

ПРОТЕАСОМЫ: УЧАСТИЕ В КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССАХ

© А. С. Цимоха

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

Представлен обзор литературы, касающейся структурно-функциональных аспектов протеасом и участия убиквитин-протеасомной протеолитической системы в основных клеточных процессах. 26S протеасома является ключевым ферментом убиквитинзависимого пути деградации белка в клетке. Эта энергозависимая наномашина составлена из 20S каталитического ядра и ассоциированных с ним регуляторных комплексов. Эукариотические протеасомы обладают помимо нескольких видов пептидазных активностей еще эндорибонуклеазной, шаперонной и ДНК-геликазной активностями. Убиквитин-протеасомная система контролирует уровни ключевых регуляторных белков в клетке и, таким образом, является одним из ключевых элементов для существования клетки. Популяция протеасом в клетке структурно и функционально гетерогенна. Эти частицы подвергаются многоэтапному регулированию, в том числе с помощью множества посттрансляционных модификаций. В этом обзоре мы также рассмотрим текущее состояние знания относительно участия протеасом в контроле над клеточным циклом, дифференцировкой, транскрипцией и репарацией, в иммунном ответе и апоптозе.

Ключевые слова: апоптоз, дифференцировка, иммунный ответ, клеточный цикл, протеасомы, репарация, транскрипция.

Большая часть внутриклеточной деградации белков — высокорегулируемый процесс, осуществляемый по убиквитин- и протеасомзависимому пути, один из участников которого — 26S протеасома — мультисубъединичная протеаза — представляет собой критически важный для жизни клеточный компонент. Этот белковый комплекс вовлечен в АТФ-зависимый протеолиз ключевых регуляторных белков, контролирующих основные клеточные процессы: прохождение по клеточному циклу, дифференцировка, развитие, иммунный ответ, транскрипция и репарация ДНК, апоптоз (Wojcik et al., 2000; Rajonk, McBride, 2001; Glickman, Ciechanover, 2002; Kloetzel, 2004; Collins, Tansey, 2006; Maupin-Furlow et al., 2006; Reed, 2006; Sikder et al., 2006; Ferdous et al., 2007). Участие убиквитин-протеасомной протеолитической системы в белковой деградации в клетке включает в себя не только контроль над включением/выключением ферментативных каскадов данной системы, но и сложную и комплексную регуляцию состава и активностей самой протеасомы непосредственно. Эти частицы являются гетерогенными из-за существования подтипов субъединиц, различных посттрансляционных модификаций и ассоциации коровой части протеасомы — 20S протеасомы — с альтернативными регуляторными субкомплексными (Glickman, Raveh, 2005; Maupin-Furlow et al., 2006). В данном обзоре мы рассмотрим строение и ферментативные активности протеасом, а также причастность частиц к фундаментальным биологическим процессам, таким как регуляция клеточного цикла и деления клетки, развитие и дифференцировка, регуляция транскрипции, репарация ДНК, иммунный ответ и апоптоз.

Убиквитин-протеасомный путь деградации белков

Первоначально деградация внутриклеточных белков представлялась довольно простым процессом, осуществляемым лизосомальными ферментами. Однако в настоящее время общеизвестно, что основной регулируемый протеолиз в клетке осуществляется убиквитин- и протеасомзависимой системой деградации белка (Hershko et al., 2000), впервые упомянутой как АТФ-зависимая система деградации белка в лизатах ретикулоцитов (Etlinger, Goldberg, 1977).

Протеасомы

Протеасома представляет собой мультисубъединичный белковый комплекс, который является основным компонентом убиквитинзависимой системы деградации клеточных белков (Coux et al., 1994; Rock et al., 1994). Название «протеасома», предложенное Арриго и соавторами (Arrigo et al., 1988), определяет две различные молекулярные разновидности: 26S-протеасому, которая деградирует убиквитинированные белки, и ее каталитическое ядро, 20S-протеасому. Последняя сама по себе не способна деградировать клеточные белки, однако может расщеплять некоторые короткие пептиды и развернутые белки (Bochtler et al., 1999; Demartino, Slaughter, 1999).

Протеасомы присутствуют в клетках всех организмов от археобактерий до высших эукариот, что свидетельствует об их абсолютной значимости для нормальной жизнедеятельности клетки (Maupin-Furlow et al., 2006).

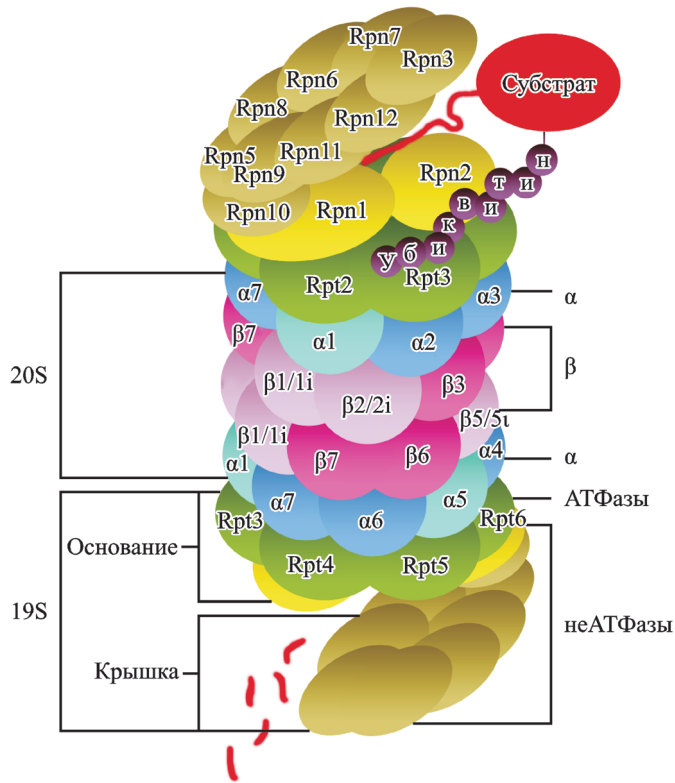


Рис. 1. 26S протеасома.

26S протеасома составлена из 20S протеасомы и 19S регуляторных комплексов, которые условно делятся на два субкомплекса: «основание» и «крышка». Протеолитически активные сайты расположены в центральных кольцах 20S протеасомы в субъединицах $\beta 1/1i$, $\beta 2/2i$ и $\beta 5/5i$ (выделены светло-розовым цветом), а эндорибонуклеазные сайты 20S протеасомы расположены во внешних кольцах в субъединицах $\alpha 1$ и $\alpha 5$ (выделены светло-синим цветом). С помощью 19S регуляторного комплекса 26S протеасома обычно узнает помеченный для деградации субстрат через полиубиквитиновую цепь. Молекула субстрата разворачивается АТФазами 19S регулятора и поступает в протеолитическую камеру 20S протеасомы, где и подвергается расщеплению. Полиубиквитиновая цепочка также разбивается на мономеры с помощью деубиквитирующих ферментов 19S регулятора в течение процесса проталкивания субстрата внутрь.

26S протеасома — АТФ-зависимый протеолитический комплекс, обладающий мол. массой около 2.5 МДа, — осуществляет специфическую деградацию белков, конъюгированных с убиквитином (Dahlmann, 2005). Исследования строения этого комплекса методами электронной микроскопии и компьютерной томографии показали, что 26S протеасома имеет вид симметричной гантелеобразной структуры (Baumeister et al., 1998; Walz et al., 1998). Ее центральная часть образована 20S каталитическим ядром (или 20S протеасомой), к которому с одной или с двух сторон присоединены PA700 (Protein Activator)-регуляторные комплексы (или 19S частицы) (рис. 1).

20S протеасома по данным рентгеноструктурного анализа представляет собой цилиндр длиной 15—17 нм и диаметром 11—12 нм, состоящий из четырех сложенных в стопку гептамерных колец (Lowe et al., 1995; Groll et al., 1997; Dahlmann et al., 2001; Абрамова и др., 2002). В состав 20S протеасомы входят 14 пар субъединиц, мол. масса которых варьирует от 20 до 35 кДа, а суммарная масса всего комплекса составляет около 750 кДа. Каждое из двух внешних колец цилиндра состоит из семи гомологичных субъединиц α -типа, а каждое из двух внутренних

колец — из семи похожих консервативных субъединиц β -типа (рис. 1). Рентгеноструктурный анализ кристаллизованной 20S протеасомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с разрешением 2.4 Å подтвердил организацию протеасомных субъединиц в $(\alpha)_7(\beta)_7(\beta)_7(\alpha)_7$ -комплекс (Groll et al., 1997, 2005; Dahlmann, 2005; Nandi et al., 2006). Четыре собранных кольца образуют три внутренние полости диаметром приблизительно 5 нм (Groll, Hubber, 2004). Центральная полость — протеолитическая — сформирована двумя β -кольцами, ориентированными «голова к голове», и отделена от двух внешних полостей, сформированных другими сторонами β -колец и α -кольцами, воротами толщиной 3 нм (Orlowski, Wilk, 2000). Каталитическая полость имеет примерный объем 84 нм³ и способна вместить до 70 кДа упакованного белка (Maup et al., 1998; Groll et al., 2005). Протеолитически активные сайты расположены на N-концах β -субъединиц, лежащих во внутренней полости цилиндра, а вход субстрата в протеолитическую камеру ограничивают «ворота» с двух сторон 20S-протеасомы, образованные N-концами α -субъединиц (Groll et al., 2005).

Протеасомы являются неотъемлемой частью эукариотической клетки, кроме того, они представлены во всех архебактериях, тогда как их распространение у эубактерий, по-видимому, ограничено порядком Actinomycetales (Maupin-Furlow et al., 2006). Отсутствие протеасом у многих видов бактерий может объясняться наличием у них других протеаз, выполняющих необходимые для выживания протеолитические функции. Так, у *Escherichia coli* и многих других бактерий роль 20S протеасомы выполняет родственная ей треониновая протеаза HslV, ассоциированная с АТФазным комплексом HslU (Rohrwild et al., 1997). Индуцируемая тепловым шоком, она участвует в утилизации неправильно свернутых белков. Протеаза HslV состоит из двух гомогексамерных колец, собранных из субъединиц с 20%-ной гомологией к β -субъединицам протеасомы (Kessel et al., 1996; Rohrwild et al., 1996; Groll et al., 2005). Отсутствие у HslV-протеазы субъединиц, аналогичных протеасомным α -субъединицам, позволяет предположить, что β -субъединицы протеасом — более ранняя форма, из которой позднее эволюционировали α -субъединицы (Volker, Lupas, 2002; Groll et al., 2005).

Структура 20S протеасомы удивительно консервативна, несмотря на существующие вариации в субъединичном составе 20S протеасомы у различных организмов (Heinemeyer et al., 2004). Протеасомы архебактерий обычно состоят из одного типа α -субъединиц и одного типа β -субъединиц, образующих структуру из четырех колец, аналогичную 20S протеасоме эукариот. Для метаногенного археона *Methanosarcina thermophila* показано, что два типа субъединиц кодируются генами *psmA* и *psmB* (Maupin-Furlow et al., 1998). Анализ этих генов выявил большую степень сходства α - и β -белков, главное различие которых сводится к отсутствию у β -полипептида 24-аминокислотного фрагмента на N-конце (Maupin-Furlow et al., 2006). 20S-протеасомы *Rhodococcus erythropolis* содержат по две разновидности α - и β -субъединиц (Tamura et al., 1995).

В процессе эволюции от бактерий к эукариотам число вариантов субъединиц возросло: так, 20S протеасомы эукариот содержат 7 различных субъединиц α -типа и 7 различных субъединиц β -типа, при этом количество протеолитически активных β -субъединиц сократилось с семи пар у бактерий до трех пар у эукариот (Heinemeyer et al., 2004).

У низших эукариот, таких как дрожжи *S. cerevisiae*, субъединицы 20S протеасомы кодируются 14 различными генами (Heinemeyer et al., 2004). Анализ генома представителя высших эукариот *Arabidopsis thaliana* выявил уже 23 гена, 13 из которых кодируют α -субъединицы, а 10 — β -субъединицы (Fu et al., 1998). Помимо конститутивной 20S протеасомы высшие эукариоты могут также образовывать индуцибельные протеасомы. Под действием гамма-интерферона (γ -IFN) конститутивные каталитические β -субъединицы 20S протеасомы замещаются на индуцибельные (β_i) (Groettrup et al., 2001a). Такая структура получила название иммунопротеасомы (Tanaka et al., 1989). При этом каждая из индуцибельных β_i -субъединиц, считываемых с 3 дополнительных генов, 2 из которых находятся в пределах локуса главного комплекса гистосовместимости (МНС), гомологична (почти на 70 %) соответствующей конститутивной β -субъединице и замещает ее во вновь образованной иммунопротеасоме: β_{1i} занимает место β_1 , β_{2i} — β_2 и β_{5i} — β_5 (Hughes, 1997). Было показано, что иммунопротеасома участвует в продукции определенных антигенных пептидов, презентруемых на молекулах главного комплекса гистосовместимости I класса (МНС I) (Kloetzel, 2001).

Сборку 20S протеасомы принято подразделять на пять стадий: отдельные субъединицы, образование ранних предшественников, сборка предшественника-полупротеасомы, образование прехолопротеасомы и созревание 20S протеасомы. Однако в разных организмах эти стадии сборки несколько различны (Heinemeyer et al., 2004).

У археобактерии *Thermoplasma acidophilum* 20S протеасомы состоят из субъединиц только одного α -типа и одного β -типа (Lowe et al., 1995). Эксперименты *in vitro* показали, что на начальном этапе происходит сборка α -колец, за которую отвечают α -спирали на N-концах α -субъединиц, затем к ним привлекаются непротессированные β -субъединицы с образованием полупротеасомы. Одновременно с отщеплением пропоследовательностей β -субъединиц происходит формирование прехолофермента, а затем образование зрелой протеасомы (Heinemeyer et al., 2004), причем, для сборки 20S протеасомы археобактерий не требуется никаких дополнительных факторов.

Протеасомы эубактерии *Rhodococcus sp.* состоят из двух различных субъединиц α -типа и двух различных субъединиц β -типа (Heinemeyer et al., 2004). Сначала образуются димеры α/β , из которых собирается полупротеасома, затем две полупротеасомы димеризуются в прехолофермент, а последующий процессинг β -субъединиц приводит к формированию зрелой 20S частицы.

Протеасомы эукариот характеризуются более сложным субъединичным составом. Они образованы α - и β -субъединицами 7 различных типов, каждая из которых занимает определенное положение в 20S протеасоме (Heinemeyer et al., 2004). Соответственно сборка эукариотической протеасомы представляет собой более сложный процесс. Из семи β -субъединиц только пять имеют пропептиды, и только три высвобождают активные сайты в результате процессинга. Ранние этапы сборки эукариотических протеасом плохо изучены, ранние предшественники эукариотических протеасом (α -кольца или α/β -димеры) не были выявлены. Но известно, что правильное позиционирование инициирующих сборку α -субъединиц определяется их взаимодействием с β -субъединицами (Heinemeyer et al., 2004). Однако до сих пор неизвестно,

инициируется сборка протеасом образованием кольца из α -субъединиц или же сначала образуются α/β -димеры.

Согласно некоторым исследованиям (Nandi et al., 1997), сначала собирается пре-полупротеасомный комплекс, состоящий из α -кольца и субъединиц β_2 , β_3 и β_4 . Присоединение оставшихся β -субъединиц инициирует димеризацию полупротеасом в прехолофермент, чему также способствует присоединение дополнительного фактора — шаперона Ump1 (Underprints the maturation of the proteasome) (Ramos et al., 1998). Известно, что шаперон Ump1 присутствует в полупротеасоме, но не был обнаружен ни в 20S, ни в 26S протеасомах. Фактор Ump1 деградирует после процессинга β -субъединиц в зрелой 20S протеасоме. У человека был обнаружен гомолог фактора Ump1 — белок POMP (Witt et al., 2000; Murata, 2006).

Сборка иммунопротеасомы в значительной степени определяется пропептидами β -субъединиц (Heinemeyer et al., 2004). Ранний предшественник состоит из α -кольца и присоединенных к нему субъединиц β_{1i} , β_{2i} , β_3 и β_4 (в отличие от предшественника конститутивной протеасомы, содержащего только субъединицы β_2 , β_3 и β_4). Под действием γ -IFN транскрипция гена Ump1 возрастает в 2 раза, что свидетельствует о том, что один и тот же фактор Ump1 вовлечен в сборку как конститутивной, так и иммунопротеасомы (Burri et al., 2000). В процессе созревания эукариотических протеасом участвует еще один вспомогательный белок: шаперон hsc73, ассоциированный с полупротеасомой, который обеспечивает включение и правильную укладку поздних субъединиц 20S протеасомы (Heinemeyer et al., 2004).

Регуляторные комплексы протеасомы служат для узнавания убиквитинированных белков и подготовки их к деградации в 20S каталитической протеасоме (рис. 1). Такая подготовка включает в себя выбор и связывание субстрата, отщепление убиквитина, разворачивание и перенос субстрата в протолитическую камеру 20S частицы. Кроме того, открытие/закрытие канала регулирует размер пептидов, образовавшихся в результате протеолиза. Обычно выход продукта заторможен, что необходимо для более эффективного протеолиза и достижения длины пептидов менее 8 аминокислот, которые затем быстро разрушаются клеточными пептидазами (Glickman, Ciechanover, 2002).

РА700 (19S-частица) регуляторный комплекс протеасом эукариот состоит по крайней мере из 18 различных субъединиц и имеет мол. массу около 1 МДа (рис. 1). Регулятор РА700 может быть разделен на две мультисубъединичные структуры — «крышку» (lid) и «основание» (base). «Основание» состоит из шести гомологичных АТФаз (Rpt1-6, **Regulatory particle triple-A type I proteins**), членов AAA-семейства (ATPase Associated with different cellular Activities) и трех не АТФазных субъединиц (Rpn1, 2, 10), «крышка» регуляторной частицы представляет собой комплекс 400 кДа из 6 не АТФазных субъединиц (Rpn3, 5—9, 11—12, **Regulatory particle non-ATPases**) (Finley et al., 1998; Glickman et al., 1998; Smalle, Vierstra, 2004).

Связывание с 19S-частицей приводит к активации 20S-протеасомы и последующему гидролизу конъюгированных с полиубиквитином субстратов. Интересно, что название «26S протеасома» употребляется для обозначения как 30S комплекса, содержащего две 19S частицы (19S-20S-19S), так и самого 26S комплекса, когда 19S регулятор присоединен только с одного конца 20S протеасомы (Hendil et al., 1998).

АТФазные субъединицы «основания» формируют гексамерное кольцо, которое непосредственно взаимодействует с гептамерным α -кольцом 20S протеасомы, открывая вход во внутреннюю протеолитическую камеру, а также выполняют функцию, обратную функции шаперонов, т. е. разворачивают нативные белки (Glickman et al., 1998). «Основание» 19S-комплекса отвечает за связывание неправильно свернутых белков: для 19S комплексов дрожжей и млекопитающих были показаны их связывание с несколькими неправильно свернутыми белками и подавление агрегации последних (Braun et al., 1999).

Rpn10-субъединица играет роль стабилизатора взаимодействия «основания» с «крышкой» (Glickman et al., 1998). Так, белок Rpn10 тесно взаимодействует с «основанием», однако может в то же время быть связанным с «крышкой» или вообще находиться отдельно от протеасомы. При этом с «основанием» взаимодействует центральная часть Rpn10, с «крышкой» — N-концевой vWA-мотив (von Willebrand factor A-like domain), а C-концевой UIM-домен (Ub-Interacting Motif) способен связывать полиубиквитиновую цепь (Fu et al., 2001). В составе регуляторного комплекса, таким образом, Rpn10 играет роль стабилизатора взаимодействия «основания» с «крышкой» (Glickman et al., 1998).

«Крышка» протеасомы способна узнавать мультиубиквитиновые цепи, поскольку протеолиз убиквитиновых белков осуществляется протеасомой только в присутствии «крышки» (Glickman et al., 1998). Однако функции большинства субъединиц «крышки» еще неизвестны.

РА28 (11S активатор) регуляторный комплекс с мол. массой около 200 кДа отсутствует в клетках низших эукариот, но обнаружен у видов от *Trypanosoma* до млекопитающих (Gao et al., 2004). Он имеет структуру гетерогептамерного кольца и состоит из субъединиц двух типов, аминокислотная последовательность которых гомологична на 50 %: РА28 α и РА28 β (Tanahashi et al., 2000).

Субъединицы РА28 индуцируются под действием γ -IFN, что указывает на участие комплекса в иммунном ответе. Регулятор РА28 может АТФ-независимо взаимодействовать с обоими концами 20S протеасомы или вместе с регуляторным комплексом РА28 образовывать гибридную протеасому (РА700-20S-РА28) (Soza et al., 1997; Hendil et al., 1998). Комплекс 20S протеасомы с активатором РА28 способен к протеолизу небольших пептидов, но не может гидролизовать белки, даже если они уже денатурированы или убиквитинированы (Tanahashi et al., 1997). Возможными субстратами этого комплекса являются также более длинные продукты гидролиза 26S протеасомой (Tanahashi et al., 1997), имеющие после такого «процессинга» длину 8—9 аминокислот, идеальную для презентации антигенных пептидов на МНС I (Kloetzel et al., 1999; Kloetzel, 2001). Обнаруженные гибридные протеасомы указывают на необходимость сложного процесса выбора субстратов регуляторной частицей РА700 и регуляции продуктов РА28 для эффективного производства антигенных пептидов.

У больных системной красной волчанкой был обнаружен еще один ядерный белок, описанный как ядерный Ki-антиген (Nikaido et al., 1990). Благодаря 40%-ной гомологии с РА28 α и РА28 β и способности *in vitro* в виде гептамера образовывать комплекс с 20S протеасомой он был переименован в РА28 γ (Realini et al., 1997). Позже было обнаружено, что РА28 γ , так же как РА28 α и РА28 β , находится не только в ядре, но и в цитоплазме клеток (Та-

hashi et al., 1997). Под действием γ -IFN количество РА28 α и РА28 β и соответствующих мРНК резко увеличивается (что было показано *in vivo* и *in vitro*), тогда как белок РА28 γ исчезает, несмотря на неизменный уровень его мРНК (Tanahashi et al., 1997). Таким образом, для белка РА28 γ млекопитающих не показано участие в иммунном ответе, поскольку отсутствие индукции РА28 γ под действием γ -IFN и его ядерная локализация делают маловероятным участие этого белка в производстве пептидов для презентации на молекулах МНС I (Masson et al., 2001). Интересно, что содержание мРНК РА28 γ сильно возрастает в течение фазы S клеточного цикла, кроме того, уровень соответствующего белка очень велик в бесконтрольно пролиферирующих клетках (Tanahashi et al., 1997). При этом какого-либо изменения в содержании РА28 α и РА28 β не происходит, что указывает на возможную роль РА28 γ в процессе деления клетки и онкогенезе (Tanahashi et al., 1997; Gao et al., 2004). Интересно, что присоединение к 20S протеасоме комплекса РА28 γ приводит к подавлению химотрипсин-подобной и постглутамилгидролазной активностей, но к стимуляции трипсин-подобной активности 20S протеасомы (Gao et al., 2004).

Регулятор РА26 был обнаружен у *Trypanosoma brucei* и представляет собой гомогептамерный комплекс, состоящий из гомологичного белкам РА28 полипептида с мол. массой 26 кДа (To et al., 1997). Связывание комплекса РА26 с 20S протеасомой приводит к проталкиванию N-концов α -субъединиц внутрь РА26-частицы с последующей активацией 20S коровой частицы и ускоренным выходом продуктов протеолиза из протеасомы (Yao et al., 1999).

Активатор РА200 способен стимулировать гидролиз небольших пептидов. При воздействии гамма-излучения этот белок обнаруживается в ядре, а мутации в РА200 дрожжей приводят к их повышенной чувствительности к блеомицину, что может свидетельствовать об участии РА200 в репарации ДНК (Ustrell et al., 2002, 2005). У млекопитающих РА200 индуцируется в условиях предельной мышечной нагрузки, однако функциональное значение этого явления пока непонятно (Rechsteiner, Hill, 2005).

В качестве посттрансляционных модификаций субъединиц протеасом, согласно существующим для различных видов организмов литературным данным, могут выступать фосфорилирование (Bose et al., 1999, 2004; Tokumoto et al., 1999; Fernandez Murray et al., 2002; Iwafune et al., 2002, 2004), гликозилирование (Sumegi et al., 2003; Zachara, Hart, 2004), N-ацетилирование (Tokunaga et al., 1990; Arendt, Hochstrasser, 1999; Kimura et al., 2000; Claverol et al., 2002) и 4-гидрокси-2-ноненил-алкилирование (Farout et al., 2006; Gomes et al., 2006; Humbard et al., 2006).

Из всех возможных модификаций чаще всего исследуется фосфорилирование, так как оно играет важнейшую роль в регуляции многих биологических процессов. Фосфорилирование белков является наиболее распространенным способом изменения активности регуляторных белков и играет важную роль практически во всех клеточных процессах: в контроле клеточного цикла, в передаче сигнала, в транскрипции и апоптозе. Фосфорилирование белков также участвует в регуляции деградации белков по АТФ- и убиквитинзависимому путям (Mason et al., 1996). В настоящее время известно, что ряд субъединиц как 20S протеасом, так и регуляторных комплексов 19S и РА28 находится в клетке в фосфорилированном состоянии (Bose et al., 1999, 2004; Tokumoto et al., 1999;

Fernandez Murray et al., 2002; Iwafune et al., 2002, 2004; Tsimokha et al., 2007). Впервые эти данные были получены на препаратах 20S протеасом, выделенных из личинок дрозофилы, где были обнаружены четыре фосфорилированные субъединицы протеасомы (Haass et al., 1989). Впоследствии было показано, что по крайней мере две субъединицы 20S протеасом млекопитающих фосфорилируются *in vitro* цАМФ-зависимой протеин-киназой (PKA), соочищающейся с препаратами бычьих протеасом (Pereira et al., 1990). Было показано также, что PKA активирует протеасомы как *in vitro*, так и *in vivo* через фосфорилирование по серину АТФазной субъединицы 19S комплекса Rpt6 (Zhang et al., 2007). Кроме того, было обнаружено фосфорилирование *in vitro* протеасомной субъединицы с мол. массой 30 кДа с помощью СК2 (казеинкиназа II), соочищающейся с протеасомами эритроцитов человека (Ludemann et al., 1993). Протеасомная субъединица $\alpha 6$, выделенная из клеток риса, фосфорилируется серин/треониновой киназой, активность которой подавляется специфическими ингибиторами СК2 (Umeda et al., 1997); субъединица $\alpha 4$ протеасом из ооцитов золотой рыбки фосфорилируется *in vitro* СК1 α (казеинкиназой I α) (Horiguchi et al., 2005); субъединицы $\alpha 3$ и $\alpha 7$ протеасом из клеток COS7 фосфорилируются и *in vivo*, и *in vitro* СК2 (Bose et al., 2004). Кроме этого, были выявлены фосфорилированные протеасомные субъединицы $\alpha 2$, $\alpha 4$ и $\alpha 7$ (Iwafune et al., 2002) и $\alpha 3$, $\alpha 5$ и $\alpha 6$ (Fernandez Murray et al., 2002) в дрожжах, четыре субъединицы у млекопитающих ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ и $\alpha 7$) (Wakata et al., 2004) и одна субъединица $\alpha 4$ в ооцитах лягушки *Xenopus* (Tokumoto et al., 1999; Iwafune et al., 2002).

Исследование фосфорилированных аминокислот субъединиц протеасом из печени крыс и плаценты человека показало, что субъединица $\alpha 2$ содержит фосфотирозин и фосфотреонин, а в составе субъединиц $\beta 6$, $\alpha 7$, $\alpha 3$ и $\alpha 5$ был обнаружен фосфосерин (Castano et al., 1996; Mason et al., 1996; Wehren et al., 1996; Bose et al., 1999). Субъединица $\alpha 7$ протеасом из эритроцитов человека содержит фосфосерин (Claverol et al., 2002). В клетках человека линии L132 субъединицы протеасом $\alpha 3$ и $\alpha 7$ содержат фосфосерин (Mason et al., 1996). В дрожжах белки протеасом $\alpha 2$ и $\alpha 4$ фосфорилированы по серину и треонину, а $\alpha 7$ — по тирозину (Iwafune et al., 2004). У археона *Haloferax volcanii* β -субъединица содержит фосфосерин (Humbard et al., 2006).

Регуляторные комплексы протеасом (PA28 и PA700) также содержат фосфорилированные субъединицы. Так, фосфорилированные субъединицы были найдены в IIS регуляторах, полученных из лизатов ретикулоцитов кролика (Li et al., 1996). Анализ фосфоаминокислот в составе комплексов PA28 эритроцитов человека показал, что фосфорилирование происходит по сериновым основаниям. Ряд субъединиц 19S комплекса, включая одну из АТФаз (Rpt2/S4), тоже фосфорилируется *in vivo* (Mason et al., 1998). В клетках человека линии 293 было выявлено восемь фосфорилированных субъединиц 19S регуляторного комплекса: одна АТФаза (Rpt5) и семь не-АТФазных (Rpn1, Rpn2, Rpn6, Rpn8, Rpn9, Rpn10 и Rpn11) (Wang et al., 2007).

Предполагается, что фосфорилирование/дефосфорилирование субъединиц протеасом участвует в регуляции ферментативных активностей протеасом через конформационные изменения (Mason et al., 1996; Bose et al., 2004). Так, было обнаружено, что дефосфорилирование субъединиц протеасом $\alpha 3$ и $\alpha 7$ приводит к снижению двух пеп-

тидазных активностей (трипсин-подобной и постглутамилгидролазной) (Mason et al., 1996). Неспецифическое же дефосфорилирование протеасомных субъединиц вызывало изменение специфичности трипсин- и химотрипсин-подобных активностей протеасом в клетках человека линии K562 (Цимоха и др., 2007а, 2007б; Tsimokha et al., 2007). Кроме того, после предварительного дефосфорилирования протеасом наблюдалось изменение эндорибонуклеазной активности протеасом в клетках человека линий A431 (Евтеева и др., 2003) и K562 (Токтарова и др., 2004; Миттенберг и др., 2007).

Фосфорилирование/дефосфорилирование различных субъединиц как 20S, так и 26S протеасомы может также контролировать присоединение регуляторных белков к концам коровой частицы и являться одним из механизмов изменения соотношения этих двух форм, а также гибридной (PA700-20S-PA28) протеасомы и иммунопротеасомы (Bose et al., 2001; Rivett et al., 2001).

Фосфорилирование протеасомных субъединиц регулируется также при изменении функционального состояния клеток. Так, в ооцитах лягушки *Xenopus* уровень фосфорилирования субъединицы $\alpha 4$ изменяется в зависимости от фазы клеточного цикла, она гиперфосфорилирована в фазе G₂, а в митозе, наоборот, находится в дефосфорилированном состоянии (Tokumoto et al., 1999; Wakata et al., 2004). Также изменялся статус фосфорилирования протеасом при апоптозе (Цимоха и др., 2006, 2007а, 2007б; Tsimokha et al., 2007) и эритроидной дифференцировке (Миттенберг и др., 2007) в клетках человека линии K562.

N-ацетилирование было выявлено у субъединиц протеасом, выделенных из клеток дрожжей (Arendt, Hochstasser, 1999; Kimura et al., 2000) и гепатоцитов крыс (Tokunaga et al., 1990). Кроме того, было показано наличие N-ацетилирования $\alpha 7$ субъединицы протеасом эритроцитов человека (Claverol et al., 2002) и $\alpha 4$ —7-, $\beta 3$ -, $\beta 4$ -, Rpt3—6-, Rpn1-, Rpn2-, Rpn6-, Rpn13-субъединиц протеасом клеток человека линии 238 (Wang et al., 2007) и ацетилирование $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -субъединиц археона *Haloferax volcanii* (Humbard et al., 2006).

Масс-спектральные исследования модификаций протеасомных субъединиц выявили N-концевой глициновый остаток у субъединицы Rpt2 в человеческих (Wang et al., 2007), мышинных (Gomes et al., 2006), дрожжевых (Kimura et al., 2003) клетках и в клетках риса (Shibahara et al., 2002, 2004). Важно отметить, что присоединенный к субъединице Rpt2 N-концевой глициновый остаток в свою очередь также подвержен миристилированию (Gomes et al., 2006). Поскольку данная модификация участвует в белок-белковых и белок-мембранных взаимодействиях, предполагается участие Rpt2 во взаимодействии 26S протеасом с другими белками или мембранами (Lee, Shaw, 2007; Wang et al., 2007).

У дрожжевых протеасом была выявлена еще одна модификация субъединиц — глутатионирование цистеиновых остатков (Demasi et al., 2001, 2003). Химотрипсин-подобная активность протеасом при S-глутатионировании ингибировалась значительно сильнее, чем трипсин-подобная активность, в то время как каспаз-подобная активность протеасом с этой модификацией не изменялась (Demasi et al., 2003).

Протеасомы также подвержены и O-гликозилированию (Sumegi et al., 2003; Zachara, Hart, 2004). Подобно фосфорилированию обратимо O-гликозилируются остатки серина, треонина и тирозина (Wells et al., 2002). Пред-

полагается, что роль гликозилирования состоит в обратимом блокировании участка фосфорилирования (Wells et al., 2002). Поскольку фосфорилирование многих белков, в частности, является сигналом к убиквитинированию для последующей деградации протеасомами, предотвращение фосфорилирования путем конкурентного присоединения N-ацетилглюкозамин может увеличивать время полужизни белка (Rechsteiner et al., 1993).

Анализ протеасом из хрусталика глаза пожилых людей показал присутствие гликозилированных субъединиц (Viteri et al., 2004), причем такая окислительная модификация сопровождалась снижением протеолитической активности протеасом: частичное снижение трипсин- и химотрипсин-подобных активностей и полное подавление каспаз-подобной активности (Viteri et al., 2004).

В крысиных гепатоцитах было обнаружено гликозилирование протеасомной субъединицы $\alpha 6$ (Wells et al., 2002). Кроме того, по крайней мере восемь субъединиц 19S регуляторного комплекса и восемь субъединиц 20S протеасомы *Drosophila* подвержены O-гликозилированию (Sumegi et al., 2003). Так, было показано, что АТФазная субъединица Rpt2 O-гликозилируется как *in vivo*, так и *in vitro*, причем такое модифицирование снижало протеолитическую активность протеасом за счет подавления АТФазной активности этой субъединицы (Zhang et al., 2003).

Последние исследования в этой области показали, что субъединица Rpn2 19S регуляторного комплекса если не была N-ацетилирована, то содержала метионин сульфоксид (Wang et al., 2007). Однако у протеасом из *archaea Haloferox volcanii* субъединица $\alpha 1$ и субъединицы β -типа содержали обе эти модификации (Humbard et al., 2006). У дрожжей было показано наличие окисленного метионина у протеасомных субъединиц $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 4$ и $\beta 7$ (Iwafune et al., 2002).

Первоначально полагали, что убиквитинзависимый протеолиз происходит только в цитоплазме. Позже оказалось, что протеасомы обнаруживаются также и в ядрах клеток (Knuehl et al., 1996; Machiels et al., 1996; Von Mikecz, 2006). Так, например, в гепатоцитах крысы 16 % протеасом локализованы в ядре, 14 % связаны с эндоплазматическим ретикулумом (ЭР), а остальные 70 % — с цитоплазматическим матриксом (Rivett et al., 1992). Однако процентное соотношение содержания протеасом в клетке непостоянно и изменяется в зависимости от типа клеток. Так, например, в клетках центральной нервной системы крыс наблюдается высокое содержание протеасом в ядре (Rivett, 1998). При ухудшении условий существования клетки количество протеасом в ядре резко уменьшается, тогда как в цитоплазме, напротив, увеличивается (Wojcik, DeMartino, 2003).

В цитоплазме протеасомы ассоциированы с цитоскелетом: промежуточными филаментами (это взаимодействие регулируется в зависимости от стадии клеточного цикла) (Cox et al., 1994), актиновыми филаментами (Галкин и др., 1998а, 1998б) и актомиозиновыми комплексами (Ryabova et al., 1994). А также протеасомы ассоциированы с цитоплазматической стороной гладкого ЭР и цис-стороной аппарата Гольджи (Palmer et al., 1996; Rivett, 1998; Wojcik, DeMartino, 2003). По всей видимости, эти протеасомы преимущественно участвуют в ЭР-ассоциированной деградации неправильно свернутых белков, которые с помощью селективного транспорта доставляются в цитозоль, и некоторых белков, конститутивно регулируемых убиквитинзависимым протеолизом, напри-

мер интегральных белков ЭР. С мембранами ЭР ассоциированы в основном иммунопротеасомы, где они могут близко взаимодействовать с ТАР-транспортером (Transport Associated Protein), который доставляет продукты протеолиза внутрь ЭР для последующей ассоциации с молекулами МНС I (Rivett, 1998).

В ядре протеасомы находятся в ядерном матриксе и вокруг ядрышка, а также в области ядрышкового организатора (Rivett, 1998). Согласно одним данным, протеасома способна целиком проникать в ядро (Wang et al., 1997). Согласно другим исследованиям (Lehmann et al., 2002), в ядро импортируются предшественники протеасомы, содержащие непротессированные β -субъединицы и фактор Ump1. Импорт в ядро происходит благодаря сигналам ядерной локализации cNLS (classical Nuclear Localization Signals), расположенных на некоторых субъединицах 20S протеасомы (Nederlof et al., 1995; Wang et al., 1997; Lehmann et al., 2002). Возможно, что фосфорилирование по тирозину субъединиц с сигналом ядерной локализации играет дополнительную роль в доставке протеасом в ядро (Rivett, 1998; Wojcik, DeMartino, 2003).

Присутствие протеасом в различных частях и компартментах клетки говорит об абсолютной значимости и универсальности биологических механизмов, в которых принимают участие эти комплексы.

Ферментативные активности протеасом

Протеолитическая активность обнаружена у 20S протеасомы. В отсутствие 19S комплекса 20S протеасома может гидролизовать малые пептиды и некоторые денатурированные белки, но не может осуществлять протеолиз полиубиквитинированных белков.

В настоящее время известно по крайней мере пять пептидазных активностей протеасом, реализующихся в синтетических и природных пептидах и белках (Orlowski, Wilk, 2000). Первые три — трипсин-подобная (осуществляется субъединицами $\beta 2$ и $\beta 2i$), химотрипсин-подобная ($\beta 5$, $\beta 5i$ и $\beta 1i$), каспаз-подобная или постглутамилидгидролазная ($\beta 1$) активности (рис. 1). Две другие осуществляют разрыв пептидных связей после аминокислот с разветвленной цепью (вероятно, $\beta 1$) и между небольшими нейтральными аминокислотами. Первые три «классические» активности заключаются в разрезании связей преимущественно после основных, гидрофобных и кислых аминокислот соответственно (Orlowski, Wilk, 2000).

Специфичность протеасом, как и других клеточных протеаз, определяется первичной структурой участков, фланкирующих расщепляемую пептидную связь (участки протяженностью до 16 аминокислот), так называемой вторичной специфичностью (Kuttler et al., 2000; Orlowski, Wilk, 2000). Таким образом, каталитические субъединицы протеасом помимо расщепления связи, являющейся предпочтительной, могут также гидролизовать пептидные связи другого типа (Orlowski, Wilk, 2000).

Было показано, что 20S-протеасома принадлежит к классу N-терминальных нуклеофильных гидролаз (Brannigan et al., 1995). В протеасомах *S. cerevisiae* 4 β -субъединицы содержат N-концевой треонин: $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ и $\beta 7$ (Groll et al., 1997). Все они изначально были синтезированы с N-концевыми пропептидами различной длины, которые при образовании протеасомы были удалены в результате автокаталитического расщепления связи между Gly и Thr.

Мутации этих двух аминокислот приводят к снижению уровня процессинга и, следовательно, каталитической активности (Löwe et al., 1995). Следует отметить, что, несмотря на наличие у $\beta 7$ -субъединицы N-концевого Thr, она не обнаруживает каталитических активностей (Heinemeier et al., 1997).

Аналогичные данные были получены для субъединиц протеасом млекопитающих: X ($\beta 5$), Y ($\beta 1$) и Z ($\beta 2$) (Orlowski, Wilk, 2000). Функции остальных четырех β -субъединиц пока неизвестны, хотя мутации в их аминокислотных последовательностях приводят к утрате комплексом протеолитической активности (Glickman, Ciechanover, 2002).

В протеасомах архебактерий присутствуют 14 идентичных каталитических центров, способных расщеплять почти любые связи, включая связи после основных аминокислот (трипсин-подобная активность) и после Asp (Orlowski, Wilk, 2000). Однако с гораздо большей эффективностью они осуществляют гидролиз связей после гидрофобных аминокислот. У субъединиц протеасом эубактерий обнаружена химотрипсин-подобная активность (Orlowski, Wilk, 2000).

Химотрипсин-подобная активность сильно возрастает в присутствии SDS, жирных кислот и некоторых фосфолипидов (Shibatani, Ward, 1995). Ингибирующее влияние на химотрипсин-подобную активность оказывают вещества, ковалентно присоединяющиеся к гидроксильной группе N-концевого Thr. Наиболее сильный ингибитор химотрипсин-подобной активности — Z-Gly-Gly-leucinal (Figueiredo-Pereira et al., 1995), под действием которого, однако, трипсин-подобная активность усиливается (Orlowski, Wilk, 2000). Еще один ингибитор химотрипсин-подобной активности — 3,4-дихлороизокумарин (DCI), причем трипсин-подобная и постглутамилгидролазная активности более устойчивы к его действию (Orlowski, Wilk, 2000).

Трипсин-подобная активность наиболее чувствительна к действию агента, блокирующего тиол, N-этилmaleида (NEM) и леупептина (Dick et al., 1992). Интересно, что преинкубация с леупептином приводила к устойчивости протеасомной трипсин-подобной активности к NEM. Большая устойчивость проявляется по отношению к ингибиторам, действующим на активный центр фермента: лактацистину, DCI и т. д. (Orlowski, Wilk, 2000).

Каспаз-подобная (постглутамилгидролазная) активность сильно возрастает в присутствии небольших концентраций SDS и жирных кислот (Orlowski, Wilk, 2000), а также может быть стимулирована добавлением ионов магния (Pereira et al., 1992).

Ингибирование каспаз-подобной активности приводит к накоплению Ub-белковых конъюгатов, индуцируя тем самым апоптоз в трансформированных клеточных линиях (Orlowski et al., 1998).

Одним из важных механизмов регуляции активности протеасом является фосфорилирование. Анализ функционального значения фосфорилирования субъединиц протеасом показал, что эта модификация оказывает влияние на протеолитическую активность частиц (Satoh et al., 1995; Mason et al., 1996; Rivett et al., 2001; Iwafune et al., 2002; Bardag-Gorce et al., 2004; Bose et al., 2004; Цимоха и др., 2006, 2007а, 2007б; Tsimokha et al., 2007).

Эндорибонуклеазная активность 20S-протеасом впервые была выявлена по отношению к РНК вируса табачной мозаики (Akhyat et al., 1987). Недавно было показано, что эндорибонуклеазной активностью об-

ладают и 20S протеасомы, выделенные из подсолнечника, а в качестве субстратов были использованы РНК вируса табачной мозаики и вируса мозаики салата (Ballut et al., 2003). Потом было установлено, что эндорибонуклеазной активностью обладают и 26S протеасомы из клеток линий человека A431 и K562 и в качестве субстрата для расщепления могут выступать различные РНК эукариот — как рибосомные, так и специфические информационные (Евтеева и др., 2000; Миттенберг и др., 2002, 2007; Токтарова и др., 2004). Важно отметить, что в отличие от 20S протеасом 26S протеасомы способны расщеплять естественные клеточные РНК, содержащие поли(A⁺)-концы (информационные РНК) (Ballut et al., 2003).

Было показано, что деградация высокомолекулярных РНК 20S протеасомами происходит гораздо эффективнее, чем тем же количеством 26S протеасом. Вероятно, присоединение регулятора 19S вызывает в протеасомах конформационные изменения, приводящие к снижению эндорибонуклеазной активности 26S частиц (Миттенберг и др., 2002).

При определении условий реакции оказалось, что эндорибонуклеазная активность 20S протеасом нуждается в присутствии в реакционной смеси двухвалентных катионов магния или кальция в концентрации 1.25—5.00 мМ (Миттенберг и др., 2002), а оптимальные значения pH, при которых РНКазы протеасом активны, лежат в пределах pH 7.0—7.4 (Petit et al., 1997). Кроме того, эндорибонуклеазная активность протеасом зависит от температурных условий, и оптимальная температура реакции составляет 37 °С (Akhyat et al., 1987; Миттенберг и др., 2002).

Деградация РНК протеасомами не является случайной, более того, она высокоспецифична. Так, например, 9S-глобиновая мРНК и лизил-тРНК не подвергаются расщеплению (Gautier-Bert et al., 2003). А наименьший из продуктов нуклеолиза РНК вируса табачной мозаики протеасомами имел размер порядка 120 нуклеотидов, что соответствовало длине молекулы 5S-рибосомной РНК (Petit et al., 1997). Предполагается, что протеасомы способны узнавать нуклеотидную последовательность, локализованную в 3'-нетранслируемой области, недалеко от поли-A-конца, и состоящую из повторов AUUUA (Jargousse et al., 1999). Особенности вторичной структуры РНК также влияют на эндонуклеолиз, осуществляемый протеасомами (Миттенберг и др., 2002). Так, например, 26S протеасомы проявляют более высокую активность по отношению к денатурированной РНК, чем к нативной (Миттенберг и др., 2002), что, вероятно, объясняется наличием у высокомолекулярных РНК выраженной вторичной структуры, влияющей на связывание нуклеазного центра протеасом с субстратом.

При использовании иммунохимических методов было обнаружено, что эндорибонуклеазная активность 20S протеасом локализована на субъединицах α -типа, а именно на субъединицах ζ ($\alpha 5$ или зета, 28 кДа) и ξ ($\alpha 1$ или йота, 27 кДа) (рис. 1), причем ζ -субъединица обладает более сильной нуклеазной активностью, чем ξ (Petit et al., 1997). Протеасомы, таким образом, не являются рибозимами, а их нуклеазная активность ассоциирована с определенными РНКазными центрами.

Было показано, что эндорибонуклеазная активность протеасом зависит от физиологического состояния клетки. Так, были выявлены изменения в активности РНКазы протеасом при проведении сигнала от рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) в клетках линии A431 (Евтеева и др., 2000) и при индукции дифференцировки

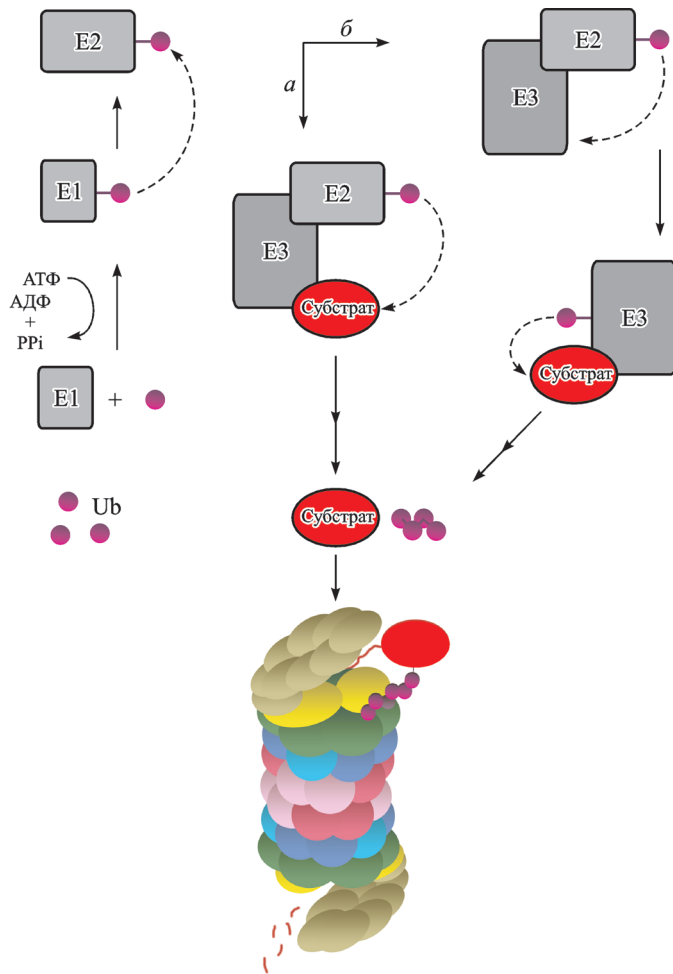


Рис. 2. Убиквитин-протеасомная система.

Реакция убиквитинирования осуществляется каскадом E1-E2-E3 ферментов. Начальный этап гидролиза белков 26S протеасомой сопровождается энергетически зависимой активацией молекулы убиквитина Ub-активирующим ферментом E1 с образованием связи между E1 и убиквитином. Затем E1 переносит активированный убиквитин на Ub-конъюгирующий фермент E2, который взаимодействует со следующим ферментом E3. Функция E3 заключается в ковалентном присоединении убиквитина к молекуле субстрата. *a* — фермент E3 функционирует как посредник в переносе убиквитина от фермента E2 к субстрату; *b* — убиквитин переносится с фермента E2 на E3 с последующим переносом на субстрат.

(Миттенберг и др., 2002, 2007) и апоптоза в клетках K562 (Токтарова и др., 2004; Tsimokha et al., 2007; Цимоха и др., 2007а, 2007б).

В клетке нуклеаза протеасом, вероятно, подвергается строгому регуляторному контролю, и предполагается, что одним из механизмов регуляции РНКазной активности может быть фосфорилирование и дефосфорилирование субъединиц протеасом. Так, дефосфорилирование протеасом из клеток K562, индуцированных к дифференцировке или апоптозу, как и протеасом из клеток A431 при проведении сигнала от рецептора ЭФР, приводило к подавлению их РНКазы (Евтеева и др., 2000, 2003; Миттенберг и др., 2002, 2007; Цимоха и др., 2007а, 2007б; Tsimokha et al., 2007).

В связи с наличием регулируемой эндорибонуклеазной активности у протеасом предполагается, что протеасомы могут принимать участие в контроле стабильности мРНК — важном этапе регуляции экспрессии генов.

Убиквитинзависимый протеолиз

Деграляция белков по убиквитин-протеасомному пути включает в себя два основных этапа — ковалентное присоединение к субстрату полиубиквитиновой цепочки и деграцию помеченного таким образом белка 26S протеасомой.

Убиквитин (Ub, от лат. «ubiquitous» — повсеместный) — маленький белок, присутствующий во всех изученных эукариотических клетках (Pickart, Eddins, 2004). Это высококонсервативный белок: из составляющих его молекулу 76 аминокислот всего лишь 2 аминокислоты отличаются молекулу убиквитина растений от молекулы убиквитина дрожжей или 3 от молекулы убиквитина животных (Smalle, Vierstra, 2004; Groll et al., 2005). Убиквитин очень стабилен и образует глобулярную структуру с выдающимся С-концом, на котором находится Gly-76, участвующий в полиубиквитинировании (Hochstrasser, 1996; Groll et al., 2005).

Полиубиквитин присоединяется к молекуле белка — субстрату — за счет формирования изопептидной связи между Gly-76 убиквитина и ϵ -NH₂-группой одного из лизиновых оснований внутри молекулы субстрата путем трехступенчатого каскада с использованием энергии АТФ (Ciechanover, Brundin, 2003).

Реакция убиквитинирования осуществляется E1-E2-E3-каскадом ферментов (Hershko, Ciechanover, 1998; Wolf, 2004; Wolf, Hilt, 2004; Nandi et al., 2006) (рис. 2). Начальный этап гидролиза белков 26S-протеасомой сопровождается энергетически зависимой активацией молекулы убиквитина Ub-активирующим ферментом E1 (Uba—Ubiquitin activating enzyme) с образованием тиоэфирной связи между цистеином E1 и карбоксильной группой остатка Gly-76 убиквитина. Затем E1 переносит активированный убиквитин на цистеин Ub-конъюгирующего фермента E2 (Ubc—Ubiquitin conjugating enzyme), который взаимодействует со следующим ферментом — Ub-лигазой E3 (Ubl—Ubiquitin ligase) (Абрамова и др., 2002; Ciechanover, Brundin, 2003). Функция E3 заключается в ковалентном присоединении убиквитина к молекуле субстрата (Ciechanover, Brundin, 2003), причем в зависимости от фермента E3 этот фермент функционирует как посредник в переносе убиквитина от E2 к субстрату (рис. 2, *a*) или происходит перенос убиквитина сначала с E2 на E3, а потом уже с E3 на субстрат (рис. 2, *b*). На данный момент известно около 100 различных Ub-лигаз E3, которые и определяют высокую специфичность системы. E3-ферменты можно разделить на три класса на основании структуры их каталитических доменов. Первый класс — ферменты E3, содержащие НЕСТ-домены (Homology to E6-AP Carboxyl Terminus) — консервативную область в 350 аминокислотных остатков, гомологичную С-концу белка E6-AP (E6-Associated Protein), наиболее хорошо изученного E3; второй класс — ферменты E3, содержащие домены RING-finger, кодируемые геном *ring* (Really Interesting New Gene) — мотив из восьми цистеиновых и гистидиновых остатков, которые удерживают два иона цинка; третий класс — ферменты E3, содержащие U-box-домены — консервативные области в 70 аминокислотных остатков, близкие по третичной структуре к RING-finger, но не содержащие хелатирующих металл аминокислотных остатков (Hatakeyama et al., 2001; Абрамова и др., 2002). В некоторых случаях мультиубиквитинирование требует деятельности дополнительных факторов, названных факторами элонгации E4 (Ciechanover, Brundin, 2003; Hoppe, 2005).

Молекула убиквитина присоединяется к лизину, находящемуся внутри последовательности белка-мишени. Причем один и тот же белок может быть модифицирован по одному или нескольким лизином с помощью одной молекулы убиквитина, полиубиквитиновой цепи или их комбинации (Ciechanover, Brundin, 2003).

Моноубиквитинирование во многих случаях служит сигналом деградации белка в лизосоме/вакуоли (Ciechanover, Brundin, 2003), но может также привести к событиям, не связанным с протеолизом: к модификации (например, к последующему метилированию) или к изменению локализации в клетке (Bach, Ostendorf, 2003).

Чаще всего происходит несколько циклов убиквитинирования, причем каждая последующая молекула убиквитина присоединяется к лизину предыдущей молекулы (Pickart, 2001). Эксперименты *in vivo* показали, что в образовании изопептидной связи между двумя убиквитинами могут участвовать Lys-11, Lys-29, Lys-48 и Lys-63, причем тип связи оказывает сильное влияние на дальнейшую судьбу субстрата (Bach, Ostendorf, 2003). Так, 26S протеасома узнает полимеры, связанные через Lys-48 (Bach, Ostendorf, 2003; Smalle, Vierstra, 2004) и состоящие из четырех и более молекул убиквитина. Связывание через Lys-29 также, возможно, приводит к деградации субстрата (Bach, Ostendorf, 2003). Однако если присоединение полиубиквитина происходит через Lys-63 белка, то протеолиза не наблюдается. Подобная модификация влечет за собой изменение свойств субстрата, который затем может участвовать в активации транскрипции (Ciechanover, Brundin, 2003; Herrmann et al., 2004).

Моно- и полиубиквитинирование происходят одним и тем же путем с использованием одинаковых ферментов, хотя в некоторых случаях элонгацию цепи катализирует отличная от E3 лигаза, часто именуемая фактором элонгации E4 (Ciechanover, Brundin, 2003). В подавляющем большинстве случаев для взаимодействия субстрата с E3-лигазой, предшествующего убиквитинированию, необходима модификация субстрата или E3-лигазы (например, фосфорилирование и т. д.), другой путь — взаимодействие субстрата с дополнительными белками, например шаперонами (Ciechanover, Brundin, 2003).

У эукариот существует семейство белков DUB (**DeUbiquitinating enzymes**), осуществляющих отщепление полимеров и (или) молекул убиквитина от протеасомных субстратов как в процессе деградации последних, так и просто обращая убиквитинирование (Amerik, Hochstrasser, 2004; Dahlmann, 2005; Schmidt et al., 2005). Некоторые субъединицы 19S регуляторного комплекса протеасом обладают Ub-гидролазной активностью, например Rpn11 у *S. cerevisiae* (Glickman, Ciechanover, 2002; Smalle, Vierstra, 2004). Все DUB проявляют высокую специфичность по отношению к убиквитину. Они узнают молекулы убиквитина и удаляют практически любую аминокислоту или пептид с его C-концевого глицина (Smalle, Vierstra, 2004). Осуществляя таким образом деубиквитинирование, DUB могут регулировать время полужизни некоторых белков.

В качестве сигналов деградации белков в протеасоме могут выступать элементы первичной структуры, вторичные посттрансляционные модификации, а также ассоциация с некоторыми вспомогательными белками (вирусные онкобелки и молекулярные шапероны). К первой группе сигналов относятся определенные N-концевые аминокислоты (правило N-конца), небольшие аминокислотные последовательности внутри белковой молекулы, богатые

Ser, Pro, Thr, Glu, Asp, — PEST-последовательности (Rechsteiner, Rogers, 1996) и специальные сайты деструкции (destruction box), состоящие из 9 аминокислот (Kile et al., 2002; Zhou, 2005). Деграционные сигналы обычно имеются у короткоживущих белков (например, факторы регуляции транскрипции, онкобелки, супрессоры опухолей и белки, участвующие в регуляции клеточного цикла), частично разрушенных белков или у белков с нарушенной третичной структурой. Ко второй группе сигналов деградации белков относится, например, фосфорилирование (IkB α) (Tanaka et al., 2001; Alvarez-Castelao, Castano, 2005).

Убиквитиннезависимый протеолиз

Долгое время считалось, что для узнавания и последующей деградации протеасомами белки должны подвергнуться предшествующей модификации полиубиквитиновыми цепями. В действительности, однако, все больше данных о том, что убиквитиннезависимая протеасомная деградация, по всей видимости, была в значительной степени недооценена (Jariel-Encontre et al., 2008). Так, в частности, многие протоонкобелки и онкосупрессорные белки получают уникальную возможность быть субстратами и у убиквитиннезависимой протеасомной подсистемы, поэтому нарушения в их деградации могут иметь онкогенные последствия.

Не так давно появились данные о том, что 26S протеасомы могут разрушать полипептиды, маркированные не убиквитином, а другими специальными белками, выполняющими аналогичную функцию (Orlowski, Wilk, 2003). Так, была обнаружена убиквитиннезависимая деградация *in vivo* и *in vitro* орнитиндекарбоксилазы (ODC — **Ornithine DeCarboxylase**), происходящая в присутствии АТФ и антизима (Murakami et al., 1992). Нековалентное связывание антизима с ODC служит стимулом для гидролиза фермента протеасомами. При разрушении орнитиндекарбоксилазы антизим высвобождается и может быть использован в протеолизе другой молекулы ODC (Coffino, 2001).

Кроме того, обнаружено, что такие белки, как c-Jun (Jariel-Encontre et al., 1995), кальмодулин (Tarcsa et al., 2000), тропонин C (Benaroudj et al., 2001), опухолевый супрессор p53 (Asher et al., 2002) и ингибитор циклинзависимой киназы p21^{Cip1/WAF1} (Sheaff et al., 2000), разрушаются протеасомами посредством убиквитиннезависимого пути, причем p53 и p21^{Cip1/WAF1} подвергаются еще и убиквитинзависимому протеолизу (Orlowski, Wilk, 2003; Hoyt, Coffino, 2004).

Наличие больших количеств свободных 20S протеасом в клетках по сравнению с 26S-комплексами свидетельствует о важной роли коровой частицы в протеолизе внутриклеточных белков (Orlowski, Wilk, 2003). Так, деградации с помощью этого комплекса подвергаются белки, не имеющие третичной структуры, некоторые короткоживущие регуляторные белки, долгоживущие белки, а также окисленные, развернутые, мутированные и поврежденные белки. Кроме того, хорошими субстратами 20S протеасомы являются не прошедшие процессинг в ЭР пептиды (Orlowski, Wilk, 2003).

p21^{Cip1} направляет сам себя на деградацию, связываясь своим C-концом с одной из α -субъединиц 20S протеасомы (Touitou et al., 2001). Возможно, участие α -субъединицы в протеолизе указывает на основную причину де-

градации белков в 20S протеасоме в отсутствие регуляторных комплексов. Кроме того, недавно получены данные о том, что субстраты 20S протеасомы сами открывают канал протеолитической камеры (Liu et al., 2003). Кроме того, 20S протеасома играет исключительную роль в протеолизе окисленных белков, которые не могут быть гидролизованы с помощью 26S протеасомы даже в присутствии убиквитина и АТФ. Возможно, деградации окисленного субстрата в 20S протеасоме способствует снижение гидрофобности поверхности белка в результате окисления (Orlowski, Wilk, 2003). Также потенциальными субстратами 20S протеасомы могут быть и фрагменты белков, образованные в результате частичного гидролиза другими ферментами (Orlowski, Wilk, 2003).

Участие убиквитин-протеасомной системы в клеточных процессах

Субпопуляции протеасом играют ключевую роль во многих основных, важных для жизнедеятельности клетки процессах: регуляции клеточного цикла и деления клетки, дифференцировке и развитии, клеточном ответе на стресс и действие внеклеточных эффекторов, морфогенезе нейронных сетей, модуляции рецепторов клеточной поверхности, ионных каналов и секреторного пути, репарации ДНК, регуляции транскрипции, долговременной памяти, иммунном ответе и биогенезе некоторых клеточных органелл (Ciechanover, Brundin, 2003; Wolf, Hilt, 2004; Devoy et al., 2005; Auld, Silver, 2006; Reed, 2006; Reed, Gillette, 2007). Ниже мы рассмотрим некоторые из этих процессов.

Регуляция клеточного цикла и деления клетки

Известно, что продвижение клеток эукариот по циклу регулируется последовательной активацией циклинзависимых киназ (CDK — Cyclin-Dependent Kinase) различными циклинами. Циклины синтезируются в строго определенные моменты клеточного цикла и, будучи крайне нестабильными, существуют и действуют в клетках лишь на определенных фазах цикла и в течение определенного периода времени. Например, циклины D и E активны в течение фазы G₁, циклины E и A — в течение фазы S. Последовательное появление и исчезновение пар циклин—CDK на разных стадиях клеточного цикла определяется кинетикой синтеза и разрушения циклинов. Поэтому основной молекулярный механизм регулирования клеточного цикла — периодический синтез и разрушение регуляторных белков в течение этого процесса (Johnson, Walker, 1999).

При использовании ингибиторов протеасом была показана остановка клеточного цикла в фазах G₁ (Kumeda et al., 1999; Rao et al., 1999), поздней S (Machiels et al., 1997) или G₂/M (Wojcik et al., 1996). Поэтому можно с полной уверенностью сказать, что убиквитин- и протеасомзависимый протеолиз является одним из ключевых механизмов, лежащих в основе регуляции клеточного цикла. Так, основным путем разрушения циклинов у млекопитающих является их деградация протеасомами. Более того, протеасомы вовлечены в процесс регулирования стабильности ингибиторов CDK (p27^{Kip1} и p21^{Cip1/WAF1}) и специфических фосфатаз семейства CDC25 (Cell Division

Cycle), активизирующих киназы CDK у млекопитающих (Naujokat, Hoffmann, 2002; Reed, 2006).

Убиквитин-протеасомная система осуществляет как негативную, так позитивную регуляцию клеточного цикла (Naujokat, Hoffmann, 2002). Известно, что такие негативные регуляторы прогрессии клеточного цикла, как p21^{Cip1/WAF1}, p27^{Kip1}, p19^{INK4d} и геминин, являются субстратами для протеасомной протеолитической машины (Naujokat, Hoffmann, 2002). Деградация этих белков протеасомами приводит к «снятию запрета» и продвижению по клеточному циклу. Вступление в S-фазу определяется позитивными регуляторами прогрессии клеточного цикла (циклины A, D и E, E2F1, Cdc6), которые тоже деградируются по протеасомзависимому пути (Naujokat, Hoffmann, 2002).

Протеолиз в течение клеточного цикла можно охарактеризовать в соответствии с участвующими в нем двумя семействами убиквитин-лигаз: APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome) и SCF (Skp1/Culin/F-box protein) (Reed, 2006). APC/C был первоначально описан как мультисубъединичный белковый комплекс (содержащий убиквитин-лигазу E3), который убиквитинирует ингибиторы анафазы для последующего разрушения их протеасомами при переходе от метафазы к анафазе (Clarke et al., 2005). Активация этого комплекса также происходит в течение митоза и G₁-фазы. В этом случае APC/C убиквитинирует белки, запрещающие митотическую прогрессию (Reed, 2006). Таким образом, APC/C участвует в убиквитинзависимой протеасомной деградации ингибиторов анафазы во время перехода от метафазы к анафазе и митотических циклинов при выходе из митоза (Абрамова и др., 2002). Причем белки-мишени для APC/C маркируются в конечном консервативном фрагменте, названном «destruction box» или «D box», после чего они становятся объектами для убиквитинирования (Eytan et al., 2006). У мутантов, утративших «destruction box», циклины не убиквитинируются и не деградируют, поэтому у них клеточный цикл останавливается в поздней анафазе (Deshais, 1995; King et al., 1996).

Убиквитин-лигаза SCF — также основной компонент регуляторной «машины» клеточного цикла. Важно отметить, что APC/C и SCF не функционируют в изоляции друг от друга, они приспособлены для полного координации событий клеточного цикла (Reed, 2006). SCF-лигаза убиквитинирует большое количество белков, вовлеченных в контроль над клеточным циклом (Jin et al., 2005), которые фосфорилируются в определенных последовательностях, известных как «phosphodegrons» (см. обзоры: Ang, Wade Harper, 2005; Reed, 2006). Поэтому маркирование этих белков для последующей деградации фосфорилированием обеспечивает участие сигнальных путей через активацию определенных киназ в контроле клеточного цикла (Reed, 2006).

Развитие и дифференцировка

Развитие и клеточная дифференцировка, как и другие клеточные процессы, управляются как на уровне генной экспрессии, так и на уровне деградации белка. Следовательно, эти процессы регулируются, по крайней мере частично, с помощью убиквитин-протеасомной системы. Недавние генетические исследования *Caenorhabditis elegans* продемонстрировали участие убиквитин-протеасомной системы в раннем развитии, где убиквитинзависимая де-

градация белков управляет такими разнообразными событиями, как проход через мейоз, регулирование цитоскелета и детерминация судьбы клетки (Bowerman, Kurz, 2006). Кроме того, ранние исследования, сделанные на насекомых (*Drosophila* и *Manduca sexta*), демонстрировали, что ранний эмбриогенез и метаморфоз зависят от внутриклеточной аккумуляции протеасом и протеасомной деградации определенных мишеных белков (Klein et al., 1990; Dawson et al., 1995; Jones et al., 1995; Low et al., 1997). Последующие исследования на других организмах (*Lytechinus pictus*, *Xenopus laevis*, мышь и крыса) показали, что регулируемая экспрессия 19S протеасомных субъединиц, так же как протеасомная деградация белков-регуляторов клеточного цикла, необходимы для иницирования раннего эмбрионального митоза и развития (Tokumoto et al., 1999; Kawahara et al., 2000a, 2000b; Josefsberg et al., 2001). Дальнейшие исследования на позвоночных животных показали, что сборка и протеолитическая активность 26S протеасом изменяются в течение мейоза (созревание ооцита) (Sawada et al., 1999; Tokumoto et al., 1999, 2000; Josefsberg et al., 2000; Reverte et al., 2001).

Функции протеасом в клеточной дифференцировке комплексны, и мы решили не останавливаться на этой теме подробно, поскольку доступны обзоры с более полной информацией относительно этого предмета (Naujokat, Hoffmann, 2002; Schwechheimer, Schwager, 2004; Bowerman, Kurz, 2006).

Регуляция транскрипции

Генная транскрипция и убиквитин-протеасомный протеолиз — два процесса, которые на первый взгляд не имеют ничего общего: транскрипция — один из самых сложных клеточных процессов и представляет собой первый шаг в жизни любого белка, протеолиз представляет заключительную главу в жизни белка. Однако, несмотря на такую видимую несовместимость этих двух процессов, убиквитин-протеасомная система, тем не менее, очень глубоко вовлечена в генный контроль. В последнее время появляется все больше исследований, посвященных участию в транскрипции убиквитин-протеасомной системы деградации белков (Tansey, 2001; Lipford, Deshaies, 2003; Muratani, Tansey, 2003; Dhananjayan et al., 2005; Kinyamu et al., 2005; Collins, Tansey, 2006).

Показана ассоциация протеасомных субъединиц с более чем 6000 генов дрожжей *S. cerevisiae*, в то время как несколько сотен генов взаимодействовали или с 20S протеасомами, или с 19S регуляторными частицами (Sikder et al., 2006). Причем во многих случаях наблюдалась взаимосвязь с уровнями генной экспрессии и присутствием РНК-полимеразы II. Эти данные позволяют предполагать независимое функционирование в транскрипции целой протеасомной частицы и протеасомных субчастиц. Действительно, эксперименты в области генетики и молекулярной биологии подтверждают, что интактные 26S протеасомы, так же как их субчастицы и субъединицы, вовлечены в регуляцию транскрипции (Tansey, 2001; Lipford, Deshaies, 2003; Muratani, Tansey, 2003; Dhananjayan et al., 2005; Kinyamu et al., 2005; Collins, Tansey, 2006). 26S протеасомы, их субчастицы и субъединицы принимают участие в контроле разных стадий транскрипционного процесса посредством как своей протеолитической, так и непротеолитических (шаперонной, АТФазной и, возможно, ДНК-геликазной) активностей. Эти частицы участву-

ют в протеолизе и активации транскрипционных факторов, кофакторов и РНК-полимеразы II, в реорганизации хроматина и регуляции инициации, элонгации и терминации транскрипции (Muratani, Tansey, 2003; Gillette et al., 2004; Nawaz, O'Malley, 2004; Collins, Tansey, 2006).

С одной стороны, функционирование убиквитин-протеасомной протеолитической системы необходимо для ограничения пределов транскрипции, обеспечения функционирования на хроматине разных факторов транскрипции и, возможно, для облегчения многократных раундов иницирования транскрипции. Протеасомы, как протеазы, в транскрипции вовлечены в своевременную регулирующую активацию факторов транскрипции через их процессинг или деградацию ингибиторных белков. Так, клеточная деятельность таких белков, как фактор транскрипции NF-κB у млекопитающих и SPT23 и MGA2 у дрожжей, находится под управлением убиквитин-протеасомной системы (Rape, Jentsch, 2004). Так, например, активация с помощью убиквитин-протеасомной системы NF-κB приводит в свою очередь к экспрессии ряда генов, необходимых для выживания и пролиферации клетки, а также для иммунного ответа (Herrmann et al., 2004). Этот транскрипционный фактор состоит из двух белков — p65 и p50, причем последний представлен в цитоплазме в виде неактивного предшественника — белка p105. После убиквитинирования С-концевого участка белка p105 происходит его протеолиз протеасомой, а N-концевой участок с мол. массой 50 кДа покидает протеасому в качестве стабильной и активной молекулы (вероятно, протеолиз продолжается до достижения сигнала терминации, после чего оставшаяся часть белка покидает протеасому). В цитозоле p50 связывается с p65 и ингибиторным белком IκB с образованием неактивного комплекса. После фосфорилирования IκB происходит его убиквитинирование, что приводит к деградации IκB протеасомой и активации NF-κB. Свободный транскрипционный фактор NF-κB поступает в ядро и активирует экспрессию генов, вовлеченных в воспалительный ответ (Karin, Ben-Neriah, 2000).

Протеасомы также необходимы для стабилизации РНК-полимеразы II на промоторах и повторного иницирования транскрипции, возможно через протеолиз транскрипционных активаторов. После генной активации протеасомные компоненты движутся вместе с РНК-полимеразой II и используют свою АТФ-зависимую шаперонную активность (Makino et al., 1999), специфическим образом формируя хроматин, что обеспечивает посадку Set1 и Dot1 на гистоны и(или) продвижение этих ферментов к гистоновым целевым лизиновым остаткам. Кроме того, было показано, что ингибирование протеолитической активности протеасом блокирует способность дрожжевого активатора Gcn4 привлекать к промоторам РНК-полимеразы II (Lipford et al., 2005).

Правильное завершение транскрипции также зависит от протеолиза по убиквитин-протеасомному пути. Так, было показано увеличение беспрепятственных проходов через сайты окончания транскрипции после ингибирования протеасом (Gillette et al., 2004).

Интересно, что каталитически активная субъединица 20S протеасомы LMP2 взаимодействует непосредственно с коактиваторами SRC (Steroid Receptor Coactivator) (Zhang et al., 2006). Авторы показали необходимость субъединицы LMP2 для ER (Estrogen Receptor)-опосредованной транскрипции и для стимулированной эстрогеном прогрессии клеточного цикла.

Протеолитическая деятельность протеасом требуется также для непрерывного гормонального ответа. Эта активность модулирует GHR (Glucocorticoid Hormone Receptor)-зависимую транскрипцию, регулируя взаимосвязь между рецепторами и транскрибируемой ДНК (Kinuyama, Archer, 2007).

Было показано участие протеолитической деятельности протеасом в связанной с транскрипцией репарации ДНК (Krogan et al., 2004; Reid, Svejstrup, 2004). Разрушение РНК-полимеразы II по убиквитин-протеасомному пути блокирует транскрипцию до тех пор, пока поврежденная ДНК не будет восстановлена.

Непротеолитическое функционирование протеасом важно в привлечении и протеолизе коактиваторов, контроле над транскрипционной пролонгацией, в модификации гистонов и хроматина (Ferdous et al., 2002).

Субъединицы 19S комплекса протеасом, особенно основные АТФазы, влияют на транскрипцию множества генов через непотеолитический механизм (Ferdous et al., 2001, 2002). Комплекс 19S является критическим для эффективной пролонгации РНК-полимеразы II *in vitro* и *in vivo*. Так, дрожжи, несущие мутантные гены *SUG1* (Rpt6) и *SUG2* (Rpt4), кодирующие АТФазы 19S протеасомного комплекса, проявляют дефекты в элонгации транскрипции. Кроме того, транскрипция *in vitro* ингибировалась иммуноистощением субъединицы Sug1, и восстановление элонгации достигалось добавлением иммуноочищенных комплексов 19S. Причем, с помощью коиммунопреципитации показали физическое взаимодействие фактора элонгации Cdc 68 с субъединицей протеасом 19S. Важно отметить, что ингибирование протеолитической активности протеасом не оказывало влияния на элонгацию транскрипции (Ferdous et al., 2001).

Вовлечение протеасом в диссоциацию комплексов элонгации было показано обогащением связанной РНК-полимеразы II на генах RP (Ribosomal Protein) в дрожжах, мутантных по протеасомам (Auld et al., 2006).

Субъединицы 19S комплекса проявляют ДНК-геликазную и шаперонную активности. Так, АТФазная субъединица SUG1 является и 3'-5'-ДНК-геликазой, активность которой зависит от интактного АТФ-связывающего домена (Fraser et al., 1997). Поэтому 19S субкомплекс может влиять на взаимодействия между компонентами транскрипционной машины с ДНК через ДНК-геликазную активность. Коллинсом и Тансеем была также предложена гипотеза о том, что субъединицы 19S комплекса могли бы влиять на элонгацию транскрипции и другие стадии транскрипционного процесса через их белок-шаперонную активность, оказывая влияние на сворачивание/разворачивание белка (Collins, Tansey, 2006).

Белки комплекса 19S могут влиять на ранние этапы транскрипционного процесса: на стадии преиницирования соактиватор (комплекс SAGA — Spt-Ada-Gcn5 Acetyltransferase, содержащий 15 субъединиц, в числе которых гистон-ацетилтрансфераза) взаимодействует с нужным промотором во время активации некоторых генов. Авторы (Lee et al., 2005) полагают, что 19S регуляторная частица протеасом, возможно благодаря своей шаперонной активности, тем или иным способом изменяет конформацию SAGA, стимулируя его взаимодействие с транскрипционным активатором. Таким образом, было показано, что АТФазные компоненты 19S субчастицы способствуют привлечению SAGA на промоторы через транскрипционные активаторы, такие как Gal4p (Lee et al., 2005).

Другими авторами была обнаружена еще одна непотеолитическая деятельность протеасомных АТФаз в регуляции транскрипции — дестабилизация комплексов промотор/активатор АТФ-зависимым способом (Ferdous et al., 2007). Причем интересно отметить, что активаторы защищены от этой потенциально репрессивной активности протеасом моноубиквитинированием.

У дрожжей протеасомные 19S субчастицы физически ассоциированы со многими основными факторами транскрипции, включая компоненты FACT (Cdc68/Pob3), TFIID, TFIIN и холофермент РНК-полимеразы II (Sun et al., 2002). Кроме того, 26S протеасомы взаимодействуют с транскрипционно активными генами на участках повреждения ДНК и с 3'-концами индуцибельных генов GAL1, GAL10, и HSP82 (Gillette et al., 2004). Эти результаты демонстрируют, что субъединицы протеасом могут взаимодействовать как с компонентами транскрипционной машины, так и с областями генов.

Субъединицы 19S регулятора также влияют и на структуру хроматина. Так, например, у дрожжей АТФазные субъединицы 26S протеасом Rpt4 и Rpt6 необходимы для метилирования гистона H3 по Lys4 и Lys79 в активных генах, что является эпигенетическим маркированием, которое отличает транскрибируемый хроматин от нетранскрибируемого и работает как «краткосрочная память» о недавней транскрипции сигналом, характеризующим активные сайты транскрипции (Ezhkova, Tansey, 2004). Мутации же в субъединицах Rpt4 и Rpt6 предотвращают метилирование гистона H3 по лизиновым остаткам, но не нарушают убиквитинирование гистона H2B. Кроме того, мутации Rpt4 и Rpt6 протеасомных субъединиц (но не компонентов 20S протеасомы) нарушают сайленсинг (выключение) генов вблизи теломер (Ezhkova, Tansey, 2004). Важно отметить, что метилирование гистона H3 по лизиновым остаткам зависит от убиквитинирования гистона H2B (Lys123) (Briggs et al., 2002; Sun, Allis, 2002). Коллеги Коллинс и Тансей выдвинули предположение о том, что 19S регуляторы, оказывая влияние на локальную структуру хроматина, способствуют привлечению соответствующих метилтрансфераз к мишенным сайтам на молекулах гистона (Collins, Tansey, 2006). Интересно, что связывание субъединиц 19S комплекса с сайтами активной транскрипции зависит от убиквитинирования гистона H2B (Ezhkova, Tansey, 2004). Вопрос о том, взаимодействуют 19S субъединицы с ДНК (благодаря геликазной активности), или с гистонами (благодаря шаперонной активности), или с ДНК и гистонами, так же как время их появления в генных областях, еще окончательно не изучен. Так, методом иммунопреципитации хроматина были получены противоречивые результаты: 19S субъединицы были найдены на промоторных последовательностях как уже активных генов (Gonzalez et al., 2002), так и до активации (Ezhkova, Tansey, 2004). Важно отметить, что субъединицы 20S коровой частицы протеасом выявлено не было.

Кроме того, протеасомы вовлечены также и в реорганизацию структуры хроматина. Так, например, ингибирование протеасом во время индуцированной глюкокортикоидом транскрипции вызывает увеличение уровня триметил гистона H3K4 и накопления данной модификации на соответствующих промоторах, находящихся под контролем глюкокортикоидных рецепторов (Kinuyama, Archer, 2007). Вероятно, что кроме протеолитической активности протеасом в модернизацию структуры хроматина вовлечено и непотеолитическое функционирование данных частиц. Ассоциация протеасом с хроматином и процес-

синг транскрипционного фактора также, возможно, взаимосвязаны. Так, фактор транскрипции Gcn4 деградируется только тогда, когда прикрепляется к мишенному промотору (Lipford et al., 2003).

В заключение хочется отметить, что регулирование транскрипции протеасомами — процесс крайне сложный и комплексный, поскольку эти частицы вовлечены во множественные стадии процесса, кроме того, даже на одной и той же стадии они действуют через различные механизмы. Согласно последним литературным данным, можно предполагать, что протеасомы и их субчастицы могут быть вовлечены в различные транскрипционные стадии различных генов независимо (Deshaies, 2003; Dhananjayan et al., 2005; Kinyamu et al., 2005; Lee et al., 2005; Lipford; Collins, Tansey, 2006). И несмотря на тот факт, что основные данные по этой теме были получены для дрожжевых клеток, свидетельства процитированных выше работ на клетках высших эукариот и степень гомологии между факторами транскрипции высших эукариот и дрожжей позволяют допустить существование подобных механизмов в регуляции транскрипции в организмах высших эукариот.

Репарация ДНК

Репарация нарушенной под действием агентов ДНК, как, впрочем, и регуляция этого процесса, крайне важны для выживания клетки. Большое множество экзо- и эндогенных агентов может нанести ущерб структуре ДНК, что отражается на функционировании таких ключевых клеточных процессах, как транскрипция, репликация и прогрессия клеточного цикла. Нарушение этих процессов может привести к клеточной гибели. Кроме того, неисправленная или неправильно восстановленная ДНК может содержать мутации, которые могут привести к клеточному старению, генетическим дефектам и(или) канцерогенезу. Наибольшее число повреждений ДНК устраняется с помощью эксцизионной репарации нуклеотида (NER — Nucleotide Excision Repair). И если репарация NER, как биохимический процесс, достаточно широко охарактеризована, то ее регуляция, напротив, понятна не так хорошо. Регулирование репарации NER, как и других клеточных процессов, может осуществляться на уровне транскрипции, трансляции, деградации белка или посттрансляционными модификациями. Все больше литературных данных говорят об участии убиквитин-протеасомной системы во многих клеточных процессах. Получены данные о взаимодействиях между белками, вовлеченными в NER, и убиквитинзависимой системой деградации белка для дрожжей и млекопитающих (Russell et al., 1999; Gillette et al., 2001; Lommel et al., 2002; Sweder, Madura, 2002; Dupre et al., 2004; Krogan et al., 2004; Reed, Gillette, 2007). Так, показано, что протеасомы взаимодействуют с некоторыми белками-участниками эксцизионной репарации основания NER, такими как XPB (Xeroderma Pigmentosum B protein), Rad4 и Rad23 (Gillette et al., 2006). Продемонстрировано также, что у дрожжей репарационный белок Rad4 и его человеческий гомолог XPC могут быть помечены для деградации 26S протеасомой совместно с негативной ролью убиквитинзависимого протеолиза в NER. Важно подчеркнуть, что убиквитин-протеасомная система регулирует NER через два различных механизма. Первый из них идет независимо от начала белкового синтеза и нуждается в Rad23 и непротеолитическом функциони-

ровании 19S регулятора 26S протеасомы. Причем взаимодействие непосредственно 26S протеасомы с белком Rad23 осуществлялось через его домен Ubl (Schauber et al., 1998). Второму механизму нужно начало синтеза белка в клетке, и он оперирует недавно идентифицированной E3 убиквитин-лигазой.

Кроме того, интактные 26S протеасомы или их составные части могут иметь дополнительное функционирование в NER, возможно в качестве молекулярных шаперонов, которые обеспечивают надлежащее сворачивание репарационных белков или избежание белковой агрегации (Шарова, 2005). В этом случае речь идет о стимулировании репарации протеасомами.

Иммунный ответ

Убиквитин-протеасомная система осуществляет протеолиз как синтезирующихся в клетке аномальных, так и чужеродных белков (Kloetzel, 2004). В результате гидролиза образуются полипептиды длиной от 5 до 24 аминокислот, часть которых может являться антигенными эпитопами. Полипептиды длиной от 8 до 11 аминокислот соединяются в цитозоле с белками-транспортёрами TAP (Transporter Associated with Antigen Presentation) и переносятся на ЭР, где они связываются с молекулами MHC I и выносятся на поверхность клетки. Иммунная система, таким образом, при помощи цитотоксических Т-лимфоцитов может обнаруживать и разрушать клетки, которые экспрессируют вирусные или другие необычные полипептиды, а убиквитин-протеасомная система, таким образом, играет центральную роль в клеточном иммунном ответе (Rock et al., 1994; Rivett, 1998; Gao, Luo, 2006; Wang, Maldonado, 2006).

γ -IFN управляет протеолитическими свойствами протеасом, приспосабливая их к требованиям иммунной системы. Стимуляция клеток цитокинами γ -IFN или TNF- α индуцирует синтез трех субъединиц протеасом LMP2 (β 1i), LMP7 (β 5i) и MECL-1 (β 2i), которые заменяют три каталитические субъединицы — Y(β 1), X(β 5) и Z(β 2) (Fruh et al., 1994; Groettrup et al., 2001a). Кроме того, γ -IFN вызывает синтез протеасомного активатора PA28 и формирование иммунопротеасомы, что адаптирует протеолитические свойства протеасом для представления антигена. Комбинация нескольких регулирующих событий настраивает убиквитин-протеасомную систему для максимально эффективной генерации антигенов для представления на молекулах MHC I (Kloetzel, 2004). Так, несмотря на тот факт, что возможно представление на молекулах MHC I антигенов, полученных конститутивными протеасомами, недавно было показано, что субъединицы LMP2 и LMP7 играют центральную роль в генерации или разрушении некоторых уникальных эпитопов (Groettrup et al., 2001a). Замена конститутивных субъединиц иммунными нужна не только для оптимизации представления антигенов, но также для генерации LMP2/LMP7/MECL-1-зависимых эпитопов в местах воспаления, которые не производятся в спокойных тканях. Это различие в генерации антигенных детерминант может служить для того, чтобы лучше стимулировать Т-клетки в местах продолжающегося иммунного ответа и чтобы избежать аутоиммунности в спокойных тканях (Groettrup et al., 2001b).

Интересно заметить, что взаимодействие на молекулярном уровне между белком созревания протеасом

(POMP) и протеасомной субъединицей LMP7 также имеет ключевое значение для иммунной адаптивной программы. γ IFN-индуцированный биосинтез POMP и LMP7 и их взаимодействие ускоряют биогенезис иммунопротеасомы по сравнению со сборкой конститутивной 20S протеасомы. Динамика этого процесса определена быстрой активацией LMP7 и непосредственной LMP7-зависимой деградацией POMP. Блокирование экспрессии POMP приводит к снижению набора субъединицы $\beta 5i$, так же как и $\beta 5$, во время сборки протеасомного комплекса, что приводит к уменьшению протеасомной активности и уменьшению поверхностной экспрессии молекул MHC I (Heink et al., 2005).

Две индуцибельные β -субъединицы протеасом — LMP2 и LMP7 — кодируются в локусе MHC, что тоже свидетельствует об участии протеасом в иммунном ответе. Кроме того, экспрессия иммуносубъединиц тканеспецифична и находится в клетке под строгим регуляторным контролем (Kloetzel, 2004; Gomes et al., 2006). Так, например, в лимфоидных органах (селезенка, тимус и лимфатические узлы) субъединицы LMP2 и LMP7 экспрессируются постоянно (Rock et al., 1994; Rivett, 1998).

Весьма существенно, что иммунопротеасомы несут дополнительную функциональную нагрузку в антиген-представляющих клетках APC (Antigen-Presenting Cell) иммунной системы, включая В-лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки. Клетки APC поглощают антигены, входящие в лимфоидные органы с кровью и лимфотоканами, путем эндоцитоза. Иммунопротеасомы преобразуют антигены в антигенные эпитопы, которые выносятся на поверхность клетки в комплексе с молекулами MHC I (Rock, Goldberg, 1999).

Протеасомы косвенно вовлечены также в развитие как гуморальных клеток, так и клеток иммунного ответа, связанных с цитотоксической деятельностью макрофагов и Т-киллеров (см.: Шарова, 2006). Более того, протеасомы, как оказалось, процессируют антигены в антигенные олигопептиды для их представления в комплексе с молекулами MHC II Т-хелперами (Tewari et al., 2005).

Подводя итог вышесказанному, можно сказать, что протеасомы инициируют процесс разрушения дефектных клеток и вовлечены в активацию Т-киллеров и, таким образом, участвуют в формировании Т-клеточного иммунного ответа. Кроме того, протеасомы вовлечены в активацию Т-хелперов и поэтому играют опосредованную роль как в гуморальном (функционирование В-лимфоцитов), так и в клеточном (функционирование Т-киллеров и макрофагов) иммунитете.

Апоптоз

Апоптоз, или запрограммированная клеточная гибель, — один из основных защитных процессов, который обеспечивает контроль над количеством клеток и постоянством состава тканей в организме. Таким образом, разрушаются опасные для организма клетки, в том числе зараженные вирусами, раковые. Апоптоз регулируется двумя протеолитическими системами — семейством каспаз и протеасомами. С каждым годом увеличивается количество исследований, посвященных участию в апоптозе убиквитин-протеасомной системы деградации белков (Grimm et al., 1996; Beyette et al., 1998; Drexler, 1998; Hirsch et al., 1998; Wojcik, 1999, 2002; Breitschopf et al., 2000; Dallaporta et al., 2000; Kiyomiya et al., 2002; Naujokat, Hoffmann,

2002; Adams, 2003; Ciechanover, Schwartz, 2004; Groll, Huber, 2004; Rajkumar et al., 2005; Nandi et al., 2006; Sohn et al., 2006a, 2006b; Yang et al., 2006). Так, показано, что убиквитинзависимому протеолизу подвергаются многие белки, которые участвуют в регуляции апоптоза. К ним относятся транскрипционные факторы (c-Fos, c-Myc, NF- κ B, AP-1), опухолевый супрессор p53, ингибитор ядерного фактора транскрипции NF- κ B белок I κ B α , белки, контролирующие клеточный цикл (p27^{Kip1} и p21^{Cip1/WAF1}), белки семейства Bcl-2, регулирующие выход цитохрома *c* из митохондрий, белки, контролирующие активность каспаз (IAPs) и участвующие в проведении проапоптотического сигнала (cFLIP) (Wojcik, 2002). Регуляция деградации и(или) процессинга этих белков протеасомами, возможно, помогает детерминировать восприимчивость клетки к апоптотическому сигналу и к сигналу выживания. Интересен тот факт, что, в то время как специфические белки-регуляторы апоптоза деградируются протеасомами, с другой стороны, некоторые компоненты протеасомной системы в свою очередь деградируются каспазами (Adrain et al., 2004).

Взаимосвязь между программируемой клеточной гибелью и избирательной деградацией белков по убиквитин-протеасомному пути изучают при помощи различных протеасомных ингибиторов. Тот факт, что ингибиторы протеасом вызывают апоптоз, не удивил, так как регулируемый протеолиз по убиквитин-протеасомному пути играет важнейшую роль в различных клеточных процессах. Однако функция протеасом в апоптозе, по всей видимости, очень комплексная. Так, ингибиторы протеасом вызывали апоптоз в одних типах клеток, в то время как на другие клетки они не оказывали видимого воздействия или даже предотвращали апоптоз, вызванный другими агентами (An et al., 1998; Wojcik, 2002). Такие противоположные роли протеасом в апоптозе связывают прежде всего с типами клеток и/или их пролиферативным статусом, поскольку ингибиторы протеасом индуцировали апоптоз в быстро пролиферирующих клетках, а именно в клетках злокачественных опухолей и в эмбриональных клетках (Drexler, 1998; Naujokat, Hoffmann, 2002; Wojcik, 2002). Оказалось также, что такие клетки демонстрируют повышенный уровень экспрессии протеасомных субъединиц (Klein et al., 1990; Kumatori et al., 1990; Kanayama et al., 1991; Shimbara et al., 1992; Ichihara et al., 1993). И было высказано предположение о том, что протеасомы, препятствуя входу в апоптоз, играют существенную роль в выживании и пролиферации только быстро растущих и неопластических клеток (Naujokat, Hoffmann, 2002). При воздействии же ингибиторов протеасом, вероятно, не происходит деградации и(или) процессинга специфических регуляторных белков, которые вызывают запрограммируемую клеточную гибель или вследствие своей активности нарушают равновесие между проапоптотическими и антиапоптотическими сигналами в клетке. Однако последние литературные данные указывают на тот факт, 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: выживание клетки или апоптоз (Sohn et al., 2006a, 2006b; Yang et al., 2006).

Впервые антиапоптотическое функционирование протеасом было показано в 1995 г., когда Имажо-Оми и его коллеги показали, что ингибитор протеасом лактаци-

стин вызывает апоптоз в клетках лейкемии человека линии U937 (Imajoh-Ohmi et al., 1995). В последующих работах, посвященных исследованию программированной клеточной гибели, индуцированной с помощью ингибирования протеасомной активности, были использованы различные специфические ингибиторы протеасом и разнообразные клетки и клеточные линии: неопластические и быстро пролиферирующие (Shinohara et al., 1996; Drexler, 1997; Tanimoto et al., 1997; Naujokat et al., 2000), нейронные (Lopes et al., 1997; Kitagawa et al., 1999; Qiu et al., 2000), мезенхимные (Lopes et al., 1997; Drexler et al., 2000) и эпителиальные (Herrmann et al., 1998; Adams et al., 1999).

Как оказалось, ингибиторы протеасом являются мощными индукторами апоптоза, поскольку они вызывали апоптоз в клетках, устойчивых к другим индуцирующим агентам. Так, например, различные протеасомные ингибиторы, включая лактоцистин и MG132, вызывали апоптоз в В-клетках человека у пациентов с хронической лимфоцитарной лейкемией на протяжении всех стадий болезни, включая и устойчивые к обычной химиотерапии (Almond et al., 2001).

Рассмотрим некоторые примеры проапоптотического действия ингибиторов протеасом на клетки.

Один из антиапоптотических белков-регуляторов, уровень которых в клетке регулируется протеасомами, — фактор транскрипции NF-κB. Воздействие ингибиторов протеасом снижает активность белка NF-κB через стабилизацию его ингибиторного белка IκBα, и в конечном итоге вызывает апоптоз во многих трансформированных клетках (Naujokat, Hoffmann, 2002; Wojcik, 2002). Рассмотрим немного подробнее, каким образом это происходит. В цитоплазме транскрипционный фактор NF-κB неактивен, находясь в комплексе с ингибиторным белком IκBα. В ответ на некий клеточный стресс (например, химиотерапия, радиационное повреждение, действие цитотоксических агентов, вирусов или окислителей) IκBα фосфорилируется, убиквитинируется и деградируется протеасомами. Активированный таким образом фактор транскрипции NF-κB транспортируется из цитоплазмы в ядро, где запускает транскрипцию антиапоптотических белков (A1/Bfl1, IAP и bcl-2), факторов роста (интерлейкины) и молекул клеточной адгезии, предотвращая апоптоз в клетках. Таким образом, ингибиторы протеасом не допускают активации белка NF-κB в клетках, и раковые клетки, например, становятся более чувствительными к химиотерапии и другим повреждающим агентам (Traenkle et al., 1994).

При связывании фактора некроза опухолей TNFα со своим рецептором происходит активация NF-κB и, следовательно, индукция антиапоптотического сигнала. Однако TNFα может вызывать в клетке и проапоптотический сигнал через рекрутирование каспазы 8. Антиапоптотический сигнал часто компенсирует проапоптотический сигнал, и клетки избегают гибели. Тем не менее ингибиторы протеасом предотвращают активацию NF-κB, что, собственно, элиминирует такую компенсацию и приводит к апоптозу (Fujita et al., 1996; Wang et al., 1996; Delic et al., 1998; Franco et al., 2001; Fujihara et al., 2002). Таким образом, считается, что протеасомы производят антиапоптотические сигналы и сигналы выживания в неопластических клетках, деградируя такие проапоптотические белки, как Bax и Bid (Chang et al., 1998; Breitschopf et al., 2000b; Li, Dou, 2000).

Другой механизм проапоптотического действия ингибиторов протеасом заключается в блокировании клеточ-

ного цикла (Wojcik et al., 1996; Machiels et al., 1997), которое регулируется протеасомным протеолизом циклинов, белков семейства CDC25 или ингибиторов CDK (Hershko, 1997). В то время как в некоторых случаях блокировка клеточного цикла может фактически препятствовать входу клеток в апоптоз, в других случаях блокировка клеточного цикла сосуществует или предшествует индукции апоптоза (Naujokat, Hoffmann, 2002; Shah et al., 2001a, 2001b).

Другой мишенью для ингибиторов протеасом является белок p53, ответственный за индукцию апоптоза (Burns, El Deiry, 1999). Белок p53 действует как транскрипционный регулятор, вызывающий экспрессию нескольких ключевых генов (Burns, El-Deiry, 1999; Wang, 1999; Shen, White, 2001). В ответ на клеточный стресс (повреждения ДНК, активация онкогенов, гипоксия) p53 вызывает либо остановку клеточного цикла в G₁- или G₂-, а иногда в S-фазе (увеличивает экспрессию белка p21^{Cip1/WAF1}), либо индукцию апоптоза (на транскрипционном уровне активирует ген *bax* и репрессирует ген *bcl-2*).

В отсутствие стресса уровень белка p53 в клетках обычно очень низок, так как p53 постоянно убиквитинируется лигазой Mdm2 (RING-finger-зависимая убиквитинирующая протеин-лигаза) и затем деградируется протеасомой (Fang et al., 2000). При повреждении клетки уровень p53 быстро повышается за счет остановки деградации, вероятно в результате убиквитинзависимого протеолиза лигазы Mdm2. Однако быстрому накоплению p53 способствует также расщепление лигазы Mdm2 каспазой 3 (Cho et al., 2001). Ингибирование протеасом вызывает накопление p53 в клетке, что может вызывать индукцию апоптоза в пролиферирующих клетках (MacLaren et al., 2001).

Ингибиторы протеасом могут также вызывать накопление онкобелка с-Мус. Транскрипционный фактор с-Мус контролирует клеточный цикл, пролиферацию и апоптоз. с-Мус транскрибирует ген Cdc25a-фосфатазы, снимающей ингибиторное фосфорилирование циклинзависимых киназ Cdk2 и Cdk4, и понижает экспрессию ингибитора p27^{KIP1} (Amati et al., 1998; Sexl et al., 1999). Нерегулируемая экспрессия с-Мус связана со многими раковыми заболеваниями, в том числе и с лимфомой Буркита (Gregory, Hann, 2000). Белок с-Мус в норме очень быстро разрушается посредством убиквитин-протеасомного пути (Salghetti et al., 1999). Конститутивная или при помощи ингибиторов протеасом активация с-Мус приводит к стимуляции нерегулируемой пролиферации, что служит сигналом для индукции p53-зависимого апоптоза в клетках (Wojcik, 2002). Например, в человеческих клетках глиомы ингибиторы протеасом вызывали повышение уровня белка с-Мус, которое вызывает кратковременное считывание с гена *FasL*, а экспрессия белка *FasL* в свою очередь стимулирует *Fas*-опосредованный апоптотический путь (Tani et al., 2001).

Наконец, одним из эффектов действия ингибиторов протеасом может быть регулирование уровня специфических молекул вторичных мессенджеров (например, цАМФ или окиси азота), которое в свою очередь может вызывать апоптоз. Так, например, в человеческих нейтрофилах убиквитин-протеасомная система деградации белка регулирует баланс проапоптотических и антиапоптотических белков, который играет ключевую роль в способности цАМФ задерживать смерть нейтрофила (Lee et al., 2001; Martin et al., 2001).

В то время как ингибиторы протеасом вызывают апоптотическую гибель быстро пролиферирующих кле-

ток, таких как раковые, ряд нормальных типов клеток (дифференцированные и покоящиеся) способны избегать апоптоза при подавлении функций протеасом (Pleban et al., 2001). Известны по крайней мере две системы, где ингибиторы протеасом предотвращают запрограммированную клеточную гибель: при апоптозе тимоцитов, вызванном воздействием ионизирующего излучения, глюкокортикоидов или форболового эфира (Grimm et al., 1996), и в случае апоптоза нейронов (Sadoul et al., 1996; Canu et al., 2000). Крысиные симпатические нейроны (Sadoul et al., 1996) и крысиные мозжечковые нейроны (Canu et al., 2000), индуцированные к апоптозу лишением фактора роста нервов и калия соответственно, были «спасены» от запрограммированной смерти при добавлении ингибиторов протеасом сразу после апоптотической инициации.

Кроме того, ингибиторы протеасом могут иметь опозиционное действие, т. е. в одних и тех же клетках они могут или стимулировать, или предотвращать апоптоз (Wojcik et al., 2002; Sohn et al., 2006a, 2006b; Yang et al., 2006). Так, например, подавление функций протеасом в клетках рака легких оберегает эти клетки от проапоптотического действия ингибиторов топоизомераз, в то время как воздействие ингибиторов протеасом после обработки этих клеток топоизомеразными ингибиторами имеет проапоптотический эффект (Tabata et al., 2001). Ингибитор протеасом PSI позволяет избегать апоптоза в гибридоме Т-клеток (Tanimoto, Kizaki, 2002).

Апоптоз, вызванный глюкокортикоидами, отличается по многим аспектам от апоптоза, вызванного другими стимулами, включая участие протеасом (Dallaporta et al., 2000; Distelhorst, 2002). Протеасомы, как известно, регулируют клеточный ответ на глюкокортикоиды, так как глюкокортикоидный рецептор становится гиперфосфорилированным, затем он убиквитинируется и деградируется протеасомами. Протеасомы же вовлечены в индуцированный глюкокортикоидами апоптоз на раннем этапе, предшествующем митохондриальным изменениям и активации каспаз (Hirsch et al., 1998; Wallace, Cidlowski, 2001).

Предобработка клеток MG132 или лактоцистином эффективно блокирует связывание глюкокортикоидного рецептора дексаметазоном (Wojcik et al., 2002). Ингибиторы протеасом также усиливают транскрипционную деятельность эндогенного человеческого глюкокортикоидного рецептора в клетках HeLa (Wallace, Cidlowski, 2001). Кроме того, ингибитор MG132 предотвращал индуцированный рецептором апоптоз двух клеточных линий HeLa (D98 и H21) (Sohn et al., 2006a).

Один возможный механизм проапоптотического действия протеасом был описан у первичных тимоцитов мыши при исследовании белков XIAP (**X**-linked Inhibitor of **A**Poptosis) и с-IAP1 (cellular Inhibitor of **A**Poptosis), членов семейства ингибиторов апоптотических белков IAPs (Inhibitors of **A**Poptosis) (Duckett et al., 1996). Эти ингибиторные белки функционируют в клетке антиапоптотически частично за счет ингибирования активации и(или) ферментативной активности каспаз (Deveraux et al., 1997, 1998) и за счет участия в мечении убиквитинированием каспазы 3 для последующей деградации протеасомами (Suzuki et al., 2001). В ответ на различные апоптотические стимулы эти ингибиторные белки автоубиквитинируются и затем расщепляются протеасомами (Yang et al., 2000). Причем деградация белков XIAP и с-IAP1 протеасомами зависит от их RING-домена (Joazeiro, Weissman,

2000), поскольку клетки, экспрессирующие белки XIAP и с-IAP1 с мутантными RING-доменами, имеют проблемы с протеасомным протеолизом этих ингибиторных белков и, следовательно, не в состоянии уйти в апоптоз, вызванный несколькими стимулами (Yang et al., 2000). Как оказалось, С-концевой RING-домен обеспечивает деградацию каспаз (Yang et al., 2003) благодаря своей убиквитин-лигазной активности (Joazeiro, Weissman, 2000).

Еще один возможный механизм проапоптотического действия протеасом был показан на эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVECs), индуцированных к апоптозу с помощью TNF- α (Naujokat, Hoffmann, 2002). Сразу после обработки этих клеток TNF- α наблюдалось уменьшение антиапоптотического белка Bcl-2 за счет протеасомной деградации (Dimmeler et al., 1999; Breitschopf et al., 2000a). Однако предобработка этих клеток специфическим ингибитором протеасом блокировала как TNF- α -вызванную деградацию Bcl-2, так и вообще индукцию апоптоза (Dimmeler et al., 1999; Breitschopf et al., 2000a).

В заключение хочется добавить, что трудно выделить единственную и четко определенную роль убиквитин-протеасомной системы в апоптозе. Литературные данные, собранные в этой главе, показывают, что ингибиторы протеасом в некоторых системах вызывают апоптоз или делают их чувствительными к апоптозу, вызванному другими агентами, в то время как в других системах они этого не делают. Кроме того, в различных случаях они предотвращают апоптоз, вызванный другими агентами. К счастью, быстро пролиферирующие клетки с неправильными фенотипами, т. е. раковые клетки, являются самыми чувствительными к проапоптотическому действию ингибиторов протеасом, в то время как нормальные клетки нечувствительны или менее чувствительны, даже когда они формируют высокопролиферирующие популяции, такие как клетки костного мозга или эпителия. Это делает ингибиторы протеасом очень многообещающими агентами в терапии рака, и они уже используются в клинических испытаниях (Adams et al., 1999; Adams, 2001; Sohn et al., 2006a; Vink et al., 2006). Ингибиторы протеасом также имеют потенциал использования как иммунодепрессанты лекарства, что, возможно, будет крайне полезно в получении трансплантируемых органов (Luo et al., 2001).

В настоящая время трудно установить, что является точными причинами, почему некоторые клетки чувствительны к ингибированию протеасом, а некоторые нет. Общее объяснение можно дать, если вместо того чтобы говорить об «апоптозе» вообще, мы будем также рассматривать много «апоптозов», т. е. апоптоз в контексте специфического типа клетки и специфических проапоптотических стимулов. Поскольку в то время как морфологические изменения при апоптозе подобны, а фаза выполнения апоптоза вообще стандартна, есть различные и несоизмеримые пути индукции апоптоза. Регулируемая деградация белка протеасомами, очевидно, играет различные и четко определенные роли на разных путях, ведущих к индукции апоптоза. Кроме того, необходимо знать и понимать, что происходит с самими протеасомами (а именно со структурой и активностями и, следовательно, с функциями) при индукции и выполнении апоптоза. Так или иначе, необходимо и далее исследовать эту захватывающую область, где два самых важных протеолитических пути в клетке — протеасомы и каспазы — встречаются в борьбе за жизнь и смерть клетки и часто всего организма в целом.

Заключение

В последнее время появляется все больше исследований, посвященных участию убиквитин-протеасомной системы деградации белков во всех клеточных процессах. Кроме того, помимо регуляции этих процессов на уровне участия протеасом также немаловажным является и высокоспецифическое регулирование самих исследуемых комплексов. Однако клеточные пути этого регулирования (ферменты, ответственные за субъединичные модификации, пути контроля их деятельности, механизмы регулирования экспрессии субъединиц, клеточной локализации и др.) остаются главным образом неисследованными.

Кроме того, несмотря на значительное продвижение в исследовании протеасом, осталось еще и множество нераскрытых вопросов, среди которых проблема специфичности вовлечения протеасом в транскрипцию, регуляцию клеточного цикла, иммунный ответ и апоптоз, т. е. есть ли специфика во влиянии определенных субпопуляций протеасом на регуляцию данных процессов. Кроме того, в настоящее время нет никакой информации о роли эндорибонуклеазной активности протеасом в клетке.

Автор выражает глубокую благодарность **И. М. Константиновой** за неоценимую помощь в подготовке статьи.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (№ 08-04-00834), фонда президента РФ по поддержке молодых российских ученых (МК-779.2008.4) и ведущих научных школ (НШ-774.2008.4) и в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (ГК № 02.740.11.0094 и П1389).

Список литературы

- Абрамова Е. Б., Шарова Н. П., Карпов В. Л. 2002. Протеасома: разрушать, чтобы жить. Молекуляр. биол. 36 (5) : 761—776.
- Галкин В. Э., Туроверова Л. В., Константинова И. М., Пинаев Г. П. 1998а. Взаимодействие протом с фибриллярным актином. Цитология. 40 (2—3) : 161—166.
- Галкин В. Э., Туроверова Л. В., Константинова И. М., Пинаев Г. П. 1998б. 26S-рибонуклеопротеиновый комплекс (26S-протеасома) непосредственно взаимодействует с фибриллярным актином. Цитология. 40 (7) : 618—626.
- Евтеева И. Н., Куличкова В. А., Миттенберг А. Г., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Тесленко Л. В., Обухова А. Д., Пенный В. А., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2000. Новая эндорибонуклеазная активность 26S-протеасом из клеток линии A431. Цитология. 42 (7) : 675—680.
- Евтеева И. Н., Куличкова В. А., Обухова А. Д., Миттенберг А. Г., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Токтарова М. В., Тесленко Л. В., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2003. Регуляция эндорибонуклеазной активности 26S-протеасом эпидермальным фактором роста в клетках линии A431: возможное участие протеасом в контроле над стабильностью РНК. Цитология. 45 (5) : 488—492.
- Миттенберг А. Г., Куличкова В. А., Медведева Н. Д., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Константинова И. М. 2002. Характеристики эндорибонуклеазной активности протеасом из клеток линии K562. II. Анализ нуклеолиза специфических мРНК протеасомами. Цитология. 44 (4) : 357—363.
- Миттенберг А. Г., Моисеева Т. Н., Пугачева И. В., Куличкова В. А., Цимоха А. С., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2007. Регуляция специфичности эндорибонуклеазной активности протеасом при действии индукторов дифференцировки и апоптоза на клетки линии K562. Цитология. 49 (2) : 142—148.
- Токтарова М. В., Куличкова В. А., Миттенберг А. Г., Кожухарова И. В., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Пешехонов А. В., Игнатова Т. Н., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2004. Дифференциальная регуляция эндорибонуклеазной активности 26S-протеасом и α -РНП-частиц при действии индукторов апоптоза на клетки линии K562: участие α -РНП-частиц и протеасом в контроле над стабильностью РНК при программной клеточной гибели. Цитология. 46 (3) : 283—290.
- Цимоха А. С., Миттенберг А. Г., Евтеева И. Н., Куличкова В. А., Кожухарова И. В., Ермолаева Ю. Б., Константинова И. М. 2007б. Перепрограммирование ядерных протеасом при индукции апоптоза в клетках K562. II. Воздействие противоопухолевого препарата доксорубинина. Цитология. 49 (6) : 451—459.
- Цимоха А. С., Миттенберг А. Г., Куличкова В. А., Ващукова Е. С., Ватажок Ю. Я., Моисеева Т. Н., Евтеева И. Н., Ермолаева Ю. Б., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2007а. Перепрограммирование ядерных протеасом при индукции апоптоза в клетках K562. I. Воздействие глутатионистощающего агента диэтилмалеата. Цитология. 49 (7) : 552—560.
- Цимоха А. С., Миттенберг А. Г., Куличкова В. А., Евтеева И. Н., Ватажок Ю. Я., Моисеева Т. Н., Ермолаева Ю. Б., Ващукова Е. С., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2006. Специфичность изменений в протеасомах клеток K562 при апоптозе, индуцированном диэтилмалеатом. Цитология. 48 (2) : 133—141.
- Шарова Н. П. 2005. Как клетка восстанавливает поврежденную ДНК? Биохимия. 70 (3) : 341—359.
- Adams J. 2001. Proteasome inhibition in cancer: development of PS-341. Semin. Oncol. 28 : 613—619.
- Adams J. 2003. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer. Drug Discov. Today. 8 : 307—315.
- Adams J., Palombella V. J., Sausville E. A., Johnson J., Destree A., Lazarus D. D., Maas J., Pien C. S., Prakash S., Elliott P. J. 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. Cancer Res. 59 : 2615—2622.
- Adrain C., Creagh E. M., Cullen S. P., Martin S. J. 2004. Caspase-dependent inactivation of proteasome function during programmed cell death in *Drosophila* and man. J. Biol. Chem. 279 : 36 923—36 930.
- Akhayat O., Infante A., Infante D., Martins S. A. C., de Grossi S. A. M. F., de Scherrer K. 1987. A new type of prosome-like particle, composed of small cytoplasmatic RNA and multimers of 21-kDa protein, inhibits protein synthesis *in vitro*. Eur. J. Biochem. 170 : 23—33.
- Almond J. B., Snowden R. T., Hunter A., Dinsdale D., Cain K., Cohen G. M. 2001. Proteasome inhibitor-induced apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells involves cytochrome c release and caspase activation, accompanied by formation of an approximately 700 kDa Apaf-1 containing apoptosome complex. Leukemia. 15 : 1388—1397.
- Alvarez-Castelao B., Castaño J. G. 2005. Mechanism of direct degradation of I κ B α by 20S proteasome. FEBS Lett. 579 : 4797—4802.
- Amati B., Alevizopoulos K., Vlach J. 1998. Myc and the cell cycle. Front Biosci. 3 : 250—268.
- Amerik A. Y., Hochstrasser M. 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. Biochim. Biophys. Acta. 1695 : 189—207.
- An B., Goldfarb R. H., Siman R., Dou Q. P. 1998. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. Cell Death Differ. 5 : 1062—1075.
- Ang X. L., Wade Harper J. 2005. SCF-mediated protein degradation and cell cycle control. Oncogene. 24 (17) : 2860—2870.
- Arendt C. S., Hochstrasser M. 1999. Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. EMBO J. 18 : 3575—3585.

- Arrigo A. P., Tanaka K., Goldberg A. L., Welch W. J. 1988. Identity of the 19S «prosome» particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature*. 331 : 192—194.
- Asher G., Lotem J., Sachs L., Kahana C., Shaul Y. 2002. Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 99 : 13 125—13 130.
- Auld K. L., Brown C. R., Casolari J. M., Komili S., Silver P. A. 2006. Genomic association of the proteasome demonstrates overlapping gene regulatory activity with transcription factor substrates. *Mol. Cell*. 21 : 861—871.
- Auld K. L., Silver P. A. 2006. Transcriptional regulation by the proteasome as a mechanism for cellular protein homeostasis. *Cell Cycle*. 5 : 1503—1505.
- Bach I., Ostendorf H. P. 2003. Orchestrating nuclear functions: ubiquitin sets the rhythm. *TiBS*. 28 : 189—195.
- Ballut L., Petit F., Mouzeeyar S., Le Gall O., Candresse T., Schmid P., Nicolas P., Badaoui S. 2003. Biochemical identification of proteasome-associated endonuclease activity in sunflower. *Biochim. biophys. acta*. 1645 : 30—39.
- Bardag-Gorce F., Venkatesh R., Li J., French B. A., French S. W. 2004. Hyperphosphorylation of rat liver proteasome subunits: the effects of ethanol and okadaic acid are compared. *Life Sci*. 75 : 585—597.
- Baumeister W., Walz J., Zuhl F., Seemuller E. 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*. 92 : 367—380.
- Benaroudj N., Tarcsa E., Cascio P., Goldberg A. L. 2001. The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes. *Biochimie*. 83 : 311—318.
- Beyette J., Mason G., Murray R., Cohen G., Rivett J. 1998. Proteasome activities decrease during dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes. *Biochem. J*. 332 : 315—320.
- Bochtler M., Ditzel L., Groll M., Hartmann C., Huber R. 1999. The proteasome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28 : 295—317.
- Bose S., Brooks P., Mason G. G., Rivett A. J. 2001. Gamma-interferon decreases the level of 26 S proteasomes and changes the pattern of phosphorylation. *Biochem. J*. 353 : 291—297.
- Bose S., Mason G. G., Rivett A. J. 1999. Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. *Mol. Biol. Rep.* 26 : 11—14.
- Bose S., Stratford F. L., Broadfoot K. I., Mason G. G., Rivett A. J. 2004. Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem. J*. 378 : 177—184.
- Bowerman B., Kurz T. 2006. Degrade to create: developmental requirements for ubiquitin-mediated proteolysis during early C. Elegans embryogenesis. *Development*. 133 : 773—784.
- Brannigan J. A., Dodson G., Duggleby H. J., Moody P. C., Smith J. L., Tomchick D. R., Murzin A. G. 1995. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*. 378 : 416—419.
- Braun B. C., Glickman M., Kraft R., Dahlmann B., Kloetzel P. M., Finley D., Schmidt M. 1999. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell. Biol.* 1 : 221—226.
- Breitschopf K., Haendeler J., Malchow P., Zeiher A.M., Dimmeler S. 2000a. Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20 : 1886—1896.
- Breitschopf K., Zeiher A. M., Dimmeler S. 2000b. Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *J. Biol. Chem.* 275 : 21 648—21 652.
- Briggs S. D., Xiao T., Sun Z. W., Caldwell J. A., Shabanowitz J., Hunt D. F., Allis C. D., Strahl B. D. 2002. Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature*. 418 : 498.
- Burns T. F., El Deiry W. S. 1999. The p53 pathway and apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 181 : 231—239.
- Burri L., Höckendorff J., Boehm U., Klamp T., Dohmen R. J., Levy F. 2000. Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 97 : 10 348—10 353.
- Canu N., Barbato C., Ciotti M. T., Serafino A., Dus L., Calissano P. 2000. Proteasome involvement and accumulation of ubiquitinated proteins in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J. Neurosci.* 20 : 589—599.
- Castaño J. G., Mahillo E., Arizti P., Arribas J. 1996. Phosphorylation of C8 and C9 subunits of the multicatalytic proteinase by casein kinase II and identification of the C8 phosphorylation sites by direct mutagenesis. *Biochemistry*. 35 : 3782—3789.
- Chang Y. C., Lee Y. S., Tejima T., Tanaka K., Omura S., Heintz N. H., Mitsui Y., Magae J. 1998. mdm2 and bax, downstream mediators of the p53 response, are degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell. Growth Differ.* 9 : 79—84.
- Cho J. W., Park J. C., Lee J. C., Kwon T. K., Park J. W., Baek W. K., Suh S. I., Suh M. H. 2001. The levels of MDM2 protein are decreased by a proteasome-mediated proteolysis prior to caspase-3-dependent pRb and PARP cleavages. *J. Korean Med. Sci.* 16 : 135—139.
- Ciechanover A., Brundin P. 2003. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*. 40 : 427—446.
- Ciechanover A., Schwartz A.L. 2004. The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim. biophys. acta*. 1695 : 3—17.
- Clarke D. J., Diaz-Martinez L. A., Giménez-Abian J. F. 2005. Anaphase promoting complex or cyclosome? *Cell Cycle*. 4 : 1585—1592.
- Claverol S., Burlet-Schiltz O., Girbal-Neuhausser E., Gairin J. E., Monsarrat B. 2002. Mapping and structural dissection of human 20 S proteasome using proteomic approaches. *Mol. Cell. Proteomics*. 1 : 567—578.
- Coffino P. 2001. Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimie*. 83 : 319—323.
- Collins G.A., Tansey W.P. 2006. The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr. Opin. Genet. Develop.* 16 : 197—202.
- Coux O., Nothwang H. G., Silva Pereira I., Recillas Targa F., Bey F., Scherrer K. 1994. Phylogenetic relationships of the amino acid sequences of prosome (proteasome, MCP) subunits. *Mol. Gen. Genet.* 245 : 769—780.
- Dahlmann B. 2005. Proteasomes. *Essays Biochem.* 41 : 31—48.
- Dahlmann B., Ruppert T., Kloetzel P. M., Kuehn L. 2001. Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie* 83 : 295—299.
- Dallaporta B., Pablo M., Maise C., Daugas E., Loeffler M., Zamzami N., Kroemer G. 2000. Proteasome activation as a critical event of thymocyte apoptosis. *Cell. Death. Differ.* 7 : 368—373.
- Dawson S. P., Arnold J. E., Mayer N. J., Reynolds S. E., Billett M. A., Gordon C., Colleaux L., Kloetzel P. M., Tanaka K., Mayer R. J. 1995. Developmental changes of the 26 S proteasome in abdominal intersegmental muscles of *Manduca sexta* during programmed cell death. *J. Biol. Chem.* 270 : 1850—1858.
- Delic J., Masdehors P., Omura S., Cosset J. M., Dumont J., Binet J. L., Magdelenat H. 1998. The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo- and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNFalpha-initiated apoptosis. *Br. J. Canc.* 77 : 1103—1107.
- Demartino G. N., Slaughter C. A. 1999. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274 : 22 123—22 126.
- Demasi M., Shringarpure R., Davies K. J. 2001. Glutathiolation of the proteasome is enhanced by proteolytic inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* 389 : 254—263.
- Demasi M., Silva G. M., Netto L. E. 2003. 20 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. *J. Biol. Chem.* 278 : 679—685.
- Deshaies R. J. 1995. Make it or break it: the role of ubiquitin-dependent proteolysis in cellular regulation. *Trends Cell Biol.* 5 : 428—434.

- Deveraux Q. L., Roy N., Stennicke H. R., Van Arsdale T., Zhou Q., Srinivasula S. M., Alnemri E. S., Salvesen G. S., Reed J. C. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome *c* by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17 : 2215—2223.
- Deveraux Q. L., Takahashi R., Salvesen G. S., Reed J. C. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 388 : 300—304.
- Devoy A., Soane T., Welchman R., Mayer R. J. 2005. The ubiquitin-proteasome system and cancer. *Essays Biochem.* 41 : 187—203.
- Dhananjayan S. C., Ismail A., Nawaz Z. 2005. Ubiquitin and control of transcription. *Essays Biochem.* 41 : 69—80.
- Dick L. R., Moomaw C. R., Pramanik B. C., DeMartino G. N., Slaughter C. A. 1992. Identification and localization of a cysteinyl residue critical for the trypsin-like catalytic activity of the proteasome. *Biochemistry.* 31 : 7347—7355.
- Dimmeler S., Breitschopf K., Haendeler J., Zeiher A. M. 1999. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J. Exp. Med.* 189 : 1815—1822.
- Distelhorst C. W. 2002. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 9 : 6—19.
- Drexler H. C. 1997. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94 : 855—860.
- Drexler H. C. A. 1998. Programmed cell death and the proteasome. *Apoptosis.* 3 : 1—7.
- Drexler H. C., Risau W., Konerding M. A. 2000. Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *FASEB J.* 14 : 65—77.
- Duckett C. S., Nava V. E., Gedrich R. W., Clem R. J., Van Dongen J. L., Gilfillan M. C., Shiels H., Hardwick J. M., Thompson C. B. 1996. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus *iap* gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15 : 2685—2694.
- Etlinger J. D., Goldberg A. L. 1977. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74 : 54—58.
- Eytan E., Moshe Y., Braunstein I., Hershko A. 2006. Roles of the anaphase-promoting complex/cyclosome and of its activator Cdc20 in functional substrate binding. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 103 (7) : 2081—2086.
- Ezhkova E., Tansey W. P. 2004. Proteasomal ATPases link ubiquitylation of histone H2B to methylation of histone H3. *Mol. Cell.* 13 : 435—442.
- Fang S., Jensen J. P., Ludwig R. L., Vousden K. H., Weissman A. M. 2000. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* 275 : 8945—8951.
- Farout L., Mary J., Vinh J., Szveda L. I., Friguet B. 2006. Inactivation of the proteasome by 4-hydroxy-2-nonenal is site specific and dependant on 20S proteasome subtypes. *Arch. Biochem. Biophys.* 453 : 135—142.
- Ferdous A., Gonzalez F., Sun L., Kodadek T., Johnston S. A. 2001. The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell.* 7 : 981—991.
- Ferdous A., Kodadek T., Johnston S. A. 2002. A nonproteolytic function of the 19S regulatory subunit of the 26S proteasome is required for efficient activated transcription by human RNA polymerase II. *Biochemistry.* 41 : 12 798—12 805.
- 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.
- Fernandez Murray P., Biscoglio M. J., Passeron S. 2002. *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of *Candida albicans* 20S proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 404 : 116—125.
- Figureiredo-Pereira M. E., Chen W. E., Yuan H. M., Wilk S. 1995. A novel chymotrypsin-like component of the multicatalytic proteinase complex optimally active at acidic pH. *Arch. Biochem. Biophys.* 317 : 69—78.
- Finley D., Tanaka C., Mann C., Feldmann M., Hochstrasser M., Vierstra R., Johnson S., Hampton R., Haber J., Mccusker J. 1998. Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particle. *Trends Biochem. Sci.* 23 : 244—245.
- Franco A. V., Zhang X. D., Van Berkel E., Sanders J. E., Zhang X. Y., Thomas W. D., Nguyen T., Hersey P. 2001. The role of NF-kappa B in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells. *J. Immunol.* 166 : 5337—5345.
- Fraser R. A., Rossignol M., Heard D. J., Egly J. M., Chambon P. 1997. SUG1, a putative transcriptional mediator and subunit of the PA700 proteasome regulatory complex, is a DNA helicase. *J. Biol. Chem.* 272 : 7122—7126.
- Frieh K., Gossen M., Wang K., Bujard H., Peterson P. A., Yang Y. 1994. Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO J.* 13 : 3236—3244.
- Fu H. Y., Reis N., Lee Y., Glickman M. H., Vierstra R. 2001. Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome reveal a conserved core structure. *J. EMBO.* 20 : 7096—7107.
- Fujihara S., Ward C., Dransfield I., Hay R., Uings I., Hayes B., Farrow S., Haslett C., Rossi A. 2002. Inhibition of nuclear factor- κ B activation un-masks the ability of TNF- α to induce human eosinophil apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 32 : 457—466.
- Fujita E., Mukasa T., Tsukahara T., Arahata K., Omura S., Momoi T. 1996. Enhancement of CPP32-like activity in the TNF-treated U937 cells by the proteasome inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 : 74—79.
- Gao G., Luo H. 2006. The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84 : 5—14.
- Gao X., Li J., Pratt G., Wilk S., Rechsteiner M. 2004. Purification procedures determine the proteasome activation properties of REG γ (PA28 γ). *Arch. Biochem. Biophys.* 425 : 158—164.
- Gautier-Bert K., Muro B., Jarrousse A. S., Ballut L., Badaoui S., Petit F., Schmid H. P. 2003. Substrate affinity and substrate specificity of proteasomes with RNase activity. *Mol. Biol. Rep.* 30 : 1—7.
- Gillette T. G., Gonzalez F., Delahodde A., Johnston S. A., Kodadek T. 2004. Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 5904—5909.
- Gillette T. G., Huang W., Russell S. J., Reed S. H., Johnston S. A., Friedberg E. C. 2001. The 19S complex of the proteasome regulates nucleotide excision repair in yeast. *Genes Develop.* 15 : 1528—1539.
- Gillette T. G., Yu S., Zhou Z., Waters R., Johnston S. A., Reed S. H. 2006. Distinct functions of the ubiquitin-proteasome pathway influence nucleotide excision repair. *EMBO J.* 25 : 2529—2538.
- Glickman M. H., Ciechanover A. 2002. The ubiquitin—proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82 : 373—428.
- Glickman M. H., Raveh D. 2005. Proteasome plasticity. *FEBS Lett.* 579 : 3214—3223.
- Glickman M. H., Rubin D. M., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Baumeister W., Fried V. A., Finley D. 1998. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell.* 94 : 615—623.
- Gomes A. V., Zong C., Edmondson R. D., Li X., Stefani E., Zhang J., Jones R. C., Thyparambil S., Wang G. W., Qiao X., Bardag-Gorce F., Ping P. 2006. Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes. *Circ. Res.* 99 (4) : 362—371.
- Gregory M. A., Hann S. R. 2000. c-Myc proteolysis by the ubiquitin—proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 20 : 2423—2435.
- Grimm L. M., Goldberg A. L., Poirier G. G., Schwartz L. M., Osborne B. A. 1996. Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* 15 : 3835—3844.
- Groettrup M., Khan S., Schwarz K., Schmidtke G. 2001a. Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie.* 83 : 367—372.

- Groettrup M., van den Broek M., Schwarz K., Macagno A., Khan S., de Giuli R., Schmidtke G. 2001b. Structural plasticity of the proteasome and its function in antigen processing. *Crit. Rev. Immunol.* 21 : 339—358.
- Groll M., Bochtler M., Brandstetter H., Clausen T., Huber R. 2005. Molecular machines for protein degradation. *ChemBiochem.* 6 : 222—256.
- Groll M., Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H. D., Huber R. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 386 : 463—471.
- Groll M., Huber R. 2004. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim. biophys. acta.* 1695 : 33—44.
- Haass C., Kloetzel P. M. 1989. The *Drosophila* proteasome undergoes changes in its subunit pattern during development. *Exp. Cell. Res.* 180 : 243—252.
- Hatakeyama S., Yada M., Matsumoto M., Ishida N., Nakayama K. 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem.* 276 : 33 111—33 120.
- Heinemeyer W., Fischer M., Krimmer T., Stachon U., Wolf D. H. 1997. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* 272 : 25 200—25 209.
- Heinemeyer W., Ramos P. C., Dohmen R. J. 2004. The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cell Mol. Life Sci.* 61 : 1562—1578.
- Heink S., Ludwig D., Kloetzel P.M., Kruger E. 2005. IFN- γ -induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 9241—9246.
- Hendil K. B., Khan S., Tanaka K. 1998. Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20S proteasomes. *Biochem. J.* 332 : 749—754.
- Herrmann J. L., Briones F. J., Brisbay S., Logothetis C. J., McDonnell T. J. 1998. Prostate carcinoma cell death resulting from inhibition of proteasome activity is independent of functional Bcl-2 and p53. *Oncogene.* 17 : 2889—2899.
- Herrmann J., Ciechanover A., Lerman O., Lerman A. 2004. The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases — a hypothesis extended. *Cardiovascular Res.* 61 : 11—12.
- Hershko A. 1997. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 : 788—799.
- Hershko A., Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67 : 425—479.
- Hershko A., Ciechanover A., Varshavsky A. 2000. Basic medical research award. The ubiquitin system. *Nat. Med.* 6 : 1073—1081.
- Hirsch T., Dallaporta B., Zamzami N., Susin S. A., Ravagnan L., Marzo I., Brenner C., Kroemer G. 1998. Proteasome activation occurs at an early, premitochondrial step of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* 161 : 35—40.
- Hochshtrasser M. 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Immunol.* 17 : 405—439.
- Hoppe T. 2005. Multiubiquitylation by E4 enzymes: «one size doesn't fit all. *Trends Biochem. Sci.* 30 : 183—187.
- Horiguchi R., Yoshikuni M., Tokumoto M., Nagahama Y., Tokumoto T. 2005. Identification of a protein kinase which phosphorylates a subunit of the 26S proteasome and changes in its activity during meiotic cell cycle in goldfish oocytes. *Cell Signal.* 17 : 205—215.
- Hoyt M. A., Coffino P. 2004. Ubiquitin-free routes into the proteasome. *Cell Mol. Life Sci.* 61 : 1596—1600.
- Hughes A. L. 1997. Evolution of the proteasome components. *Immunogenetics.* 46 : 82—92.
- Humbard M. A., Stevens S. M., Jr., Maupin-Furlow J. A. 2006. Posttranslational modification of the 20S proteasomal proteins of the archaeon *Haloferax volcanii*. *J. Bacteriol.* 188 : 7521—7530.
- Ichihara A., Tanaka K., Andoh T., Shimbara N. 1993. Regulation of proteasome expression in developing and transformed cells. *Adv. Enzyme Regul.* 33 : 173—180.
- Imajoh-Ohmi S., Kawaguchi T., Sugiyama S., Tanaka K., Omura S., Kikuchi H. 1995. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217 : 1070—1077.
- Iwafune Y., Kawasaki H., Hirano H. 2002. Electrophoretic analysis of phosphorylation of the yeast 20S proteasome. *Electrophoresis.* 23 : 329—338.
- Iwafune Y., Kawasaki H., Hirano H. 2004. Identification of three phosphorylation sites in the $\alpha 7$ subunit of the yeast 20S proteasome *in vivo* using mass spectrometry. *Arch. Biochem. Biophys.* 431 : 9—15.
- Jariel-Encontre I., Bossis G., Piechaczyk M. 2008. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim. biophys. acta.* 1786 : 153—177.
- Jariel-Encontre I., Pariat M., Martin F., Carillo S., Salvat C., Piechaczyk M. 1995. Ubiquitinylation is not an absolute requirement for degradation of c-Jun protein by the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 270 : 11 623—11 627.
- Jarrousse A. S., Petit F., Kreutzer-Schmid K., Gaedigk R., Schmid H. P. 1999. Possible involvement of proteasomes (prosome) in AUUUA-mediated mRNA decay. *J. Biol. Chem.* 274 : 22 023—22 028.
- Jin J., Ang X. L., Shirogane T., Wade Harper J. 2005. Identification of substrates for F-box proteins. *Methods Enzymol.* 399 : 287—309.
- Joazeiro C. A., Weissman A. M. 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell.* 102 : 549—552.
- Johnson D. G., Walker C. L. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 : 295—312.
- Jones M. E., Haire M. F., Kloetzel P. M., Mykles D. L., Schwartz L. M. 1995. Changes in the structure and function of the multicatalytic proteinase (proteasome) during programmed cell death in the intersegmental muscles of the hawkmoth, *Manduca sexta*. *Develop. Biol.* 169 : 436—447.
- Josefsberg L. B., Galiani D., Dantes A., Amsterdam A., Dekel N. 2000. The proteasome is involved in the first metaphase-to-anaphase transition of meiosis in rat oocytes. *Biol. Reprod.* 62 : 1270—1277.
- Josefsberg L. B., Kaufman O., Galiani D., Kovo M., Dekel N. 2001. Inactivation of M-phase promoting factor at exit from first embryonic mitosis in the rat is independent of cyclin B1 degradation. *Biol. Reprod.* 64 : 871—878.
- Kanayama H., Tanaka K., Aki M., Kagawa S., Miyaji H., Satoh M., Okada F., Sato S., Shimbara N., Ichihara A. 1991. Changes in expressions of proteasome and ubiquitin genes in human renal cancer cells. *Cancer Res.* 51 : 6677—6685.
- Karin M., Ben-Neriah Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18 : 621—663.
- Kawahara H., Kasahara M., Nishiyama A., Ohsumi K., Goto T., Kishimoto T., Saeki Y., Yokosawa H., Shimbara N., Murata S., Chiba T., Suzuki K., Tanaka K. 2000a. Developmentally regulated, alternative splicing of the Rpn10 gene generates multiple forms of 26S proteasomes. *EMBO J.* 19 : 4144—4153.
- Kawahara H., Philipova R., Yokosawa H., Patel R., Tanaka K., Whitaker M. 2000b. Inhibiting proteasome activity causes overreplication of DNA and blocks entry into mitosis in sea urchin embryos. *J Cell Sci.* 113 : 2659—2670.
- Kessel M., Wu W., Gottesman S., Kocsis E., Steven A. C., Maurizi M. R. 1996. Six-fold rotational symmetry of ClpQ, the *E. coli* homolog of the 20S proteasome, and its ATP-dependent activator, ClpY. *FEBS Lett.* 398 : 274—278.
- Kile B.T., Schulman B.A., Alexander W.S., Nicola N.A., Martin H.M., Hilton D.J. 2002. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem. Sci.* 27 : 235—241.
- Kimura Y., Saeki Y., Yokosawa H., Polevoda B., Sherman F., Hirano H. 2003. N-terminal modifications of the 19S regulatory particle subunits of the yeast proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 409 : 341—348.
- Kimura Y., Takaoka M., Tanaka S., Sassa H., Tanaka K., Polevoda B., Sherman F., Hirano H. 2000. N-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 275 : 4635—4639.
- King R. W., Deshaies R. J., Peters J.-M., Kirschner M. W. 1996. How the proteolysis drives the cell cycle. *Science.* 274 : 1652—1659.

- Kinyamu H. K., Archer T. K. 2007. Proteasome activity modulates chromatin modifications and RNA polymerase II phosphorylation to enhance glucocorticoid receptor-mediated transcription. *Mol. Cell. Biol.* 27 : 4891—4904.
- Kinyamu H.K., Chen J., Archer T.K. 2005. Linking the ubiquitin—proteasome pathway to chromatin remodeling/modification by nuclear receptors. *J. Mol. Endocrinol.* 34 : 281—297.
- Kitagawa H., Tani E., Ikemoto H., Ozaki I., Nakano A., Omura S. 1999. Proteasome inhibitors induce mitochondria-independent apoptosis in human glioma cells. *FEBS Lett.* 443 : 181—186.
- Kiyomiya K., Kurebe M., Nakagawa H., Matsuo S. 2002. The role of the proteasome in apoptosis induced by anthracycline anticancer agents. *Int. J. Oncol.* 20 : 1205—1259.
- Klein U., Gernold M., Kloetzel P. M. 1990. Cell-specific accumulation of *Drosophila* proteasomes (MCP) during early development. *J. Cell. Biol.* 111 : 2275—2282.
- Kloetzel P. M. 2001. Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2 : 179—187.
- Kloetzel P. M. 2004. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim. biophys. acta.* 1695 : 225—233.
- Kloetzel P. M., Soza A., Stohwasser R. 1999. The role of the proteasome system and the proteasome activator PA28 complex in the cellular immune response. *Biol. Chem.* 380 : 293—297.
- Knuehl C., Seelig A., Brecht B., Henklein P., Kloetzel P. M. 1996. Functional analysis of eukaryotic 20S proteasome nuclear localization signal. *Exp. Cell Res.* 225 (1) : 67—74.
- Krogan N. J., Lam M. H. Y., Fillingham J., Keogh M. C., Gebbia M., Li J., Datta N., Cagney G., Buratowski S., Emili A., Greenblatt J. F. 2004. Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell.* 16 : 1027—1034.
- 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.
- Kumeda S. I., Deguchi A., Toi M., Omura S., Umezawa K. 1999. Induction of G1 arrest and selective growth inhibition by lactacystin in human umbilical vein endothelial cells. *Anticancer Res.* 19 : 3961—3968.
- Kuttler C., Nussbaum A. K., Dick T. P., Rammensee H. G., Schild H., Hädeler K. P. 2000. An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. *J. Mol. Biol.* 298 : 417—429.
- Lee D., Ezhkova E., Li B., Pattenden S.G., Tansey W.P., Workman J. L. 2005. The proteasome regulatory particle alters the SAGA coactivator to enhance its interactions with transcriptional activators. *Cell.* 123 : 423—436.
- Lee M., Hyun D. H., Marshall K. A., Ellerby L. M., Bredesen D. E., Jenner P., Halliwell B. 2001. Effect of overexpression of Bcl-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome. *Free Radic. Biol. Med.* 31 : 1550—1559.
- Lee S. C., Shaw B. D. 2007. A novel interaction between N-myristoylation and the 26S proteasome during cell morphogenesis. *Mol. Microbiol.* 63 : 1039—1053.
- Lehmann A., Janek K., Braun B., Kloetzel P. M., Enekel C. 2002. 20S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J. Mol. Biol.* 317 : 401—413.
- Li B., Dou Q. P. 2000. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97 : 3850—3855.
- Li N., Lerea K. M., Etlinger J. D. 1996. Phosphorylation of the proteasome activator PA28 is required for proteasome activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225 : 855—860.
- Lipford J. R., Deshaies R. J. 2003. Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *Nature Cell Biol.* 5 : 845—850.
- Lipford J. R., Smith G. T., Chi Y., Deshaies R. J. 2005. A putative stimulatory role for activator turnover in gene expression. *Nature.* 438 : 113—116.
- Liu C.-W., Corboy M. J., DeMartino G. N., Thomas P. J. 2003. Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science.* 299 : 408—411.
- Lommel L., Ortolan T., Chen L., Madura K., Sweder K. S. 2002. Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26S proteasome. *Curr. Genet.* 42 : 9—20.
- Löw P., Bussell K., Dawson S. P., Billett M. A., Mayer R. J., Reynolds S. E. 1997. Expression of a 26S proteasome ATPase subunit, MS73, in muscles that undergo developmentally programmed cell death, and its control by ecdysteroid hormones in the insect *Manduca sexta*. *FEBS Lett.* 400 : 345—349.
- Löwe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W., Huber R. 1995. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science.* 268 : 533—539.
- Ludemann R., Lerea K. M., Etlinger J. D. 1993. Copurification of casein kinase II with 20S proteasomes and phosphorylation of a 30-kDa proteasome subunit. *J. Biol. Chem.* 268 : 17413—17417.
- Luo H., Wu Y., Qi S., Wan X., Chen H., Wu J. 2001. A proteasome inhibitor effectively prevents mouse heart allograft rejection. *Transplantation.* 72 : 196—202.
- Machiels B. M., Henfling M. E., Gerards W. L., Broers J. L., Bloemendal H., Ramaekers F. C. Schutte B. 1997. Detailed analysis of cell cycle kinetics upon proteasome inhibition. *Cytometry.* 28 : 243—252.
- Machiels B. M., Henfling M. E., Schutte B., van Engeland M., Broers J. L., Ramaekers F. C. 1996. Subcellular localization of proteasomes in apoptotic lung tumor cells and persistence as compared to intermediate filaments. *Eur. J. Cell. Biol.* 70 : 250—259.
- MacLaren A. P., Chapman R. S., Wyllie A. H., Watson C. J. 2001. p53-dependent apoptosis induced by proteasome inhibition in mammary epithelial cells. *Cell Death Differ.* 8 : 210—218.
- Makino Y., Yoshida T., Yogosawa S., Tanaka K., Muramatsu M., Tamura T. A. 1999. Multiple mammalian proteasomal ATPases, but not proteasome itself, are associated with TATA-binding protein and a novel transcriptional activator, TIP120. *Genes Cells.* 4 : 529—539.
- Martin M. C., Dransfield I., Haslett C., Rossi A. G. 2001. Cyclic AMP regulation of neutrophil apoptosis occurs via a novel PKA-independent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276 (48) : 45 041—45 050.
- Mason G. G., Hendil K. B., Rivett A. J. 1996. Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Identification of two phosphorylated subunits and the effect of phosphorylation on activity. *Eur. J. Biochem.* 238 : 453—462.
- Mason G., Murray R., Pappin D., Rivett A. J. 1998. Phosphorylation of ATPase subunits of the 26S proteasome. *FEBS.* 430 : 269—274.
- Masson P., Andersson O., Petersen U. M., Young P. 2001. Identification and characterization of a *Drosophila* nuclear proteasome regulator. A homolog of human 11 S REGgamma (PA28gamma). *J. Biol. Chem.* 276 : 1383—1390.
- Maupin-Furlow J. A., Aldrich H. C., Ferry J. G. 1998. Biochemical characterization of the 20S proteasome from the methanarchaeon *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* 180 : 1480—1487.
- Maupin-Furlow J. A., Humbard 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.
- Mayr J., Seemüller E., Müller S. A., Engel A., Baumeister W. 1998. Late events in the assembly of 20S proteasomes. *J. Struct. Biol.* 124 : 179—188.
- Murakami Y., Matsufuji S., Kameji T., Hayashi S., Igarashi K., Tamura T., Tanaka K., Ichihara A. 1992. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature.* 360 : 597—599.
- Murata S. 2006. Multiple chaperone-assisted formation of mammalian 20S proteasomes. *IUBMB Life.* 58 : 344—348.
- Muratani M., Tansey W. P. 2003. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 : 192—201.
- Nandi D., Tahiliani P., Kumar A., Chandu D. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci.* 31 : 137—155.
- Nandi D., Woodward E., Ginsburg D. B., Monaco J. J. 1997. Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *EMBO J.* 16 : 5363—5375.

- Naujokat C., Hoffmann S. 2002. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab. Invest.* 82 : 965—980.
- Naujokat C., Sezer O., Zinke H., Leclere A., Hauptmann S., Possinger K. 2000. Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells. *Eur. J. Haematol.* 65 : 221—236.
- Nawaz Z., O'Malley B. W. 2004. Urban renewal in the nucleus: is protein turnover by proteasomes absolutely required for nuclear receptor-regulated transcription? *Mol. Endocrinol.* 18 : 493—499.
- Nederlof P. M., Wang H. R., Baumeister W. 1995. Nuclear localization signals of human and *Thermoplasma* proteasomal alpha subunits are functional *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92 : 12 060—12 064.
- Nikaido T., Shimada K., Shibata M., Hata M., Sakamoto M., Takasaki Y., Sato C., Takahashi T., Nishida Y. 1990. Cloning and nucleotide sequence of cDNA for Ki antigen, a highly conserved nuclear protein detected with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 79 : 209—214.
- Orlowski M., Wilk S. 2000. Catalytic activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 383 : 1—16.
- Orlowski M., Wilk S. 2003. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 415 : 1—5.
- Orlowski R. Z., Eswara J. R., Lafond-Walker A., Grever M. R., Orlowski M., Dang C. V. 1998. Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res.* 58 : 4342—4348.
- Pajonk F., McBride W. H. 2001. The proteasome in cancer biology and treatment. *Radiat. Res.* 156 : 447—459.
- Palmer A., Rivett A. J., Thomson S., Hendil K. B., Butcher G. W., Fuertes G., Knecht E. 1996. Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem. J.* 316 : 401—407.
- Pereira M. E., Yu B., Wilk S. 1992. Enzymatic changes of the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex, induced by magnesium ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 294 : 1—8.
- Pereira M. E., Wilk S. 1990. Phosphorylation of the multicatalytic proteinase complex from bovine pituitaries by a copurifying cAMP-dependent protein kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 283 : 68—74.
- Petit F., Jarrousse A.-S., Dahlmann B., Sobek A., Hendil K. B., Bury J., Briand Y., Schmid H.-P. 1997. Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation. *Biochem. J.* 326 : 93—98.
- Pickart C. M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70 : 503—533.
- Pickart C. M., Eddins M. J. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. biophys. acta.* 1695 : 55—72.
- Pleban E., Bury M., Mlynarczuk I., Wojcik C. 2001. Effects of proteasome inhibitor PSI on neoplastic and non-transformed cell lines. *Folia Histochem. Cytophiol.* 39 : 133—134.
- Qiu J. H., Asai A., Chi S., Saito N., Hamada H., Kirino T. 2000. Proteasome inhibitors induce cytochrome c-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* 20 : 259—265.
- Rajkumar S. V., Richardson P. G., Hideshima T., Anderson K. C. 2005. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 23 : 630—639.
- Ramos P. C., Höckendorff J., Johnson E. S., Varshavsky A., Dohmen R. J. 1998. Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell.* 92 : 489—499.
- Rao S., Porter D. C., Chen X., Herliczek T., Lowe M., Keyomarsi K. 1999. Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 7797—7802.
- Rape M., Jentsch S. 2004. Productive RUPture: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochim. biophys. acta.* 1695 : 209—213.
- Realini C., Jensen C. C., Zhang Z., Johnston S. C., Knowlton J. R., Hill C. P., Rechsteiner M. 1997. Characterization of recombinant REGalpha, REGbeta, and REGgamma proteasome activators. *J. Biol. Chem.* 272 : 25 483—25 492.
- Rechsteiner M., Hill C. P. 2005. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol.* 15 : 27—33.
- Rechsteiner M., Hoffman L., Dubiel W. 1993. The multicatalytic and 26 S proteases. *J. Biol. Chem.* 268 : 6065—6068.
- Rechsteiner M., Rogers S. W. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21 : 267—271.
- Reed S. H., Gillette T. G. 2007. Nucleotide excision repair and the ubiquitin proteasome pathway — do all roads lead to Rome? *DNA Repair (Amst.)* 6 : 149—156.
- Reed S. I. 2006. The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control. *Results Probl. Cell Differ.* 42 : 147—181.
- Reid J., Svejstrup J. Q. 2004. DNA damage-induced Def1-RNA polymerase II interaction and Def1 requirement for polymerase ubiquitylation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 279 : 29 875—29 878.
- Reverte C. G., Ahearn M. D., Hake L. E. 2001. CPEB degradation during *Xenopus* oocyte maturation requires a PEST domain and the 26S proteasome. *Develop. Biol.* 231 : 447—458.
- Rivett A. J. 1998. Intracellular distribution of proteasomes. *Curr. Opin. Immunol.* 10 : 110—114.
- Rivett A., Bose S., Brooks P., Broadfoot K. I. 2001. Regulation of proteasome complexes by γ -interferon and phosphorylation. *Biochimie.* 83 : 363—366.
- 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.
- Rock K. L., Goldberg A. L. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17 : 739—779.
- Rock K. L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A. L. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 78 : 761—771.
- Rohrwild M., Coux O., Huang H. C., Moerschell R. P., Yoo S. J., Seol J. H. 1996. HslV-HslU: a novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 5808—5813.
- Rohrwild M., Pfeifer G., Santarius U., Muller S. A., Huang H. C., Engel A., Baumeister W., Goldberg A. L. 1997. The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat. Struct. Biol.* 4 : 133—139.
- Russell S. J., Reed S. H., Huang W., Friedberg E. C., Johnston S. A. 1999. The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol. Cell.* 3 : 687—695.
- Ryabova L. V., Virtanen I., Olink-Coux M., Scherrer K., Vassetzky S. G. 1994. Distribution of prosome proteins and their relationship with the cytoskeleton in oogenesis of *Xenopus laevis*. *Mol. Reprod. Develop.* 37 : 195—203.
- Sadoul R., Fernandez P. A., Quiquerez A. L., Martinou I., Maki M., Schroter M., Becherer J. D., Irmiler M., Tschopp J., Martinou J. C. 1996. Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons. *EMBO J.* 15 : 3845—3852.
- Salghetti S. E., Kim S. Y., Tansey W. P. 1999. Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J.* 18 : 717—726.
- Satoh K., Nishikawa T., Yokosawa H., Sawada H. 1995. Phosphorylation of proteasome substrate by a protein kinase associated with the 26 S proteasome is linked to the ATP-dependent proteolysis of the 26 S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213 : 7—14.
- Sawada M. T., Morinaga C., Izumi K., Sawada H. 1999. The 26S proteasome assembly is regulated by a maturation-inducing hormone in starfish oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254 : 338—344.
- Schauber C., Chen L., Tongaonkar P., Vega I., Lambertson D., Potts W., Madura K. 1998. Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature.* 391 : 715—718.

- Schmidt M., Hanna J., Elsasser S., Finley D. 2005. Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol. Chem.* 386 : 725—737.
- Schwechheimer C., Schwager K. 2004. Regulated proteolysis and plant development. *Plant Cell Rep.* 23 : 353—364.
- Sexl V., Diehl J. A., Sherr C. J., Ashmun R., Beach D., Rousssel M. F. 1999. A rate limiting function of cdc25A for S phase entry inversely correlates with tyrosine dephosphorylation of Cdk2. *Oncogene.* 18 : 573—582.
- Shah S. A., Potter M. W., Callery M. P. 2001a. Ubiquitin proteasome pathway: implications and advances in cancer therapy. *Surg. Oncol.* 10 : 43—52.
- Shah S. A., Potter M. W., McDade T. P., Ricciardi R., Perugini R. A., Elliott P. J., Adams J., Callery M. P. 2001b. 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J. Cell. Biochem.* 82 : 110—122.
- Sheaff R. J., Singer J. D., Swanger J., Smitherman M., Roberts J. M., Clurman B. E. 2000. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol. Cell.* 5 : 403—410.
- Shen Y., White E. 2001. p53-dependent apoptosis pathways. *Adv. Cancer Res.* 82 : 55—84.
- Shibahara T., Kawasaki H., Hirano H. 2002. Identification of the 19S regulatory particle subunits from the rice 26S proteasome. *Eur. J. Biochem.* 269 : 1474—1483.
- Shibahara T., Kawasaki H., Hirano H. 2004. Mass spectrometric analysis of expression of ATPase subunits encoded by duplicated genes in the 19S regulatory particle of rice 26S proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 421 : 34—41.
- Shibatani T., Ward W.F. 1995. Sodium dodecyl sulfate (SDS) activation of the 20S proteasome in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 321 : 160—166.
- Shimbara N., Orino E., Sone S., Ogura T., Takashina M., Shono M., Tamura T., Yasuda H., Tanaka K., Ichihara A. 1992. Regulation of gene expression of proteasomes (multi-protease complexes) during growth and differentiation of human hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 267 : 18 100—18 109.
- Shinohara K., Tomioka M., Nakano H., Toné S., Ito H., Kawashima S. 1996. Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochem. J.* 317 : 385—388.
- 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.
- Smalle J., Vierstra D. 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 : 555—590.
- 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.
- Soza A., Knuehl C., Groettrup M., Henklein P., Tanaka K., Kloetzel P.-M. 1997. Expression and subcellular localization of mouse 20S proteasome activator complex PA28. *FEBS Lett.* 413 : 27—34.
- Sumegi M., Hunyadi-Gulyas E., Medzihradzky K. F., Udvardy A. 2003. 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 : 1284—1289.
- Sun L., Johnston S. A., Kodadek T. 2002. Physical association of the APIS complex and general transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296 : 991—999.
- Sun Z. W., Allis C. D. 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature.* 418 : 104—108.
- Suzuki Y., Nakabayashi Y., Takahashi R. 2001. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its antiapoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 8662—8667.
- Sweder K., Madura K. 2002. Regulation of repair by the 26S proteasome. *J. Biomed. Biotechnol.* 2 : 94—105.
- Tabata M., Tabata R., Grabowski D. R., Bukowski R. M., Ganapathi M. K., Ganapathi R. 2001. Roles of NF-kappaB and 26 S proteasome in apoptotic cell death induced by topoisomerase I and II poisons in human non-small cell lung carcinoma. *J. Biol. Chem.* 276 : 8029—8036.
- Tamura T., Nagy I., Lupas A., Lottspeich F., Cejka Z., Schoofs G., Tanaka K., De Mot R., Baumeister W. 1995. The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr. Biol.* 5 : 766—774.
- Tanahashi N., Murakami Y., Minami Y., Shimbara N., Hendil K. B., Tanaka K. 2000. Induction by interferon- and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 275 : 14 336—14 345.
- Tanaka K., Kawakami T., Tateishi K., Yashiroda H., Chiba T. 2001. Control of IkappaBalpha proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochimie.* 83 : 351—356.
- Tani E., Kitagawa H., Ikemoto H., Matsumoto T. 2001. Proteasome inhibitors induce Fas-mediated apoptosis by c-Myc accumulation and subsequent induction of FasL message in human glioma cells. *FEBS Lett.* 504 : 53—58.
- Tanimoto Y., Kizaki H. 2002. Proteasome inhibitors block ras/ERK signaling pathway resulting in the downregulation of Fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells. *J. Biochem.* 131 : 319—326.
- Tanimoto Y., Onishi Y., Hashimoto S., Kizaki H. 1997. Peptidyl aldehyde inhibitors of proteasome induce apoptosis rapidly in mouse lymphoma RVC cells. *J. Biochem.* 121 : 542—549.
- Tansey W. P. 2001. Transcriptional activation: risky business. *Genes Develop.* 15 : 1045—1050.
- Tarcsa E., Szymanska G., Lecker S., O'Connor C. M., Goldberg A. L. 2000. Ca²⁺-free calmodulin and calmodulin damaged by *in vitro* aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 275 : 20 295—20 301.
- Tewari M. K., Sinnathamby G., Rajagopal D., Eisenlohr L. C. 2005. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat. Immunol.* 6 : 287—294.
- To W. Y., Wang C. C. 1997. Identification and characterization of an activated 20S proteasome in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* 404 : 253—262.
- Tokumoto M., Horiguchi R., Nagahama Y., Ishikawa K., Tokumoto T. 2000. Two proteins, a goldfish 20S proteasome subunit and the protein interacting with 26S proteasome, change in the meiotic cell cycle. *Eur. J. Biochem.* 267 : 97—103.
- Tokumoto M., Horiguchi R., Nagahama Y., Tokumoto T. 1999. Identification of the *Xenopus* 20S proteasome alpha4 subunit which is modified in the meiotic cell cycle. *Gene.* 239 : 301—308.
- Tokunaga F., Aruga R., Iwanaga S., Tanaka K., Ichihara A., Takao T., Shimonishi Y. 1990. The NH2-terminal residues of rat liver proteasome (multicatalytic proteinase complex) subunits, C2, C3 and C8, are N α -acetylated. *FEBS Lett.* 263 : 373—375.
- Touitou R., Richardson J., Bose S., Nakanishi M., Rivett J., Allday M. J. 2001. A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *EMBO J.* 20 : 2367—2375.
- Traenckner E. B., Wilk S., Baeuerle P. A. 1994. A proteasome inhibitor prevents activation of NFkB and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NFkB. *EMBO J.* 13 : 5433—5441.
- Tsimokha A. S., Mittenberg A. G., Kulichkova V. A., Kozhukharova I. V., Gause L. N., Konstantinova I. M. 2007. Changes in composition and activities of 26S proteasomes under the action of doxorubicin — apoptosis inductor of erythroleukemic K562 cells. *Cell Biol. Int.* 31 : 338—348.
- Umeda M., Manabe Y., Uchimiya H. 1997. Phosphorylation of the C2 subunit of the proteasome in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Lett.* 403 : 303—307.
- Ustrell V., Hoffman L., Pratt G., Rechsteiner M. 2002. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J.* 21 : 3516—3525.
- Ustrell V., Pratt G., Gorbea C., Rechsteiner M. 2005. Purification and assay of proteasome activator PA200. *Methods Enzymol.* 398 : 321—329.

- Vink J., Cloos J., Kaspers G. J. 2006. Proteasome inhibition as novel treatment strategy in leukaemia. *Br. J. Haematol.* 134 : 253—262.
- Viteri G., Carrard G., Birlouez-Aragon I., Silva E., Friguet B. 2004. Age-dependent protein modifications and declining proteasome activity in the human lens. *Arch. Biochem. Biophys.* 427 : 197—203.
- Volker C., Lupas A. N. 2002. Molecular evolution of proteasomes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 268 : 1—22.
- Von Mikecz A. 2006. The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J. Cell Sci.* 119 : 1977—1984.
- Wakata Y., Tokumoto M., Horiguchi R., Ishikawa K., Nagahama Y., Tokumoto T. 2004. Identification of alpha-type subunits of the *Xenopus* 20S proteasome and analysis of their changes during the meiotic cell cycle. *BMC Biochem.* 5 : 18.
- Wallace A. D., Cidlowski J. A. 2001. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 276 : 42 714—42 721.
- Walz J., Erdmann A., Kania M., Typke D., Koster A. J., Baumeister W. 1998. 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 121 : 19—29.
- Wang C. Y., Mayo M. W., Baldwin A. S. Jr. 1996. TNF and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF κ B. *Science.* 274 : 787—789.
- Wang H. R., Kania M., Baumeister W., Nederlof P. M. 1997. Import of human and Thermoplasma 20S proteasomes into nuclei of HeLa cells requires functional NLS sequences. *Eur. J. Cell Biol.* 73 : 105—113.
- Wang J., Maldonado M. A. 2006. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol. Immunol.* 3 : 255—261.
- Wang X. W. 1999. Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer Res.* 19 : 4759—4771.
- Wang X., Chen C., Baker P. R., Chen P., Kaiser P., Huang L. 2007. Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex. *Biochemistry.* 46 : 3553—3565.
- Wehren A., Meyer H. E., Sobek A., Kloetzel P. M., Dahmann B. 1996. Phosphoamino acids in proteasome subunits. *Biol. Chem.* 377 : 497—503.
- Wells L., Vosseller K., Cole R. N., Cronshaw J. M., Matunis M. J., Hart G. W. 2002. Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol. Cell Proteomics.* 1 : 791—804.
- Witt E., Zantopf D., Schmidt M., Kraft R., Kloetzel P. M., Kruger E. 2000. Characterization of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7 (beta 5i) incorporation into 20S proteasomes. *J. Mol. Biol.* 301 : 1—9.
- Wojcik C. 1999. Inhibition of the proteasome as a therapeutic approach. *Drug Discov. Today.* 4 : 188—192.
- Wojcik C. 2002. Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J. Cell Mol. Med.* 6 : 25—48.
- Wojcik C., Bury M., Stoklosa T., Giermasz A., Feleszko W., Mlynarczuk I., Pleban E., Basak G., Omura S., Jakobisiak M. 2000. Lovastatin and simvastatin are modulators of the proteasome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32 : 957—965.
- Wojcik C., DeMartino G. N. 2003. Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 : 579—589.
- Wojcik C., Schroeter D., Stoehr M., Wilk S., Paweletz N. 1996. An inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces arrest in G₂-phase and metaphase in HeLa cells. *Eur. J. Cell Biol.* 70 : 172—178.
- Wolf D. H. 2004. From lysosome to proteasome: the power of yeast in the dissection of proteinase function in cellular regulation and waste disposal. *Cell Mol. Life Sci.* 61 : 1—14.
- 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.
- Yang Y., Fang S., Jensen J.P., Weissman A. M., Ashwell J. D. 2000. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science.* 288 : 874—877.
- Yang Y., Yu X. 2003. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J.* 17 : 790—799.
- Yao Y., Huang L., Krutchinsky A., Wong M. L., Standing K. G., Burlingame A. L., Wang C. C. 1999. Structural and functional characterizations of the proteasome-activating protein PA26 from *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 274 : 33 921—33 930.
- Zachara N. E., Hart G. W. 2004. O-GlcNAc modification: a nutritional sensor that modulates proteasome function. *Trends Cell Biol.* 14 : 218—221.
- Zhang F., Hu Y., Huang P., Toleman C. A., Paterson A. J., Kudlow J. E. 2007. Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6. *J. Biol. Chem.* 282 : 22 460—22 471.
- Zhang F., Su K., Yang X., Bowe D. B., Paterson A. J., Kudlow J. E. 2003. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell.* 115 : 715—725.
- Zhang H., Sun L., Liang J., Yu W., Zhang Y., Wang Y., Chen Y., Li R., Sun X., Shang Y. 2006. The catalytic subunit of the proteasome is engaged in the entire process of estrogen receptor-regulated transcription. *EMBO J.* 25 : 4223—4233.
- Zhou P. 2005. Targeted protein degradation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 : 51—55.

Поступила 12 XI 2009

PROTEASOMES: THEIR ROLE IN CELLULAR PROCESSES

A. S. Tsimokha

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

The presented review concerns the structure functional analysis of proteasomes and the participation of ubiquitin proteasome system in the basic cellular processes. 26S proteasomes is a key enzyme of the ubiquitin-dependent pathway of protein degradation in cells. This protein particle is composed of 20S catalytic core and associated regulatory complexes. In addition to several types of peptidase activities, eukaryotic proteasomes also have endoribonuclease, protein-chaperone and DNA-helicase activities. The ubiquitin proteasome system controls the levels of most regulatory proteins in a cell and, thus, is absolutely necessary element for cell life. Proteasomal population in a cell is structurally and functionally heterogeneous. These particles are subjected to multistep regulation, particularly, by set of posttranslation modifications. In this review, we also consider the current knowledge on the involvement of proteasomes in controlling the cell cycle, transcription, apoptosis, differentiation, DNA repair and immune response.

Key words: apoptosis, cell cycle, differentiation, DNA repair, immune response, proteasomes, transcription.