формировании аутофагосом. [15].

Инициация процесса аутофагии происходит в ответ на недостаток питания и/или на низкий энергетический статус клетки вследствие активации некоторых сигнальных путей с участием mTOR (мишень рапамицина млекопитающих, тесно связана с сигнальным путём инсулина) и АМФ-активируемой протеинкиназы [11].

АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК) является своеобразным первичным сенсором доступности энергии в клетке. При высокой обеспеченности энергией или высоком содержании глюкозы уменьшается фосфорилирование субъединицы АМПК α по Thr¹⁷², что ведет к снижению её активности. Происходит стимуляция катаболических и подавление многих анаболических путей, так как её функции тесно связаны с активностью комплексов mTOR и Akt/PKB у млекопитающих [5].

Сигнальные пути mTOR ингибируют, а АМПК активирует соответственно комплекс киназы ULK1/2 (*Unc-51 like autophagy activating kinase*) путём фосфорилирования остатков серина (Ser⁷⁵⁷ в случае mTOR (ингибирование активности) и Ser⁵⁵⁵ – киназой АМПК (рост активности). В свою очередь, активация комплекса ULK1/2 оказывает стимулирующее действие на другой сигнальный каскад, в котором участвует каталитическая субъединица 3 типа фосфатидилинозитол-3-киназы, функция которого заключается в синтезе вторичного посредника фосфатидилинозитол-3-фосфата, инициатора начальных этапов аутофагии в клетке [8, 11].

В структуру ядра комплекса фосфатидилинозитол-3-киназы входят два белка – киназа Vps34 и Beclin 1, которые также находятся под контролем соответствующих киназ. Например, киназа ULK1/2 фосфорилирует Ser¹⁵, а АМПК – Ser⁹³ и Thr³⁸⁸ в Beclin1 [11]. Кроме того, активность самого комплекса фосфатидилинозитол-3-киназы регулируется убиквитинилированием и, либо приводит к его распаду в протеасомах в случае присоединения убиквитина к Lys⁴⁸, либо наоборот – к стабилизации комплекса и повышению его активности (Lys⁶³) [8]. Интересно, что в процессах убиквитинилирования Vps34 и Beclin1 также участвует комплекс белков малин/лафорин [15].

Помимо того, что комплекс малин/лафорин взаимодействует и определяет активность ключевых ферментов синтеза гликогена: гликогенсинтазы, регуляторных субъединиц протеинфосфатазы 1, гликогендеветвящего фермента и проч., одна из субъединиц протеинфосфатазы 1 – R5/PTG, связывающая его с гликогеном, способствует активации гликогенсинтазы и инактивации гликогенфосфорилазы, в ответ на действие АМФ-активируемой протеинкиназы. Вполне возможно, что этот процесс – связующее звено в гликофагии, так как АМФ-активируемая протеинкиназа выполняет регуляторную роль начальных шагов биогенеза аутофагосом [15].

Оказывается, *малин* играет важную роль в поддержании нормального уровня обмена гликогена в ядре клеток, а убиквитинилирование определяет появление в ядре ферментов гликогенолиза [14]. Например, потеря активности или отсутствие малина в цитоплазме клеток мелкоклеточного рака лёгких приводит к чрезмерному накоплению гликогена ввиду подавления процессов гликогенолиза [1], это сопровождается активацией пролиферации опухоли, тогда как реэкспрессия малина активирует гликогенолиз и подавляет рост раковых клеток [14].

Более того, изучение функции комплекса белков малин/лафорин позволило установить биохимическое значение локализации гликогена в ядре клеток. Оказалось, что малин осуществляет контроль за ацетилированием гистонов т.е. за эпигенетическими изменениями в клетке. при этом донором ацетата выступает исключительно гликогенолиз, протекающий здесь же в ядре. И, как было установлено, оба вышеприведенных процесса – ацетилирование и гликогенолиз – находятся под контролем малина, который путём убиквитинилирования определяет транслокацию фермента распада гликогена – *гликогенфосфорилазы* в ядро клеток. Интересно, что при искусственной реэкспрессии малина происходит более чем двукратное подавление или активация экспрессии в общей сложности более чем 3000 генов [14].

Локализация гликогена в ядре способствует компартментализации продукта гликолиза пирувата, который является субстратом-предшественником ацетата. В ядрах клеток млекопитающих присутствуют ферменты, утилизирующие пируват и ацетат для обеспечения ацетилирования гистонов: пируватдегидрогеназный комплекс, АТФ-цитратлиаза, ацетил-КоА синтаза, которые, как недавно было установлено, транслоцируются в ядро из митохондрий [3, 14].

В процессе транслокации пируватдегидрогеназного комплекса из митохондрий в ядро он остаётся в активном состоянии. Этому способствует белок 70 теплового шока (Hsp70), который является конкурентом связывания с комплексом белка-регулятора киназы пируватдегидрогеназы и таким образом сохраняет активность последней. Уровень Hsp70, в свою очередь, контролируется эпидермальным фактором роста, способствует процессам ацетилирования в ядре, контролируя транслокацию в ядро помимо пируватдегидрогеназного комплекса ещё и мышечного изофермента пируваткиназы.

Суммируя вышеизложенное, можно сказать, что открыта новая важная функция гликогена. Он является источником субстрата для ацетилирования гистонов в ядре клеток.

Значение малина и лафорина в ацетилировании белков важно ещё и потому, что при развитии сердечной недостаточности увеличивается уровень гиперацетилирования белков в митохондриях кардиомиоцитов. Это нарушает энергетический баланс, функцию митохондрий и играет негативную роль в формировании сердечной недостаточности. Следовательно, все процессы, связанные с ацетилированием и деацетилированием белков кардиомиоцитов, следует рассматривать как важных потенциальных участников механизма развития сердечной недостаточности [18]. Пациенты, имеющие мутации лафорина или малина дают одинаковую неврологическую и гистологическую симптоматику, это позволило предположить, а потом и подтвердить, что эти два белка физически взаимосвязаны и образуют функциональный комплекс, который выполняет ещё одну функцию – участвует в убиквитинилировании белков, связанных с метаболизмом гликогена [10]. Поэтому представляют опасность не только мутации, нарушающие непосредственно функции того или иного белка, но и влияющие на их взаимодействие при образовании комплекса [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. A Liver-Specific Thyromimetic, VK2809, Decreases Hepatosteatorsis in Glycogen Storage Disease Type Ia / J. Zhou [et al.] // *Thyroid*. – 2019. – Vol. 29, № 8. – P. 1158-1167. [Zhou J, 2019].
2. Abnormal glycogen chain length pattern, not hyperphosphorylation, is critical in Lafora disease / F. Nitschke [et al.] // *EMBO Mol. Med.* – 2017. – Vol. 9, № 7. – P. 906-917.
3. Mews P, Acetyl-CoA synthetase regulates histone acetylation and hippocampal memory / P. Mews [et al.] // *Nature*. – 2017. – Vol. 546, № 7658. – P. 381-386.
4. Akutsu, M. Ubiquitin chain diversity at a glance / M. Akutsu, I. Dikic, A. Bremm // *J Cell Sci.* – 2016. – Vol. 129, № 5. – P. 875-80.
5. Casagrande, B. P. AMPK in the gut-liver-brain axis and its influence on OP rats in an HSHF intake and WTD rat model / B. P. Casagrande, L. P. Pisani, D. Estadella // *Pflugers Arch.* – 2021. – Vol. 473, № 8. – P. 1199-1211
6. Garcia-Gimeno, M. A. Lafora Disease: A Ubiquitination-Related Pathology / M. A. Garcia-Gimeno, E. Knecht, P. Sanz // *Cells*. – 2018. – Vol. 7, № 8. – P. 87
7. Glycogen phosphomonoester distribution in mouse models of the progressive myoclonic epilepsy, Lafora disease / A. A. DePaoli-Roach [et al.] // *J Biol Chem.* – 2015. – Vol. 290, № 2. – P. 841-50.
8. Hill, S. M. Post-translational modifications of Beclin 1 provide multiple strategies for autophagy regulation / S. M. Hill, L. Wrobel, D. C. Rubinsztein // *Cell Death Diff.* – 2019. – Vol. 26, № 4. – P. 617-629.

9. Kuchtova, A. The unique evolution of the carbohydrate-binding module CBM20 in laforin / A. Kuchtova, M. S. Gentry, Š. Janeček // FEBS Lett. – 2018. – Vol. 592, № 4. – P. 586-598.
10. Lafora disease offers a unique window into neuronal glycogen metabolism / M. S. Gentry [et al.] // J Biol Chem. – 2018. – Vol. 293, № 19. – P. 7117-7125.
11. Dikic, I. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy / I. Dikic, Z. Elazar // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2018. – Vol. 19, № 6. – P. 349-364
12. Mechanistic Insights into Glucan Phosphatase Activity against Polyglucan Substrates / D. A. Meekins [et al.] // J Biol Chem. – 2015. – Vol. 290, № 38. – P. 23361-70.
13. Muscle glycogen remodeling and glycogen phosphate metabolism following exhaustive exercise of wild type and laforin knockout mice / J. M. Irimia [et al.] // J Biol Chem. – 2015. – Vol. 290, № 37. – P. 22686-22698
14. Nuclear Glycogenolysis Modulates Histone Acetylation in Human Non-Small Cell Lung Cancers / R. C. Sun [et al.] // Cell Metab. – 2019. – Vol. 30, № 5. – P. 903-916.e7
15. Regulation of the autophagic PI3KC3 complex by laforin/malin E3-ubiquitin ligase, two proteins involved in Lafora disease / P. Sanchez-Martin [et al.] // Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. – 2020. – Vol. 1867, № 2. – P. 118613.
16. Roach, P. J. Are there errors in glycogen biosynthesis and is laforin a repair enzyme? / P. J. Roach // FEBS Lett. – 2011. – Vol. 585, № 20. – P. 3216-8.
17. Roma-Mateo, C. Deciphering the role of malin in the lafora progressive myoclonus epilepsy / C. Roma-Mateo, P. Sanz, M. S. Gentry // IUBMB Life. – 2012. – Vol. 64, № 10. – P. 801-8.
18. Romanick, S. S. The nonepigenetic role for small molecule histone deacetylase inhibitors in the regulation of cardiac function / S. S. Romanick, B. S. Ferguson // Future Med Chem. – 2019. – Vol. 11, № 11. – P. 1345-1356
19. Skeletal Muscle Glycogen Chain Length Correlates with Insolubility in Mouse Models of Polyglucosan-Associated Neurodegenerative Diseases. / M. A. Sullivan [et al.] // Cell Rep. – 2019. – Vol. 27, № 5. – P. 1334-1344.
20. Viana, R. The laforin/malin E3-ubiquitin ligase complex ubiquitinates pyruvate kinase M1/M2 / R. Viana, P. Lujan, P. Sanz // BMC Biochem. – 2015. – Vol. 16. – P. 24.

НОВОЕ О ГЛИКОГЕНОЗАХ. БОЛЕЗНЬ ЛАФОРА

Наумов А.В., Петушок Н.Э.

*УО «Гродненский государственный медицинский университет»,
Гродно, Республика Беларусь*

Болезнь Лафора (прогрессирующая миоклональная эпилепсия Лафора, progressive myoclonic epilepsy of Lafora, Lafora disease, OMIM 254780).