

## ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА ДЕГРАДАЦИИ И ПРОЦЕССИНГА БЕЛКОВ

©2009 г.

А. В. СОРОКИН, Е. Р. КИМ,  
Л. П. ОВЧИННИКОВ

*Институт белка РАН, Пуццино, Московская область*

I. Введение. II. Строение протеасомы. III. Убиквитин-зависимый протеолиз. IV. Неклассический протеасомный протеолиз. V. Регуляция протеасомы. VI. Протеасома и медицина. VIII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Живые организмы содержат от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч белок-кодирующих генов и еще большее число кодируемых ими белков. Множество исследований было посвящено тому, как белок синтезируется; однако обратный процесс деградации белка долгое время оставался без должного внимания. Пионером в области изучения деградации белков был Р.Шенхаймер (R.Schoenheimer). В 1942 г. им были опубликованы результаты исследований, полученные с использованием метода «мечения» молекул радиоактивными изотопами, согласно которым у животных белки постоянно синтезируются и деградируют [1]. Известно, что по времени жизни белки сильно отличаются друг от друга, при этом срок жизни молекул белков в организме определяется их ролью. Так, некоторые структурные белки могут оставаться неизменными в течение многих лет, регуляторные же белки часто нужны организму лишь в течение нескольких минут для запуска определенного процесса, и после выполнения своей функции они должны быть разрушены. Со временем в клетке накапливаются

---

*Принятые сокращения:* Ub – убиквитин, 26S PR – 26S протеасома, 20S CP – 20S коровая частица, коровая протеасома, 19S RP – 19S регуляторная частица, а.о. – аминокислотный остаток.

*Адрес для корреспонденции:* sorokin@vega.protres.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 07-04-00403-а, гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-2542.2008.4, грантов Президиума РАН по программам «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальная наука медицине».

в большом количестве неправильно свернутые и окисленные белки, которые также должны каким-то образом удаляться. Дегградация «сделавших свое дело» и дефектных белков должна быть селективной и осуществляться в изолированных компартментах, чтобы не повредить структурные компоненты клетки и нужные ей белки.

В эукариотической клетке одним из компартментов для утилизации белков служит лизосома. Однако протеолиз в лизосомах – процесс неспецифичный. У высших эукариот в лизосомах разрушаются только белки, связанные с мембранами, и чужеродные белки, захваченные во время эндоцитоза (вирусные, бактериальные и т.д.). Дегградация подавляющего большинства (80–90%) внутриклеточных белков осуществляется 26S протеасомой [2, 3]. В этом случае изолированным компартментом является внутренняя протеолитическая полость ее коровой части (20S протеасомы), в которой расположено несколько пептидазных центров. Отбор субстратов для протеолиза обеспечивается тем, что вход в 20S протеасому обычно закрыт, и попасть в нее могут только белки, несущие специальную «метку». В качестве «метки» выступает цепь полиубиквитина (полиUb) – дегградации подвергаются белки, конъюгированные с полиUb, состоящим как минимум из четырех мономеров убиквитина (Ub). При входе в канал протеасомы полипептидная цепь белка разворачивается и протягивается через него, гидролизуясь до коротких пептидов (от 3 до 25 а.о.), которые выходят из противоположного отверстия канала [4–6]. Сам Ub внутрь протеасомы не заходит, а после уничтожения «отмеченной» молекулы освобождается и метит другую молекулу. Этот процесс получил название «убиквитин-зависимая дегградация белка» (рис. 1). За открытие этого явления его авторы А.Кичановер, А.Хершко и И.Роуз (А. Ciechanover, А. Hershko, I. Rose) были удостоены Нобелевской премии по химии в 2004 году.

Такая схема Ub-зависимой дегградации белков протеасомой была подтверждена многими исследователями. Вместе с тем к концу 1990-х годов постепенно накопилось достаточно много данных, согласно которым протеасома может разрушать белки и другим Ub-независимым способом. Более того, стало очевидно, что протеасома может регулировать не только количество, но и функции белков: в некоторых случаях белок не гидролизуется до коротких пептидов, а подвергается ограниченному протеолизу (процессингу), в результате которого функции белка могут существенным образом изменяться. Этим двум «неканоническим» функциям протеасомы мы уделим особое внимание в данном обзоре.

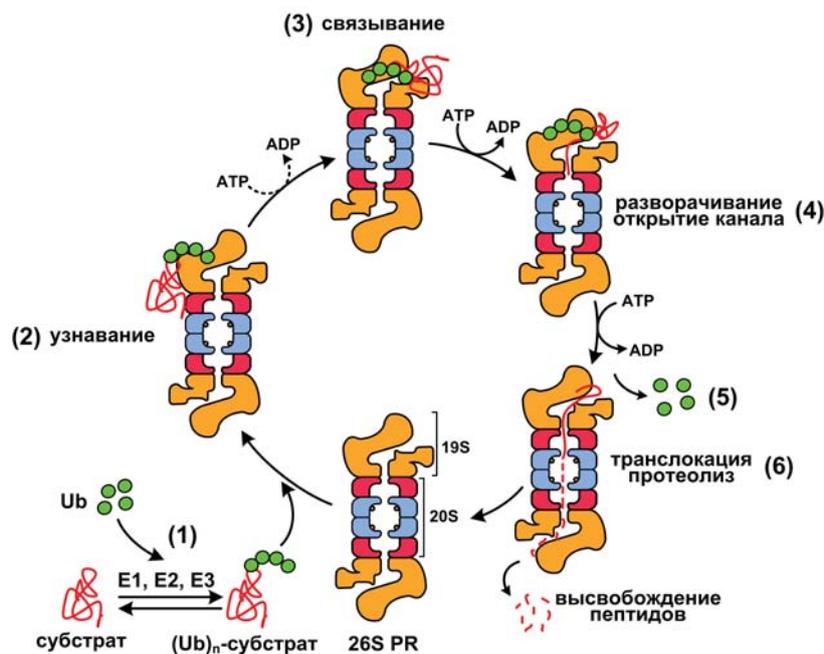


Рис. 1. Упрощенная модель убиквитин-зависимой деградации белков протеасомой.

Общепринятая модель убиквитин-зависимой деградации белков протеасомой включает следующие стадии: (1) формирование конъюгата белка-субстрата с убиквитином происходит в несколько этапов и опосредуется ферментами E1, E2 и E3. (2) Субъединица Rpn10 регуляторной частицы протеасомы узнает четвертичную структуру полиубиквитиновой цепи. (3) Субъединицы Rpn1 и Rpn2 регуляторной частицы протеасомы связывают субстрат. (4) Субъединицы-АТРАЗы регуляторной частицы разворачивают субстрат. Взаимодействие АТРАЗ Rpt2 и Rpt5 с  $\alpha$ -субъединицами коровой протеасомы приводит к открытию канала. (5) Отделение убиквитина от субстрата осуществляется Rpn11 субъединицей регуляторной частицы и деубиквитирующими ферментами Uch37 и Usp14/Ubr6. (6) Транслокация полипептидной цепи субстрата в протеолитическую полость протеасомы осуществляется субъединицами-АТРАзами регуляторной частицы, гидролиз пептидных связей протеазными субъединицами ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 и  $\beta$ 5, каталитические центры обозначены кружками). Высвобождаемые пептиды имеют размер 3–25 аминокислотных остатков.

Обозначения: Ub – убиквитин, (Ub)<sub>n</sub>-субстрат – полиубиквитинированный белок-субстрат, 26S PR – 26S изоформа протеасомы, 20S – 20S коровая протеасома (core proteasome, CP), 19S – 19S регуляторная частица (19S regulatory particle, RP).

## II. СТРОЕНИЕ ПРОТЕАСОМЫ

### 26S ПРОТЕАСОМА

Протеасома, осуществляющая Ub-зависимую деградацию белков, состоит из двух основных субкомплексов: коровой 20S протеасомы (20S CP, ~700 кДа) и активатора PA700 или 19S регуляторной частицы (19S RP, ~900 кДа). 20S CP содержит протеазные субъединицы, а 19S RP включает субъединицы, способные связывать полиUb цепи и субстрат, а также изопептидазы, отщепляющие Ub, и АТРазы, которые обеспечивают разворачивание субстрата и транслокацию его в канал коровой протеасомы [7]. 19S RP могут присоединяться к 20S CP с одного или обоих концов, в результате образуются 26S и 30S протеасомы соответственно. Однако термин «30S протеасома» практически не используется, а название «26S протеасома» принято для обозначения обеих изоформ. Помимо 19S RP, в состав 26S протеасомы могут входить альтернативные регуляторные частицы: PA28 $\alpha/\beta$  (или 11S REG), PA28 $\gamma$  (или REG $\gamma$ ), PA200, PI31 и др. (рис. 2). Встречаются асимметричные изоформы 26S протеасомы, содержащие разные регуляторные частицы на концах 20S CP. Кроме того, обнаружены изоформы протеасомы, в которых регуляторные частицы замещены мультисубъединичным белковым комплексом PC530 или COP9 сигнасомой [8]. Строение и функции субкомплексов протеасомы подробно рассмотрены ниже.

### КОРОВАЯ 20S ПРОТЕАСОМА

#### *Молекулярная структура*

20S протеасома прокариот и эукариот состоит из 28 субъединиц (табл. 1). У прокариот протеасома содержит 14 копий идентичных  $\alpha$ -субъединиц и 14 копий идентичных  $\beta$ -субъединиц (рис. 3). Протеасома эукариот содержит по 2 копии 7 разных  $\alpha$ -субъединиц и по 2 копии 7 разных  $\beta$ -субъединиц. Помимо конститутивной 20S протеасомы, у млекопитающих существует иммунопротеасома, сборка которой в клетке начинается после стимуляции ее  $\gamma$ -интерфероном. Этот цитокин запускает синтез трех дополнительных протеасомных субъединиц  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  и  $\beta 5i$ , которые во время сборки протеасомы встраиваются вместо конститутивно синтезируемых субъединиц  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$  [9–11]. Считается, что в отличие от конститутивной, иммунопротеасома генерирует пептиды, которые в последующем используются в презентации антигена [12–14].

Четвертичная структура 20S CP одинакова у бактерий, архей и эукариот, включая млекопитающих:  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы образуют по 2 гептамерных кольца, сложенных в виде стопки. Внешние кольца

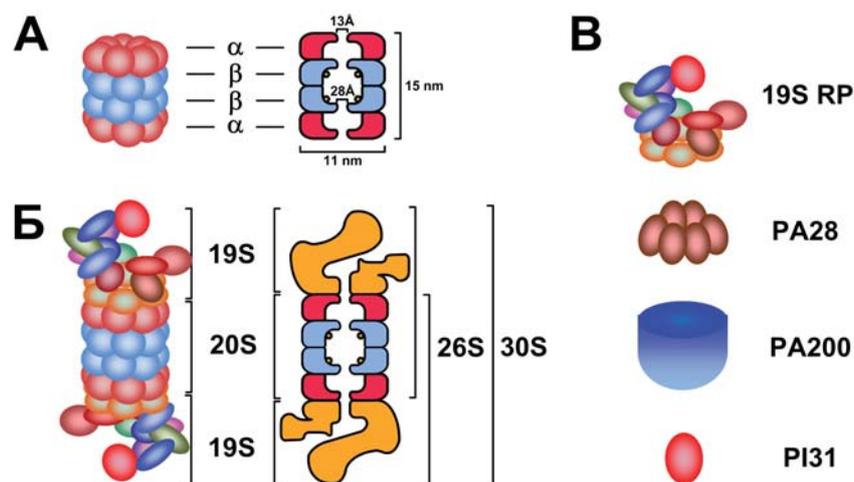


Рис. 2. Схематическое изображение строения 20S, 26S протеасомы и регуляторных частиц.

А. 20S протеасома (20S CP) представляет собой 700-кДа бочонок, состоящий из четырех уложенных в стопку колец. Она включает 28 субъединиц, которые являются продуктами двух групп гомологичных генов ( $\alpha$  и  $\beta$ ). Два внешних кольца состоят исключительно из  $\alpha$ -субъединиц, а два внутренних кольца – из  $\beta$ -субъединиц. Функции  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц различны:  $\alpha$ -субъединицы образуют физический барьер, ограничивающий доступ белков во внутреннюю протеолитическую полость,  $\beta$ -субъединицы отвечают за протеолитическую активность протеасомы (каталитические центры обозначены кружками). Помимо этого,  $\alpha$ -субъединицы взаимодействуют с регуляторными комплексами, которые влияют на функции 26S протеасомы. Пора, образуемая  $\alpha$ -субъединицами, открывается лишь при активации протеасомы и имеет диаметр 13 Å. (20S протеасома *Thermoplasma acidophilum* имеет размеры 148×113 Å, бычья 20S протеасома – 150×115 Å).

Б. К одному или обоим концам 20S CP присоединяется 19S регуляторная частица (19S RP), в результате образуются 26S и 30S протеасомы, соответственно. 19S RP могут замещаться альтернативными регуляторными частицами или другими мультисубъединичными белковыми комплексами.

В. Регуляторные комплексы. 19S RP – PA700 или 19S регуляторная частица. У млекопитающих она состоит из 18 основных субъединиц. PA28 – PA28 регуляторная частица. Существует две ее изоформы: PA28  $\alpha/\beta$  и PA28 $\gamma$ . PA28 $\alpha/\beta$  – это регулятор 11S REG, гетерогексамер, состоящий из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц. PA28 $\gamma$  – REG $\gamma$ , гексамер, состоящий из  $\gamma$ -субъединиц. PA200 – регулятор PA200. Состоит из одного 200-кДа белка асимметричной куполообразной формы. PI31 – регулятор PI31. Состоит из одного пролин-богатого 30-кДа белка.

Таблица 1.  
Номенклатура субъединиц 20S протеасомы

Субъединица	<i>T. acidophilum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Млекопитающие	
			Конститутивная 20S	Иммунопротеасома
$\alpha 1$	$\alpha$	Scl1/Prс2/Prs2/C7	PSMA6/Prоs27/Iota	PSMA6/PROS27/Iota
$\alpha 2$	$\alpha$	Pre8/Prs4/Y7	PSMA2/C3/Lmpс3	PSMA2/C3/Lmpс3
$\alpha 3$	$\alpha$	Pre9/Prs5/Y13	PSMA4/C9	PSMA4/C9
$\alpha 4$	$\alpha$	Pre6	PSMA7/C7/XAPC7	PSMA7/C7/XAPC7
$\alpha 5$	$\alpha$	Pup2/Doa5	PSMA5/Zeta	PSMA5/Zeta
$\alpha 6$	$\alpha$	Pre5	PSMA1/C2/Prоs30	PSMA1/C2/Prоs30
$\alpha 7$	$\alpha$	Pre10/Prс1/Prs1/C1	PSMA3/C8	PSMA3/C8
$\beta 1$	$\beta$	Pre3	PSMB6/Y/delta/LMPY/LMP19	<b>PSMB9/<math>\beta 1</math>i/LMP2/Ring12</b>
$\beta 2$	$\beta$	Pup1	PSMB7/Z/Mmc14	<b>PSMB10/<math>\beta 2</math>i/LMP10/MECL1</b>
$\beta 3$	$\beta$	Pup3	PSMB3/C10	PSMB3/C10
$\beta 4$	$\beta$	Pre1/C11	PSMB2/C7	PSMB2/C7
$\beta 5$	$\beta$	Pre2/Doa3/ Prg1	PSMB5/X/MB1	<b>PSMB8/<math>\beta 5</math>i/Ring10/Y2/C13/LMP7</b>
$\beta 6$	$\beta$	Pre7/Prs3/ Pts1/C5	PSMB1/C5	PSMB1/C5
$\beta 7$	$\beta$	Pre4	PSMB4/N3/beta/LMP3	PSMB4/N3/beta/LMP3

$\gamma$ -Интерферон-индуцируемые субъединицы иммунопротеасом выделены жирным шрифтом. Разные названия одной субъединицы приведены через «/».

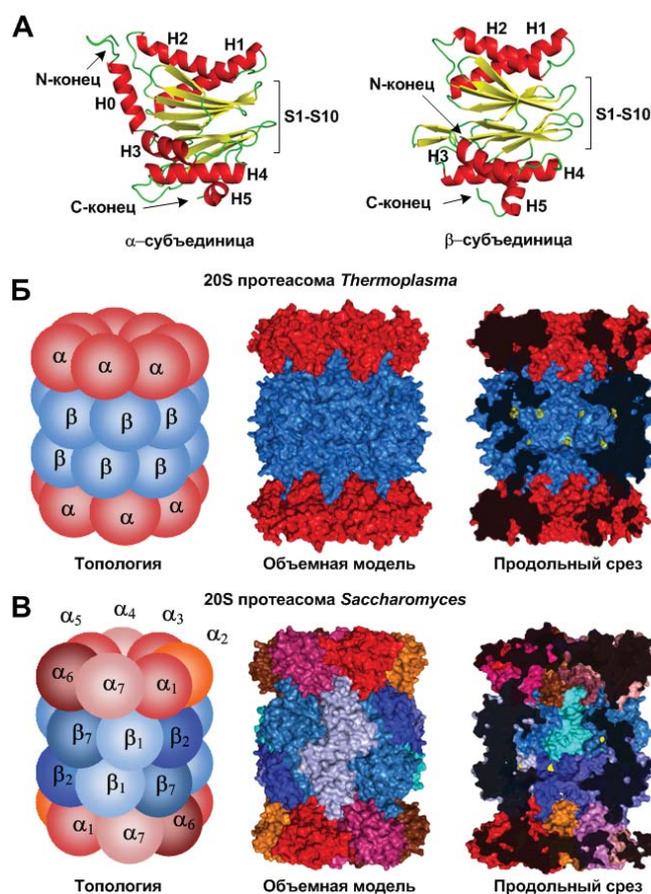


Рис. 3. Молекулярная организация 20S протеасомы.

А. Ленточная диаграмма α- и β-субъединиц протеасомы *Thermoplasma acidophilum*. Субъединицы представлены в одинаковой ориентации, демонстрирующей высокую пространственную гомологию. Основное отличие заключается в дополнительной N-концевой α-спирали (H0) у α-субъединицы.

Б. Топология и объемная модель протеасомы *Thermoplasma acidophilum*. Протеасома состоит из 14 копий идентичных α-субъединиц и 14 копий идентичных β-субъединиц. На продольном срезе желтым цветом выделены остатки треонина в каталитических центрах. В данной проекции их видно 7 из 14.

В. Топология и объемная модель протеасомы *Saccharomyces cerevisiae*. Протеасома состоит из 2 копий 7 разных α-субъединиц и 2 копий 7 разных β-субъединиц. На продольном срезе желтым цветом выделены остатки треонина в каталитических центрах. В данной проекции их видно 3 из 6.

Рисунки сделаны в программе PyMOL с использованием наборов данных PDB 1PMA, 1JD2, 1GOU.

содержат только  $\alpha$ -субъединицы, а внутренние два кольца – только  $\beta$ -субъединицы [15]. Пространственная структура всех протеасомных субъединиц одинакова, что следует из высокой гомологии аминокислотной последовательности  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц. Пространственная укладка субъединиц представляет собой два антипараллельных пятипятевых  $\beta$ -листа (S1-S10), которые лежат между двумя  $\alpha$ -спиралями с одной стороны (H1, H2) и тремя  $\alpha$ -спиралями с другой стороны (H3, H4, H5). Основное отличие между  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами заключается в наличии у  $\alpha$ -субъединицы дополнительной N-концевой  $\alpha$ -спирали (H0, 35 а.о.) (рис. 3А).

Внутреннее пространство протеасомы разделено на три компартмента: две внешние полости («antechamber») и одна внутренняя протеолитическая полость. Объем внешней полости 20S протеасомы *Thermoplasma acidophilum*  $\sim 59$  нм<sup>3</sup>, объем внутренней протеолитической полости  $\sim 84$  нм<sup>3</sup>, и в ней легко может поместиться глобулярный  $\sim 70$ -кДа белок [16]. Расстояние от внешней границы поры до каталитических центров составляет  $\sim 70$  Å, что соответствует длине развернутого пептида, состоящего примерно из 20 а.о.

Протеасому относят к классу N-концевых нуклеофильных гидролаз (NTN hydrolase). N-концевой треонин  $\beta$ -субъединиц важен для катализа, и его замена на серин приводит к снижению эффективности гидролиза [17]. У прокариот все 14  $\beta$ -субъединиц идентичны и, следовательно, протеасома содержит 14 протеазных центров (рис. 3Б). У эукариот три из семи  $\beta$ -субъединиц имеют треонин-протеазные каталитические центры разной субстратной специфичности, то есть каждая протеасома имеет 6 протеазных центров (рис. 3В). Известно, что субъединица  $\beta 1$  обладает каспазоподобной активностью (гидролизует пептидную связь после отрицательно заряженных а.о.), субъединица  $\beta 2$  – трипсиноподобной активностью, то есть гидролизует пептидную связь преимущественно после положительно заряженных а.о., тогда как  $\beta 5$  – химотрипсиноподобной активностью, то есть гидролизует пептидную связь после объемных гидрофобных а.о. [18, 19].

Все протеиназные центры обращены во внутреннюю протеолитическую полость, образованную  $\beta$ -субъединицами, доступ субстрата к ним возможен через пору, сформированную  $\alpha$ -субъединицами (рис. 3) [20, 21]. Помимо трех основных типов протеиназных центров, было заявлено о существовании еще двух: (i) гидролизующего пептидную связь после разветвленных а.о. (branched chain amino acids peptidase, BcAAP) и (ii) гидролизующего пептидную связь после маленьких нейтральных а.о. (small neutral amino acids peptidase, SNAAP) [22]. Однако последующие исследования не подтвердили этот вывод [23]. Недавно

на основании структурных данных было выдвинуто предположение о существовании каталитического центра SNAAP на субъединице  $\beta 7$ , но экспериментальных доказательств или опровержений пока нет [24].

Транслокация субстрата в протеолитическую полость происходит через пору, образуемую  $\alpha$ -субъединицами. У протеасомы *T. acidophilum* диаметр поры составляет  $\sim 13$  Å. К сожалению, в имеющейся структуре не видно 12 N-концевых остатков  $\alpha$ -субъединиц, которые обращены в сторону поры (рис. 4) [25]. Этот участок не имеет фиксированной структуры и не закрывает канал в протеолитическую полость. 20S протеасома *T. acidophilum* активна в расщеплении пептидов, однако в этом случае для расщепления белков необходим АТФ-зависимый активатор PAN [26, 27]. У эукариот доступ субстрата в протеолитическую полость ограничен: пора открывается лишь при активации протеасомы (рис. 4). Из размера поры следует, что через нее могут проходить лишь  $\alpha$ -спирали с небольшими боковыми цепями или  $\beta$ -шпильки, то есть пептиды или развернутые белки [20, 28]. Однако экспериментальные данные свидетельствуют в пользу того, что пора может расширяться до 20 Å, и это позволяет проходить одновременно трем развернутым полипептидным цепям [29].

#### Открытие канала 20S CP

Активация АТФ-зависимых протеаз часто связана с аллостерической регуляцией их протеолитических центров. В случае эукариотической 20S протеасомы нет структурных доказательств существования такой регуляции. Поэтому активацию протеасомы связывают с открытием поры в 20S CP, которое обеспечивает доступ субстрата к каталитическим центрам. Существующая модель механизма открытия поры основана на данных о конформационных перестройках в N-концевых участках  $\alpha$ -субъединиц, формирующих пору [30–33]. Такие изменения в конформации могут происходить (i) при взаимодействии с регуляторными частицами [34–36], (ii) при взаимодействии с субстратом [37, 38], (iii) при обработке небольшими концентрациями SDS, полилизина и т.д. [15, 39].

Основная роль в открытии поры отводится субъединице  $\alpha 3$ , точнее, ее N-концевым остаткам. N-конец субъединицы  $\alpha 3$  уникален по своей укладке: если сравнить с N-концами остальных  $\alpha$ -субъединиц, он наиболее сильно выступает в канал, пересекая ось псевдосемилучевой симметрии, и образует контакты с каждой из  $\alpha$ -субъединиц [30] (рис. 4Б). Удаление девяти N-концевых остатков субъединицы  $\alpha 3$  протеасомы *Saccharomyces cerevisiae* (далее такая

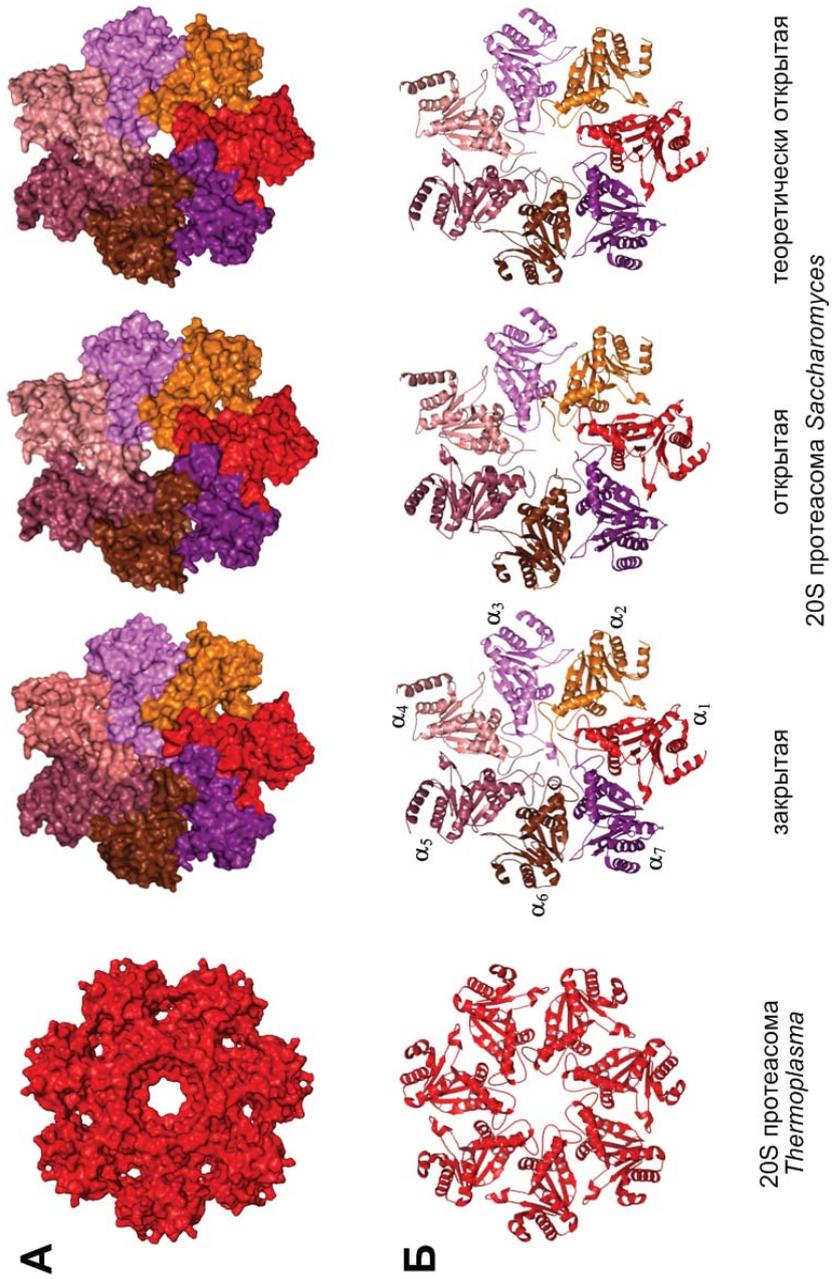


Рис. 4. Подпись к рис. дана на стр. 13.

Рис. 4. Пора 20S протеасомы.

А. Объемная модель кольца  $\alpha$ -субъединиц 20S протеасомы, вид сверху. У протеасомы *Thermoplasma acidophilum* 12 N-концевых остатков  $\alpha$ -субъединиц не упорядочены и не представлены на данной структуре (они должны быть обращены в сторону поры). Пространственная структура «закрытой», «открытой» и «теоретически открытой» конформации протеасомы *Saccharomyces cerevisiae*. «Закрытая» конформация соответствует конформации латентной протеасомы дикого типа. «Открытая» конформация соответствует конформации  $\alpha 3\Delta N$  протеасомы (протеасома без 9 N-концевых остатков у  $\alpha 3$ -субъединицы). «Теоретически открытая» конформация получена из пространственной структуры «закрытой» конформации удалением 9 N-концевых остатков у каждой  $\alpha$ -субъединицы.

Б. Ленточная модель  $\alpha$ -субъединиц 20S протеасомы, вид сверху. Топология  $\alpha$ -субъединиц 20S протеасомы *Saccharomyces cerevisiae* показана на «закрытой» конформации.

Рисунки сделаны в программе PyMOL с использованием наборов данных PDB 1PMA, 1JD2, 1G0U.

мутантная протеасома будет называться  $\alpha 3\Delta N$ ) приводит к тому, что укладка N-концов остальных  $\alpha$ -субъединиц дестабилизируется, и открывается пора, диаметр которой сопоставим с диаметром поры протеасомы *T. acidophilum* [20] или «теоретически открытой» протеасомы *S. cerevisiae* (на структурной модели удалены девять N-концевых остатков у всех  $\alpha$ -субъединиц) (рис. 4Б). Этого оказывается достаточно, чтобы протеасома стала активной в расщеплении коротких пептидов, но не белков, для разворачивания которых необходима регуляторная частица. Такая же N-концевая делеция в субъединице  $\alpha 7$  ( $\alpha 7\Delta N$ ) не приводит к существенному усилению пептидазной активности протеасомы, то есть не вызывает больших перестроек в укладке остатков, формирующих пору, и не приводит к ее открытию [40]. Показано, что мутация  $\alpha 3\Delta N$  не влияет на стабильность 26S протеасомы. Более того, пептидазная активность  $\alpha 3\Delta N$  26S протеасомы не сильно отличается от активности 26S протеасомы дикого типа [7]. Это позволяет предположить, что присоединение 19S RP к 20S CP приводит к изменениям в структуре поры, сходным с изменениями при мутации  $\alpha 3\Delta N$ . То есть, помимо участия в узнавании, разворачивании и транслокации субстрата, 19S RP работает как «открыватель» канала. Роль регуляторных частиц в функционировании протеасомы будет подробно описана ниже.

#### Сборка 20S протеасомы

*E. coli* лишена протеасомы, поэтому является идеальной системой для экспрессии протеасомных субъединиц и изучения сборки протеа-

сомы. Одновременная экспрессия  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц протеасомы *T. acidophilum* в *E. coli* приводит к сборке в ней активной протеасомы. Если экспрессировать  $\alpha$ -субъединицы без  $\beta$ -субъединиц, то они способны формировать одиночные или спаренные гептамерные кольца. За объединение  $\alpha$ -субъединиц в кольца отвечает N-концевая  $\alpha$ -спираль (H0, 35 а.о.). Показано, что  $\alpha$ -субъединицы, лишённые этой спирали, не способны собираться в кольца [41]. В отличие от  $\alpha$ -субъединиц,  $\beta$ -субъединицы не способны самостоятельно формировать кольца, остаются в мономерном виде и протеолитически неактивны. По всей видимости,  $\beta$ -субъединицы собираются в кольца на  $\alpha$ -субъединичных кольцах, формируя «полупротеасому». Из двух таких «полупротеасом» собирается пре-20S протеасома. Зрелая 20S протеасома получается при отщеплении N-концевого пропептида (8 остатков) от каждой из  $\beta$ -субъединиц. Однако, пропептид не обязателен для сборки 20S протеасомы: она может собираться из смеси  $\alpha$ - и процессированных  $\beta$ -субъединиц [42, 43] (рис. 5).

Процесс сборки эукариотической протеасомы сложнее и менее изучен. Как и в случае протеасомы *T. acidophilum*, для сборки эукариотической протеасомы необходимы H0  $\alpha$ -спирали  $\alpha$ -субъединиц [44]. Известно, что субъединица  $\alpha 7$  протеасомы человека при экспрессии в *E. coli* так же, как и  $\alpha$ -субъединица протеасомы *T. acidophilum*, способна формировать двойные кольцевидные структуры [45]. Соседние субъединицы –  $\alpha 1$  и  $\alpha 6$  – не образуют кольца при их индивидуальной экспрессии в *E. coli*, однако включаются в кольцевидные структуры при экспрессии одновременно с субъединицей  $\alpha 7$ . При этом взаимное расположение субъединиц в таких кольцах весьма разнообразно. Это говорит о том, что не каждая из  $\alpha$ -субъединиц «обладает» информацией об их положении в кольце [46].

Изучение интермедиатов сборки эукариотической протеасомы затруднено тем, что они очень нестабильны и гетерогенны. Сложность привносит и участие в созревании протеасомы нескольких специфических шаперонов [47]. Сборка протеасомы *S. cerevisiae* начинается с образования кольца из  $\alpha$ -субъединиц ( $\alpha$ -кольца) с участием гетеродимера Pba1–Pba2 (у *S. cerevisiae*) или PAC1–PAC2 (у млекопитающих). Эти шапероны взаимодействуют с интермедиатом, который содержит все  $\alpha$ -субъединицы, кроме  $\alpha 3$  и  $\alpha 4$  [48–50]. Pba1–Pba2/PAC1–PAC2 присоединяются к внешней стороне  $\alpha$ -кольца (обращённой к регуляторным частицам) и предотвращают последующую сборку протеасомы из незрелых интермедиатов. Шапероны остаются присоединёнными к  $\alpha$ -кольцам до полной сборки 20S CP, после чего они, вероятно, деградируют под действием

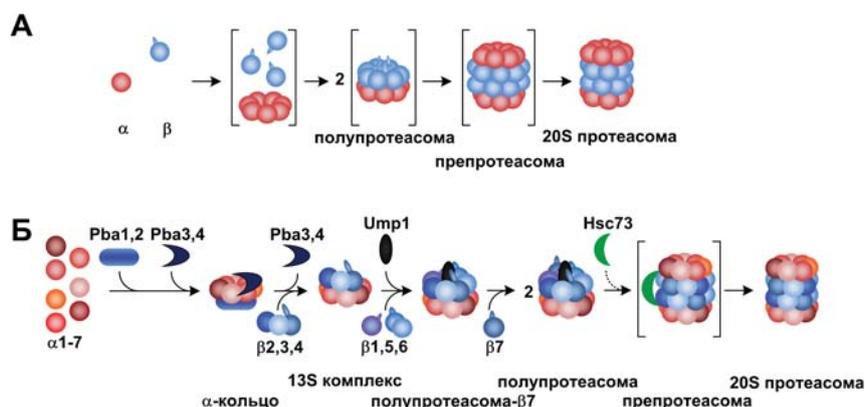


Рис. 5. Модель сборки 20S протеасомы.

А. Схема сборки протеасомы археона *Thermoplasma acidophilum*.

Б. Схема сборки эукариотической протеасомы. В скобках изображены интермедиаты, которые нестабильны и не могут быть обнаружены *in vivo*. Детали см. в тексте.

протеасомы либо удаляются 19S RP или другими регуляторными частицами [48]. Правильная сборка  $\alpha$ -кольца завершается при участии другой пары шаперонов – Pba3–Pba4/PAC3–PAC3 [51–53]. При отсутствии этих шаперонов субъединица  $\alpha$ 4 встраивается в  $\alpha$ -кольцо на место субъединицы  $\alpha$ 3, что существенно снижает эффективность сборки всей протеасомы [51]. Димер Pba3–Pba4/PAC3–PAC3 остается связанным с внутренней стороной  $\alpha$ -кольца (обращенной к  $\beta$ -кольцу) [53] до присоединения субъединиц  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 и  $\beta$ 4. Этот интермедиат, включающий  $\alpha$ -кольцо, субъединицы  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4 и Pba1–Pba2/PAC1–PAC2, носит название «13S комплекс» [10, 54]. Он не способен образовывать димеры. Вероятно, это связано с тем, что в данном случае из субъединиц  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 и  $\beta$ 4 только  $\beta$ 4 может быть вовлечена в образование контактов. Особенностью сборки иммунопротеасомы является то, что на стадии «13S комплекса», помимо  $\beta$ 2i,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4, присоединяется еще субъединица  $\beta$ 1i [10].

При участии фактора созревания протеасомы Ump1 (*underpinning maturation of proteasome*) к этому комплексу присоединяются субъединицы  $\beta$ 1,  $\beta$ 5 и  $\beta$ 6. В результате формируется «преполупротеасома» (или «полупротеасома минус  $\beta$ 7») [50, 55, 56]. После присоединения субъединицы  $\beta$ 7 образуется «15S полупротеасома» или «полупротеасома». Лишь после этого возможна димеризация полупротеасом, т.е. сборка «препроотеасомы» (или незрелой 20S протеасомы) [56]. Именно субъединица  $\beta$ 7 играет ключевую роль в димеризации: ее удлиненный

С-конец встраивается в канал между субъединицами  $\beta 1$  и  $\beta 2$  другой полупротеасомы, что приводит к прочному сцеплению двух полупротеасом. Удаление С-конца субъединицы  $\beta 7$  значительно снижает эффективность сборки препротеасомы. Помимо этого, С-конец субъединицы  $\beta 7$  стабилизирует конформацию субъединицы  $\beta 1$ , что необходимо для процессинга этой каталитической субъединицы [56, 57].

Препротеасома млекопитающих, собранная *in vitro*, описывается как 650-кДа комплекс с коэффициентом седиментации 16S. В ее составе был обнаружен шаперон Hsc73. Показано, что при инкубации препротеасомы с АТФ происходит диссоциация Hsc73 и образуется более высокомолекулярный комплекс. Однако, процессинг пропептидов  $\beta$ -субъединиц при этом не наблюдается. Вероятно, для окончательного созревания необходимы дополнительные факторы [54].

Как для сборки препротеасомы, так и для ее созревания (отщепления пропептидов  $\beta$ -субъединиц) необходим фактор Ump1. Пять из семи  $\beta$ -субъединиц ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$  и  $\beta 7$ ) имеют N-концевые пропептиды. Они не консервативны по последовательности и сильно отличаются по длине. Их удаление не влияет на правильность расположения  $\beta$ -субъединиц в протеасоме [58, 59]. Однако они необходимы для сворачивания  $\beta$ -субъединиц и более эффективного встраивания их в протеасому, то есть выполняют шаперон-подобную функцию. Лишь удаление пропептида субъединицы  $\beta 5$  является летальным [60]. Этот пропептид не важен для встраивания самой субъединицы  $\beta 5$  в протеасому – протеасома собирается и с процессированной субъединицей  $\beta 5$  [55]. Однако лишь в присутствии непроецессированной субъединицы  $\beta 5$  фактор Ump1 имеет правильную позицию в полупротеасоме, которая необходима для процессинга всех  $\beta$ -субъединиц в препротеасоме [61]. Сам фактор Ump1 деградирует во время отщепления пропептидов  $\beta$ -субъединиц: его не обнаруживают ни в зрелой 20S протеасоме, ни в 26S протеасоме. Наконец, в окончательном созревании 20S CP участвует регуляторная частица PA200/Vlm10 [56, 62].

#### 19S РЕГУЛЯТОРНАЯ ЧАСТИЦА

19S регуляторная частица (19S RP) является основным регуляторным компонентом 26S протеасомы. Она отвечает за узнавание полиубиквитинированных белков и, таким образом, обеспечивает селективность деградации субстрата. 19S RP вовлечена в открытие поры 20S CP, разворачивание субстрата и продвижение его в протеолитическую полость. 19S RP может присоединяться к 20S CP с одного или обоих концов, формируя, соответственно,  $RP_1$ CP- и  $RP_2$ CP-изоформы 26S протеа-

сомы. У *S. cerevisiae* протеасома находится преимущественно в комплексе с двумя 19S RP (RP<sub>2</sub>CP-изоформа) [63]; у млекопитающих соотношение 19S RP и 20S CP ниже, поэтому в клетках достаточно много свободных 20S CP, а также RP<sub>1</sub>CP-изоформы 26S протеасомы [64].

#### Молекулярная структура 19S RP

19S RP, выделенные из разных организмов, имеют сходный субъединичный состав и состоят, по крайней мере, из 17 коровых субъединиц. Шесть субъединиц являются АТРазами AAA-суперсемейства, члены которого входят в состав многих мультисубъединичных комплексов, таких как транслокаторы, транспортеры и протеазы [65, 66]. Эти субъединицы регуляторной частицы являются гомологичными и обозначаются как Rpt (Regulatory particle tripleA-ATPase). Остальные субъединицы обозначаются как Rpn (Regulatory particle non-ATPase) (табл. 2). Шесть Rpt-субъединиц и три Rpn-субъединицы (Rpn1, Rpn2, Rpn10) формируют основание 19S RP; субъединицы Rpn3, 5, 6, 7, 8, 9, 11 и 12 образуют крышку 19S RP (рис. 6). У *S. cerevisiae* в состав основания входит еще субъединица Rpn13 [67], а у млекопитающих – S5b [68]. В некоторых изоформах 26S PR млекопитающих в составе 19S RP обнаруживается субъединица hRpn13 [69]. Помимо 8 основных субъединиц крышки (Rpn3, 5, 6, 7, 8, 9, 11 и 12), иногда выделяют лабильно или временно ассоциированные субъединицы p28/gankyrin, p27 и Sem1/Rpn15 [70–72], а у *S. cerevisiae* еще и субъединицу Son1/Rpn4 [73].

Рентгеноструктурные исследования 19S RP затруднены вследствие очень высокой подвижности комплекса и гетерогенного набора субъединиц, часть которых связана довольно слабо [74]. Трехмерная структура 19S RP низкого разрешения получена с использованием электронной микроскопии (рис. 6А) [75, 76]. Биохимическими методами у 26S PR *Caenorhabditis elegans* было установлено 20 межсубъединичных контактов [77], 40 – у 26S PR *S. cerevisiae* [30, 74, 78–83] и 114 межсубъединичных контактов – у 26S PR человека [84]. Пространственная структура известна лишь для субъединиц Rpn13 и S5a. Согласно компьютерному моделированию структуры, субъединицы Rpn1 и Rpn2 имеют укладку  $\alpha$ -спирального тороида [85, 86]. Rpn1 и Rpn2 уложены в стопку и окружены кольцом из шести Rpt-субъединиц [87]. К основанию, по-видимому, присоединяются еще вспомогательные Ub-связывающие белки. Упрощенная топология коровых субъединиц 19S RP представлена на рис. 6Б.

Таблица 2.  
**Номенклатура субъединиц  
 19S регуляторной частицы протеасомы**

Субъединица	<i>S. cerevisiae</i>	Млекопитающие
АТРазы		
Rpt1/S7	Rpt1/Cim5/Yta3	PSMC2/Mss1
Rpt2/S4	Rpt2/Yhs4/Yta5	PSMC1
Rpt3/S6b	Rpt3/Ynt1/Yta2	PSMC4/Mip224/Tbp7
Rpt4/S10b	Rpt4/Crl13/Pcs1/Sug2	PSMC6/Sug2/p42
Rpt5/S6a	Rpt5/Yta1	PSMC3/Tbp1
Rpt6/S8	Rpt6/Cim3/Crl3/Sug1/TbpY/Tby1	PSMC5/p45/Sug1/Trip1
не АТРазы		
Rpn1/S2	Rpn1/Hrd2/Nas1/Rpd1	PSMD2/p97/Trap2
Rpn2/S1	Rpn2/Sen3	PSMD1/p112
Rpn3/S3	Rpn3/Sun2	PSMD3/p58
Rpn4	Rpn4/Son1/Ufd5	-
Rpn5/p55	Rpn5/Nas5	PSMD12/p55
Rpn6/S9	Rpn6/Nas4	PSMD11/p44.5
Rpn7/S10	Rpn7	PSMD6/p42a
Rpn8/S12	Rpn8	PSMD7/p40/Mov34
Rpn9/S11	Rpn9/Nas7	PSMD13/p40.5
Rpn10/S5a	Rpn10/Sun1/Mcb1	PSMD4/ S5a/Mcb1
S5b	-	PSMD5/KIAA0072
Rpn11/S13	Rpn11/Mpr1	PSMD14/Pad1/Poh1
Rpn12/S14	Rpn12/Nin1	PSMD8/p31
Rpn13	Rpn13/Daq1	-
p28	Nas6	PSMD10/p28/Gankyrin
p27	Nas2	PSMD9/p27
Rpn15/Sem1	Rpn15/Sem1/Dsh1	SHFM1/DSS1/SHFDG1

Разные названия одной субъединицы приведены через «/».

#### Функции 19S RP

**Связывание с 20S CP и открытие поры.** Основная роль во взаимодействии 19S RP с 20S CP и открытии поры отводится С-концевым пептидам субъединиц Rpt2 и Rpt5 [20, 88–90]. Считается, что присоединение 19S RP к 20S CP сопровождается конформационными перестройками в N-концевых участках  $\alpha$ -субъединиц, приводящими к

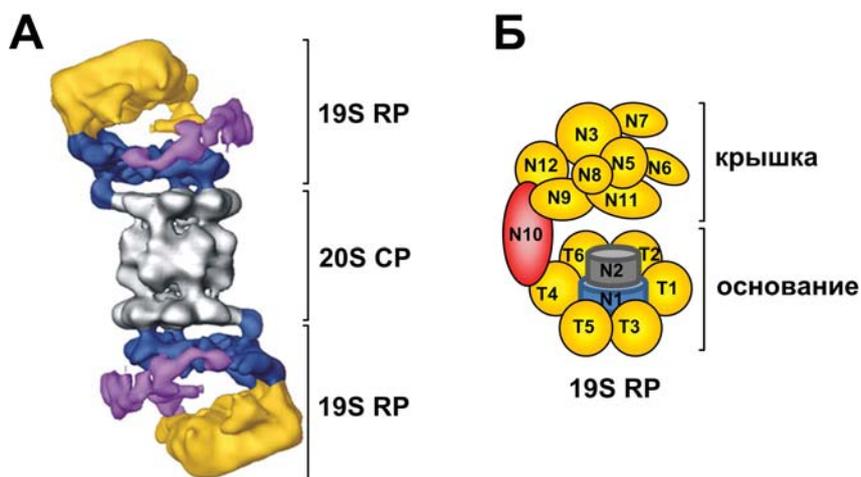


Рис. 6. Молекулярная организация 19S регуляторной частицы.

А. Объемная модель 19S RP низкого разрешения получена с использованием электронной микроскопии. В 19S RP разными цветами выделены субъединицы основания, руки основания и крышки. Рисунок с изменениями из [76].

Б. Топология субъединиц 19S RP. Детали см. в тексте.

изменениям в структуре поры – ее переводу в открытую конформацию. Для связывания 19S RP с 20S CP и открытия поры необходим гидролиз АТФ [91]. Согласно последним данным, в открытии поры, помимо Rpt2 и Rpt5, принимают участие субъединицы Rpn1 и Rpn2 [92].

**Узнавание убиквитина.** Основной субъединицей 19S RP, которая обеспечивает узнавание полиубиквитинированного субстрата, является Rpn10 [93]. Rpn10 связывается с Ub благодаря наличию Ub-связывающего сайта в С-концевом гидрофобном кластере, содержащем мотив LALAL [94]. Изолированная субъединица Rpn10 с одинаковой эффективностью связывает разные формы полиUb, в которых отдельные молекулы Ub соединены через Lys-6, Lys-11 или Lys-48, тогда как целая 26S PR связывает лишь «правильный» полимерный Ub, сшитый через Lys-48 [95]. Это свидетельствует о существовании механизмов, обеспечивающих не только эффективное, но и правильное связывание субстрата. Вероятно, корректное узнавание четвертичной структуры полиUb цепи и специфичность связывания субстрата обуславливают вспомогательные лабильно ассоциированные белки, такие как Rad23 (hHR23a, hHR23b) и Dsk2 (hPLIC) [96–98]. Опыты на *S. cerevisiae* по удалению Ub-связывающего сайта у Rpn10 показали,

что фенотипически такие мутанты не отличаются от дикого типа [96]. Это свидетельствует о том, что Rpn10 – не единственная субъединица протеасомы, способная связывать убиквитиновую цепь. По-видимому, в связывание полиубиквитинированного субстрата вовлечены также субъединицы Rpn1, Rpn2, Rpn13 и Rpt5 [77, 79, 99, 100].

**Связывание субстрата.** Основная роль в этом процессе отводится субъединицам основания 19S RP. Благодаря имеющимся лейцин-богатым повторам (LRR), субъединицы Rpn1 и Rpn2 способны эффективно вступать в неспецифичные белок-белковые взаимодействия [101]. Rpt-субъединицы, по аналогии с регуляторными доменами простых АТР-зависимых протеаз, тоже могут напрямую связываться с субстратами и, таким образом, удерживать субстрат на протеасоме [102, 103]. Такое удержание субстрата основанием 19S RP необходимо, по-видимому, для его разворачивания и правильной ориентации для транслокации в канал 20S PR. При неправильной ориентации Ub, конъюгированный с субстратом, не позволит субстрату пройти в канал.

**Разворачивание и транслокация.** АТР необходим не только для сборки 26S протеасомы, но и для деградации субстрата [104]. Гидролиз АТР требуется для конформационных перестроек субъединиц протеасомы, которые происходят при разворачивании субстрата и, вероятно, для транслокации его в протеолитическую полость 20S CP. Разворачивание субстрата абсолютно необходимо, поскольку размер поры 20S CP слишком мал, чтобы через нее смог пройти белок с развинутой третичной структурой.

Предполагается, что связывание и гидролиз АТР на Rpt-субъединицах запускает цикл высоко- и низкоаффинного состояний протеасомы по отношению к субстрату, что необходимо для удержания субстрата в развернутой форме [88]. Механизм транслокации остается невыясненным, но считается, что разворачивание субстрата механически тесно связано с транслокацией развернутой части субстрата через пору в протеолитическую полость 20S CP. Эксперименты с протеасомой архей и PAN (proteasome-activating nucleotidase, – аналогом эукариотической 19S RP) показали, что транслокация субстратов АТР-зависима [31].

**Деубиквитинирование.** Во время деградации субстрата или сразу после нее присоединенный к субстрату Ub отсоединяется. Гидролиз изопептидной связи между субстратом и молекулой Ub катализируется  $Zn^{2+}$ -зависимой металлопептидазной активностью субъединицы Rpn11 крышки 19S RP. Эта реакция АТР-зависима [105]. Некоторые ассоциированные с протеасомой ферменты –

Ubp6 (ubiquitin-binding protein 6) и UCH37 (ubiquitin C-terminal hydrolase 37) – могут выполнять сходную или дополняющую функцию, например, деубиквитинировать конъюгаты определенных белков для предотвращения их деградации или деполимеризовывать отщепленный от субстрата Ub для восполнения пула свободного Ub [106-108]. Doa4 – еще один деубиквитинирующий фермент (в отличие от Ubp6 и UCH37 связанный менее прочно с 26S PR) также играет важную роль в реутилизации Ub [109].

#### Сборка 19S RP и 26S PR

В экспериментах *in vitro* 26S протеасома может диссоциировать на 19S RP и 20S CP и вновь ассоциировать с затратой АТФ [110, 111]. Однако остается загадкой, как именно происходит сборка 19S регуляторной частицы. Одной из причин этого является неполная картина строения самой 19S RP и ее гетерогенность по набору субъединиц. Существует два возможных варианта сборки: (1) 19S RP собирается из индивидуальных субъединиц отдельно от 20S CP и лишь затем присоединяется к 20S CP или (2) – 19S RP собирается на 20S CP. В пользу сборки 19S RP на 20S CP свидетельствует тот факт, что центральная часть основания 19S RP, состоящая из Rpn1 и Rpn2, может присоединяться к поверхности  $\alpha$ -кольца 20S CP и, таким образом, выступать в роли «зародыша» сборки 19S RP [92]. На этом «зародыше» собираются остальные субъединицы основания, однако такой комплекс (20S CP/основание 19S RP) является очень нестабильным [112]. На следующем этапе происходит присоединение крышки 19S RP, и образуется зрелая 26S PR с полностью сформированной 19S RP. Считается, что крышка 19S RP собирается независимо от основания. Это подтверждается тем, что в клетках обнаруживаются два типа стабильных интермедиатов сборки крышки: (1) – зародыш из Rpn5, Rpn8, Rpn9 и Rpn11 (крышка<sup>rpn6-1</sup>) или (2) – из Rpn5, Rpn6, Rpn8, Rpn9 и Rpn11 (крышка<sup>rpn7-3</sup>) [82, 113]. Все эксперименты по изучению сборки 19S RP проводились на мутантных линиях *S. cerevisiae*. Обнаружить интермедиаты сборки в клетках дикого типа не удается, вероятно, из-за того, что сборка 19S RP в клетке происходит очень быстро [112].

Как уже отмечалось выше, в экспериментах *in vitro* 26S протеасома может диссоциировать на 19S RP и 20S CP и ассоциировать вновь. Оказалось, что *in vivo* 26S протеасома может собираться как *de novo*, так и, по аналогии с экспериментами *in vitro*, из 20S CP и уже собранной 19S RP [114–116]. Согласно экспериментальным данным, в клетке существует динамическое равновесие между 20S CP и 26S PR, которое может смещаться в зависимости от клеточных условий [40].

В комплексе с 26S PR обнаруживают большое количество дополнительных белков, среди которых много шаперонов [117–119]. Вероятно, как и в случае 20S CP, они могут принимать участие в сборке 26S PR. Такое разнообразие белков отражает, в первую очередь, динамичность протеасомного комплекса, особенности внутриклеточного распределения или субстратной специфичности. Лишь для некоторых из этих белков подтверждено участие в сборке протеасомы. Шаперон Hsp90, один из таких белков, необходим не только для сборки 26S PR, но и для поддержания протеасомы в стабильном состоянии. Так, при инактивации этого белка в клетке 26S PR диссоциирует на 19S RP и 20S CP [120]. В растущих клетках в сборке 26S PR и в транспорте 20S CP в ядро принимает участие ядерный белок Nod1 [121].

#### АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ АТР-НЕЗАВИСИМЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЧАСТИЦЫ

Эукариотические клетки, помимо 19S RP (PA700), содержат множество белков, которые могут взаимодействовать с  $\alpha$ -кольцами 20S CP, формируя альтернативные формы протеасомы (см. рис. 2). Многие из этих белков влияют на протеолитическую активность протеасомы, но физиологические функции таких альтернативных комплексов пока не ясны [122]. В отличие от 19S RP, эти альтернативные регуляторы не являются АТРазами и не связывают полиUb цепи, то есть регулируют Ub-независимую деградацию субстратов протеасомой.

**PA28.** Семейство регуляторов PA28, обнаруженное у млекопитающих и у некоторых других видов эукариот (но не у дрожжей), состоит из двух родственных комплексов – PA28 $\alpha/\beta$  (или 11S REG) и PA28 $\gamma$  (или REG $\gamma$ ). Первый из них активировывает пептидазную активность 20S CP, увеличивая эффективность гидролиза некоторых пептидов в 100 раз, но не оказывает никакого влияния на деградацию свернутых белков [91, 123, 124].

PA28 $\alpha/\beta$  – гетерогептамер, состоящий из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, формирующих кольцо, которое присоединяется к одному или обоим концам 20S CP. Содержание  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц (и, соответственно, PA28 $\alpha/\beta$ ) повышается в клетках в ответ на стимуляцию  $\gamma$ -интерфероном [36, 125]. У эукариот обнаруживается также родственный комплекс PA28 $\gamma$  (или K1 антиген, или REG $\gamma$ ), который представляет собой гомогептамер. Молекулярные особенности взаимодействия регулятора PA28 с 20S CP и механизм активации протеолитической активности протеасомы были изучены на гомологе PA28 из *Trypanosoma brucei* – PA26. При связывании гомогептамера PA26 со спиральями H0 и H1  $\alpha$ -субъединиц 20S CP происходит перестройка N-концевых участков  $\alpha$ -субъединиц,

закрывающих канал: они втягиваются в центральную полость PA26 и открывают пору 20S CP [126]. Эти структурные перестройки в области поры  $\alpha$ -кольца и обуславливают увеличение пептидазной активности протеасомы в отношении пептидов за счет облегчения их проникновения в протеолитическую полость 20S CP.

**PA200 (или Blm10, или Blm3).** Регулятор PA200 состоит из одного 200-кДа белка асимметричной куполообразной формы, который присоединяется к одному или обоим концам 20S CP [127]. В экспериментах *in vitro* показано, что PA200 активирует гидролиз коротких пептидов, но не свернутых белков [128, 129]. Как уже отмечалось выше, PA200 принимает участие в созревании 20S CP [56, 62]. Одной из его возможных функций является вовлечение протеасомы в ферментативные комплексы, участвующие в репарации ДНК – PA200 служит своеобразным линкером между 26S протеасомой и белками, узнающими поврежденные участки ДНК. Благодаря этому, протеасома привлекается к поврежденным участкам ДНК и разрушает там белки хроматина, тем самым обнажая поврежденную ДНК для ферментов репарации [127].

**Escm29.** Escm29 – это 200-кДа белок, являющийся мажорным среди белков, обнаруживаемых в комплексе с 26S PR у *S. cerevisiae*. Показано, что *in vitro* он взаимодействует как с 19S RP, так и с 20S CP и выступает при этом как стабилизатор 26S PR. При удалении этого белка 26S PR *S. cerevisiae* может диссоциировать на 19S RP и 20S CP АТФ-независимо [117]. У млекопитающих Escm29 не удается обнаружить в комплексе с 20S CP. Интересно, что его содержание в органах сильно варьирует: при высоком содержании в мозге, семенниках, легких, он практически отсутствует в печени, почках, сердце и поджелудочной железе [130]. Считается, что Escm29 выступает в роли адаптера, благодаря которому 26S протеасома локализуется на эндосомах, центросомах и эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), то есть, внутриклеточных компартментах, где наблюдается высокий уровень Ub-независимой деградации белков [130].

**PI31.** PI31 – это пролин-богатый 30-кДа белок. Он конкурирует с другими регуляторами (PA28, PA200) за связывание с 20S CP, то есть, связывается с  $\alpha$ -кольцами 20S CP. В отличие от них, он не способен образовывать стабильного комплекса с протеасомой и, вероятно, модулирует функции протеасомы лишь в определенных моменты [131]. Показано, что *in vitro* PI31 ингибирует химотрипсин- и каспазоподобную активность и незначительно стимулирует трипсиноподобную активность протеасомы. Этот белок локализуется преимущественно на ядерной мембране и мембране ЭПР. Считается,

что P131 не участвует в обычной АТФ/Ub-зависимой деградации белков, а вовлечен в биогенез и функционирование иммунопротеасомы [122, 132].

**PC530.** Это – 530-кДа многосубъединичный регуляторный комплекс, обнаруженный у морской звезды [133]. PC530 вовлечен в гаметогенез и оплодотворение. Основные физиологические функции протеасомы с регулятором PC530 заключаются в удалении дефектной спермы в эпидидимисе и элиминации отцовских митохондрий в оплодотворенных яйцеклетках [134].

**Сигналосома COP9 (или CSN).** Регуляторный комплекс COP9 (430-кДа) состоит из восьми субъединиц (CSN1-8), высокомолекулярных коровым субъединицам крышки 19S RP. Сигналосома COP9 первоначально была идентифицирована как репрессор фотоморфогенеза у *Arabidopsis thaliana* [135]. Позже ее обнаружили у многих эукариот, где она участвует во многих клеточных процессах, в том числе на стадии эмбрионального развития [136]. Общепринято, что COP9 взаимодействует с куллин (cullin)-содержащими E3-убиквитинлигазами и необходима для их правильного функционирования. Такие E3-лигазы активируются Ub-подобной NEDD8-модификацией: после конъюгирования с NEDD8 E3-лигаза становится более активной в привлечении ферментов E2 (реакция убиквитинирования белков и функции ферментов E1, E2 и E3 в этом процессе будут подробно освещены ниже) [137]. Реакция конъюгирования с NEDD8 называется «неддирование». Функция COP9 антогонистична неддированию: субъединица CSN5 сигналосома COP9 обладает изопептидазной активностью, которая снимает NEDD8 с куллин-содержащих E3-лигаз, тем самым регулируя сборку и активность лигаз этого класса [138]. Кроме того, COP9 может связываться с протеинкиназами и деубиквитинирующими ферментами и регулировать их деградацию [136]. Сигналосома COP9 проявляет и деубиквитинирующую активность [139–141].

**Другие регуляторы.** Белок Tat вируса иммунодефицита человека и белок X вируса гепатита В взаимодействуют с протеасомой и подавляют ее пептидазную активность [142, 143]. Считается, что эти белки не только конкурируют с другими регуляторными частицами за связывание с 20S CP, но и, связавшись с ней, фиксируют пору протеасомы в закрытой конформации. Таким образом, они выступают в роли иммуносупрессоров, препятствующих презентации антигена при вирусной инфекции.

В крови человека обнаруживается мультисубъединичный ингибитор протеасомы CF-2. Это 240-кДа гомооктамер 35-кДа белка ALAD

(6-aminolevulinic acid dehydratase), принимающего участие в биосинтезе гема [144]. Физиологические функции этого белка мало изучены. Вероятно, нарушения в его функционировании являются одной из причин острой перемежающейся порфирии [145].

Белок E7 вируса папилломы человека 16, взаимодействуя с 26S PR, усиливает эффективность деградации внутриклеточного белка ретинобластомы (белок Rb). Снижение уровня белка Rb приводит к раковой трансформации клеток. Вероятно, именно этим обуславливается онкогенность белка E7 вирусов папилломы человека высокого риска (high-risk HPV) [146].

Аланин/пролин-богатый пептид Pr39 является неконкурентным ингибитором 26S PR, который не влияет на связывание других регуляторных частиц с 20S CP. Он взаимодействует с субъединицей  $\alpha 7$  20S CP и вызывает структурные изменения, которые приводят к субстратспецифичному ингибированию протеасомы по отношению к белкам IкВ $\alpha$  и NIF-1 $\alpha$  [147].

### III. УБИКВИТИН-ЗАВИСИМЫЙ ПРОТЕОЛИЗ

Деградация белков по Ub-зависимому пути проходит в два основных этапа: (1) присоединение «метки» – полиубиквитиновой цепи – к белку-субстрату и (2) расщепление полиубиквитинированного белка-субстрата 26S протеасомой с высвобождением свободного Ub. Последний процесс опосредуется деубиквитирующими ферментами (deubiquitinating enzymes, DUBs). Конъюгирование Ub – эволюционно высококонсервативного 76-аминокислотного белка – с белком-субстратом происходит посредством трехступенчатого каскада реакций.

#### СИСТЕМА УБИКВИТИНИРОВАНИЯ / ДЕУБИКВИТИНИРОВАНИЯ

У эукариот большинство субстратов протеасомы полиубиквитинированы. Процесс убиквитинирования осуществляется в каскаде реакций, катализируемых тремя ферментами: E1, E2 и E3. Упрощенно процесс убиквитинирования изображен на рис. 7. На первом этапе Ub-активирующий фермент E1, используя АТФ, активирует Ub с образованием высокоэнергетического тиолэфирного интермедиата (E1-S~Ub). Далее, один из Ub-переносящих ферментов E2 (ubiquitin-carrier protein, UBC) через образование еще одного интермедиата (E2-S~Ub) переносит активированный Ub к E3-лигазе, специфично связанной с субстратом. В случае RING-домен-содержащих E3-лигаз Ub переносится лигазой сразу на субстрат. В случае НЕСТ-до-

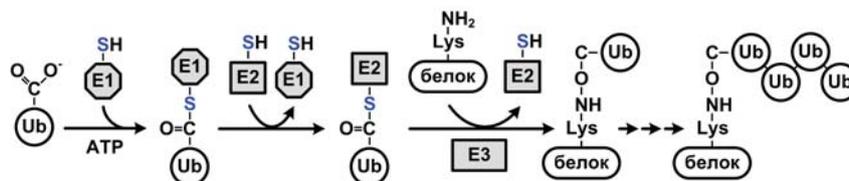


Рис. 7. Этапы полиубиквитинирования белка-субстрата.

Убиквитин (Ub) активируется ферментом E1 и переносится на фермент E2. На последнем этапе E3-лигаза конъюгирует Ub с белком-субстратом (белок). Для деградации белка протеасомой по Ub-зависимому механизму требуется его полиубиквитинирование.

Детали см. в тексте.

мен-содержащих E3-лигаз перенос Ub на субстрат проходит через образование еще одного интермедиата – E3-S~Ub. После присоединения первого Ub к субстрату E3-лигаза последовательно присоединяет еще несколько молекул Ub к остатку Lys на первой молекуле Ub. В некоторых случаях полиубиквитинирование идет при помощи дополнительных U-box-домен-содержащих E3-лигаз (другое название – E4-лигазы) [148]. Обычно C-конец Ub формирует изопептидную связь с ε-аминогруппой остатка Lys в молекуле субстрата, но в некоторых случаях Ub может конъюгировать через N-конец субстрата или через боковую цепь цистеина [149–151]. Минимальным сигналом деградации для протеасомы является цепь из четырех молекул Ub, последовательно соединенных изопептидной связью между C-концом одной молекулы и Lys-48 другой молекулы [95]. Система убиквитинирования у млекопитающих содержит несколько сотен разных ферментов, включая один E1-фермент, ~50 E2-ферментов и ~500 E3-лигаз. E3-лигазы играют ключевую роль в Ub-зависимой протеасомной деградации белков, так как именно они обеспечивают специфичность полиубиквитинирования субстрата.

Перед попаданием субстрата в протеолитическую полость протеасомы с него должен быть удален Ub. Реакция деубиквитинирования осуществляется деубиквитинирующими ферментами (DUBs). Все известные DUB-ферменты являются цистеиновыми протеазами, которые специфично гидролизуют изопептидную связь сразу после C-концевого остатка Ub (Gly-76). У млекопитающих обнаружено ~100 деубиквитинирующих ферментов и, как уже упоминалось выше (глава «Функции субчастиц 19S RP»), по крайней мере четыре из них (Rpn11, Ubr6, UCH37, Doa4) являются

компонентами 26S PR или часто обнаруживаются в комплексе с ней. Основываясь на данных об их молекулярной массе, гомологии в аминокислотной последовательности и каталитически важных остатках в пептидазном центре, их подразделяют на два больших подсемейства: UCHs (ubiquitin COOH-terminal hydrolases) и USPs (или UBPs, ubiquitin-specific proteases). Ферменты UCH – это, как правило, небольшие белки (20–30 кДа), отщепляющие Ub от коротких и неструктурированных полипептидных цепей. Как и все цистеиновые протеазы, в пептидазном центре они содержат каталитическую триаду аминокислотных остатков – Cys, His и Asp – и дополнительный консервативный остаток Glu. Ферменты USP – более гетерогенная группа белков (30–100 кДа), которые расщепляют изопептидную связь как между Ub и субстратом, так и между двумя молекулами Ub. Белки этого семейства также содержат каталитическую триаду аминокислотных остатков (Cys, His и Asp) в пептидазном центре [152, 153]. Помимо этих двух основных семейств DUBs, выделяют еще несколько минорных: OUTs (Otubain proteases), MJDs (Machado-Joseph disease proteases) и JАММ/MPN [154]. Недавно открытое OUT-семейство пока немногочисленно. Оно включает белки отубаин 1 и 2 (otubain 1 и 2), цезанн (cezanne), A20. Все они содержат каталитический OUT-домен с триадой Cys, His и Asp. К семейству MJD относится белок атаксин-3 (ataxin-3), вызывающий нейродегенеративное заболевание Machado-Joseph. Эта протеаза также содержит каталитическую триаду Cys, His и Asp. Субъединица Rpn11 19S RP относится к семейству JАММ/MPN-протеаз. Это Zn<sup>2+</sup>-зависимые металлопептидазы.

#### УБИКВИТИН

Убиквитин – это 76-аминокислотный белок с хорошо изученной  $\alpha/\beta$  укладкой (рис. 8). Он высококонсервативен среди эукариот, но отсутствует у бактерий и архей. У эукариот несколько генов кодируют Ub. Часто Ub синтезируется в виде неактивного полиубиквитинового предшественника, в котором число повторов моноубиквитина может отличаться у разных организмов. Некоторые гены кодируют одну копию Ub, сшитого с рибосомными белками L40 и S27a [155]. Для активации Ub (экспозиции С-концевого остатка Gly) необходим процессинг деубиквитирующими ферментами.

Чаще всего Ub присоединяется к субстратам путем образования изопептидной связи между С-концевым остатком Gly и  $\epsilon$ -аминогруппой остатка Lys в молекуле субстрата. Ub образует разные типы модификаций. Простейшая из них – моноубиквитинирование – это присоедине-

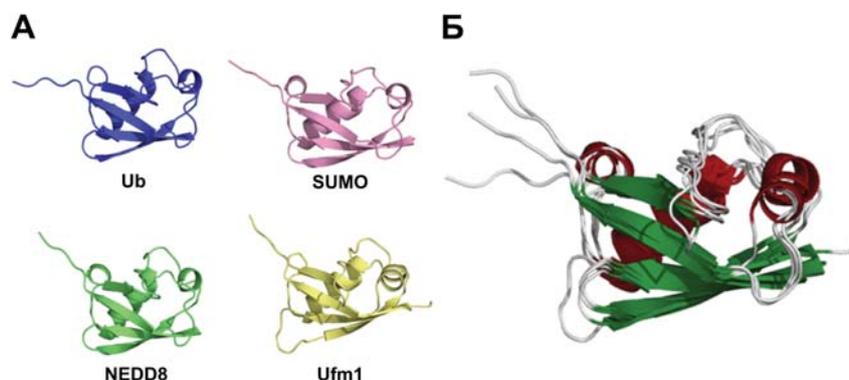


Рис. 8. Структура Ub и белков Ub1.

А. Ленточная диаграмма Ub, NEDD8, SUMO, Ufm1. Все они имеют общую вторичную структуру  $\beta\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha\beta$  и  $\beta$ -grasp (убиквитин-подобную) пространственную укладку.

Б. Наложение ленточных диаграмм Ub и белков Ub1. Данный рисунок демонстрирует высокую пространственную гомологию.

Рисунок модифицирован из [154].

ние к белку одной молекулы Ub [156]. Моноубиквитинирование является распространенной регуляторной модификацией. Присоединение Ub к гистонам и транскрипционным факторам может регулировать транскрипцию [157]. Моноубиквитинирование белков PCNA и FANCD2 играет важную роль при репарации ДНК [158–160]. Присоединение моноубиквитина к различным поверхностным клеточным рецепторам является сигналом для их эндоцитоза и последующей деградации в лизосомах [156].

Другая форма модификации – мультиубиквитинирование или множественное моноубиквитинирование – характеризуется тем, что несколько остатков Lys на субстрате могут образовывать конъюгаты с одиночными молекулами Ub. Такая модификация приводит к эндоцитозу субстрата и его последующей деградации в лизосомах [161].

Молекулы Ub могут конъюгировать между собой, формируя различные варианты цепей. Присоединение таких цепей убиквитина к субстрату – это полиубиквитинирование [162]. В молекуле самого Ub содержится семь остатков Lys (Lys-6, Lys-11, Lys-27, Lys-29, Lys-33, Lys-48 и Lys-63). Считается, что все они могут быть вовлечены в формирование цепи. Полиубиквитиновые цепи, сформированные через Lys-48 и Lys-63, наиболее часто встречаются и хорошо изучены

[163, 164]. Lys-48-полиубиквитиновые цепи чаще всего, но не всегда, служат сигналом для протеасомной деградации субстрата [165]. Lys-63-полиубиквитиновые цепи вовлечены в регуляцию эндоцитоза, репарацию ДНК, активацию протеинкиназ [166]; в экспериментах *in vitro* они могут приводить к деградации субстратов [167]. Полиубиквитиновые цепи, образованные через Lys-6, Lys-11, Lys-27, Lys-29 и Lys-33, встречаются достаточно редко, и их функции не ясны [168, 169].

#### Убиквитин-подобные белки

С момента открытия Ub в середине 1970-х годов было найдено несколько родственных белков. Их группируют в два класса: белки с Ub-подобным доменом (UDP, ubiquitin-domain proteins) и Ub-подобные модификаторы (Ubl, ubiquitin-like modifiers). Белки класса UDP обладают высокой гомологией с Ub по их аминокислотной последовательности и сходны по пространственной структуре, но они не образуют конъюгатов с белками. Они выступают в качестве адаптеров, присоединяясь к Ub или белкам Ubl [170]. Белки класса Ubl не только гомологичны Ub по аминокислотной последовательности и пространственной структуре (см. рис. 8), но и имеют С-концевой остаток Gly, который позволяет им формировать конъюгаты с белками. Подобно Ub, они (1) присоединяются к субстрату посредством каскада реакций и (2) синтезируются в виде неактивных предшественников, которые процессируются специфичными протеазами [154]. Ниже описаны некоторые белки семейства Ubl.

**SUMO (*S*mall *u*biquitin-*li*ke *m*odifier).** Этот модификатор вовлечен в регуляцию различных клеточных процессов, как то: ядерный транспорт, транскрипция, репарация и репликация ДНК, апоптоз и стабилизация белков [171–173]. У *S. cerevisiae* SUMO кодируется одним геном – Smt3 [174]; у позвоночных обнаружено четыре гомологичных гена – SUMO-1, SUMO-2 (Sentrin-3, SMT3A), SUMO-3 (Sentrin-2, SMT3B) и SUMO-4 [175]. Так же как и убиквитинирование, присоединение SUMO к субстрату – сумоилирование (sumoylation) – происходит через образование изопептидной связи между С-концевым остатком Gly в молекуле SUMO и ε-аминогруппой остатка Lys в молекуле субстрата. Остаток Lys, по которому происходит сумоилирование, обычно лежит в консенсусе ψКхЕ (где ψ – большой гидрофобный остаток, х – любой остаток). Процесс сумоилирования осуществляется в каскаде реакций при помощи ферментов Uba2-Aos1 у *S. cerevisiae* или SAE1-SAE2 у позвоночных (E1-фермент), Ubc9 (E2-фермент) и Siz1, Siz2, Mtm21 (E3-фермент).

**NEDD8 (*Neuronal-precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8*).** Этот модификатор подавляет экспрессию набора генов в предшественниках нервных клеток во время развития мозга. NEDD8 – это 9-кДа белок, по аминокислотной последовательности на 60% идентичный Ub. Он имеет собственные ферменты E1 (APPBP1-Uba), E2 (Ubc12) и E3 (Dcn1) для присоединения к субстратам [176]. Известными субстратами являются куллины, p53 и Mdm2 [177].

**ISG15 (*IFN-stimulated gene 15*).** Содержание этого модификатора в клетке сильно возрастает при стимуляции интерфероном [178]. В отличие от Ub и других Ub-подобных модификаторов, он состоит из двух доменов, каждый из которых на 30% идентичен Ub и имеет сходную с ним пространственную структуру. Этот модификатор вовлечен в регуляцию иммунного ответа, клеточный рост и дифференцировку [179, 180]. Присоединение ISG15 также опосредуется каскадом реакций, в котором участвует белок UbeL1 (фермент E1). По всей видимости, следующие этапы реакции осуществляются ферментами E2 и E3 системы убиквитинирования. Субстратами этого модификатора являются белки STATq1, Serpina3G/Sp12A, JAK1, MAPK3/ERK1, PLC $\gamma$ 1, EIF2AK2/PKR, MX1/MXA и RIG-1.

**Atg (*Autophagy*).** При исследовании мутантных штаммов *S. cerevisiae* с нарушениями в аутофагии были обнаружены два Ub-подобных модификатора – Atg8 и Atg12. У млекопитающих обнаружены гомологичные модификаторы: Atg12 и ортологи Atg8 – белки LC3, GABARAP, GATE-16 [181]. У млекопитающих эти модификаторы вовлечены в регуляцию аутофагии при нейродегенеративных, нервно-мышечных и онкозаболеваниях, бактериальных и вирусных инфекциях. В случае Atg8, субстратом такой модификации является фосфолипид PE (phosphatidylethanolamine), а реакция конъюгирования опосредуется ферментами Atg7 (E1) и Atg3 (E2). Конъюгирование Atg8 с PE абсолютно необходимо для нормального течения аутофагии [182].

**FAT10 (*E-adjacent transcript-10*).** Этот 18-кДа белок кодируется геном главного комплекса гистосовместимости и индуцируется TNF $\alpha$  и  $\gamma$ -интерфероном. Он состоит из двух Ub-подобных доменов, один из которых может напрямую связываться с 26S PR и, таким образом, опосредовать Ub-независимую деградацию белков [183].

**Ufm1 (*Ubiquitin-fold modifier 1*).** Этот модификатор идентичен Ub лишь на 16%, но имеет сходную пространственную структуру [184, 185]. Биологические функции этой модификации пока не установлены. Конъюгирование Ufm1 с субстратом опосредуется ферментами Uba5 (E1) и Ufc1 (E2).

#### IV. НЕКЛАССИЧЕСКИЙ ПРОТЕАСОМНЫЙ ПРОТЕОЛИЗ

Хорошо изученная классическая Ub-зависимая протеасомная деградация белков требует полиубиквитинирования белкового субстрата. Она осуществляется с затратой энергии АТФ, а ее продуктами являются короткие пептиды. За последние годы накопилось много экспериментальных данных об отклонениях от этого классического пути деградации. Так, белки могут подвергаться (1) Ub-независимой деградации [186], (2) АТФ-независимой деградации [187], (3) деградации не 26S PR, а коровой латентной 20S PR [188] и (4) не полной деградации до коротких пептидов, а процессингу [189]. Чаще всего при деградации определенного субстрата наблюдается лишь одно из указанных отклонений (обычно это независимость от Ub), реже два (например, независимость от Ub и АТФ), и совсем редко – когда сразу все перечисленные отклонения могут наблюдаться при протеолизе одного белка [37]. Остановимся подробнее на Ub-независимой деградации и процессинге.

##### УБИКВИТИН-НЕЗАВИСИМАЯ ДЕГРАДАЦИЯ

Подавляющее большинство примеров неклассической протеасомной деградации связано с Ub-независимой деградацией субстратов протеасомы. При деградации 26S протеасомой единственным отличием от классического механизма является то, что роль Ub выполняет другой белок или сигнал для деградации содержится в последовательности самого белка-субстрата. В случае 20S формы протеасомы, помимо узнавания субстрата протеасомой, каким-то образом должны решаться вопросы разворачивания субстрата и открытия поры в полость протеасомы. К белкам, способным подвергаться Ub-независимой деградации, относят орнитиндекарбоксилазу (ODC) [190],  $\alpha$ -синуклеин ( $\alpha$ -synuclein) [188], p21<sup>Cip1</sup> [191], tau [192], DHFR [193], RPN4 [194], p53 и p73 [195], HIF-1 $\alpha$  [196], Rb [197], p105 субъединицу NF- $\kappa$ B [198], пертуссис-токсин [199], NFAT5 [200], киназу Auroga-A [201], pp89 [202], KLF5 [203], белок F вируса гепатита С [204], c-Jun [205], кальмодулин (CaM) [206], тропонин С [207] и окисленные белки [208]. Рассмотрим ниже несколько примеров.

**Неструктурированные/поврежденные белки.** Большинство белков, разрушаемых протеасомой Ub-независимо, являются неструктурированными по тем или иным причинам. (1) Согласно анализу генома, около трети всех эукариотических белков содержат длинные участки с неупорядоченной вторичной структурой [209]. Регуляторные белки, по роду своей деятельности, вовлечены во взаимодействия с различными лигандами (белки, ДНК, РНК, мембраны и т.д.).

Часто один регулятор связывается с несколькими специфичными лигандами. Такое разнообразие его межмолекулярных связей возможно лишь при высокой пластичности пространственной структуры. Поэтому неудивительно, что очень многие регуляторные белки являются нативно неупорядоченными и короткоживущими. Вероятно, их неупорядоченность, которая в конечном итоге приводит к быстрой Ub-независимой деградации, является дополнительным уровнем контроля содержания таких белков в клетке в зависимости от условий окружающей среды [210]. (2) Другой причиной неструктурированности белка может быть его повреждение. Белки в клетке постоянно подвергаются спонтанным неэнзиматическим модификациям (дезаминирование остатков Asp, изомеризация остатков Asp, окисление), которые не только инактивируют их, но и сокращают время жизни. Такие модификации часто приводят к разворачиванию белков и, как следствие, к увеличению гидрофобной поверхности, что, в свою очередь, приводит к Ub-независимому узнаванию и деградации 20S протеасомой [211]. В экспериментах *in vitro* показано, что 26S протеасома неактивна в деградации окисленных и развернутых белков даже в присутствии Ub и АТР [208]. Развернутым белкам не нужен Ub для связывания с протеасомой – его функцию выполняют гидрофобные участки развернутой цепи; для их деградации не нужен гидролиз АТР, необходимый для разворачивания; они часто обходятся без 19S RP, так как способны сами открывать пору в полость протеасомы.

**ODC.** Первым белком, для которого была показана Ub-независимая деградация, была орнитиндекарбоксилаза (ODC). Деградация ODC АТР-зависима и регулируется белком AZ1 (antizyme 1) [190, 212]. ODC является короткоживущим белком, но при взаимодействии с AZ1 скорость ее деградации значительно увеличивается. С-конец ODC является элементом нестабильности – он отвечает за взаимодействие ODC с протеасомой (возможно, с субъединицей Rpt5). Считается, что в отсутствие AZ1 орнитиндекарбоксилаза формирует димеры, в которых эти С-концевые участки маскированы [213]. Было показано, что образование комплекса ODC/AZ1 увеличивает экспонированность С-конца и, как следствие, увеличивает эффективность узнавания протеасомой [214].

**p21<sup>Cip1</sup>.** Ингибитор p21<sup>Cip1</sup> циклин-зависимой киназы является важным регуляторным белком, и его содержание в клетке находится под контролем сложной многоуровневой регуляции. Это нестабильный белок, утилизируемый протеасомой. Его стабильность регулируется как фосфорилированием, так и взаимодействием с другими белками

[215–217]. В клетке незначительная часть  $p21^{Cip1}$  убиквитинируется, и доля убиквитинированного белка увеличивается в присутствии ингибиторов протеасомы. Это свидетельствует в пользу Ub-зависимой деградации  $p21^{Cip1}$ . Тем не менее серия работ по изучению стабильности неубиквитинируемой формы  $p21^{Cip1}$  (в которой все остатки Lys заменены на Arg, а N-конец блокирован тагом, предотвращающим N-концевое убиквитинирование) продемонстрировала, что такой модифицированный белок остается нестабильным и подвергается регулируемой деградации как и белок дикого типа [213]. Эти данные показывают, что убиквитинирование  $p21^{Cip1}$  не является обязательным условием его деградации, то есть его протеолиз может быть и Ub-независимым. Значительный вклад в деградацию  $p21^{Cip1}$  вносят PA28 $\gamma$ -содержащие протеасомы. Так,  $p21^{Cip1}$  существенно стабилизирован в клетках, лишенных PA28 $\gamma$  методом РНК-интерференции, или в эмбриональных фибробластах мыши, нокаутной по PA28 $\gamma$  [187, 218]. Однако в некоторых клеточных линиях для деградации  $p21^{Cip1}$  вовсе не требуется PA28 $\gamma$ , и при удалении PA28 $\gamma$  методом РНК-интерференции не удается добиться полной стабилизации  $p21^{Cip1}$  [187, 218]. Это указывает на участие в деградации  $p21^{Cip1}$  и других изоформ протеасомы. В частности, данные экспериментов *in vivo* и *in vitro* показывают, что С-концевая часть  $p21^{Cip1}$  может напрямую взаимодействовать с субъединицей  $\alpha 7$  20S CP [219]. В этой же работе показано, что  $p21^{Cip1}$  дикого типа, но не мутант, лишенный С-концевой части, способен деградировать под действием 20S CP *in vitro*. Важная роль в узнавании и деградации  $p21^{Cip1}$  под действием PA28 $\gamma$ -содержащих протеасом также отводится его С-концевой части [187, 218]. Что касается проблемы проникновения в протеолитическую полость, то, как и в случае с поврежденными белками,  $p21^{Cip1}$ , являясь неструктурированным белком [220], может сам открывать пору 20S протеасомы [38]. Было показано, что деградация  $p21^{Cip1}$  под действием 26S протеасомы *in vitro* является АТР-независимой [38, 111]. Единственным объяснением независимости деградации от АТР может быть способность развернутых субстратов проникать в протеолитическую полость 20S CP через открытую пору за счет пассивной диффузии [111].

**p53.** Транскрипционный фактор p53 является важным координатором клеточного ответа на ДНК-повреждающий стресс в большинстве, если не во всех клетках. В зависимости от условий и типа клеток ответ на стресс может заключаться в остановке клеточного цикла, апоптозе или старении [221]. Нарушения в функционировании p53 обнаруживаются более чем в 50% случаев рака. Известно, что в

обычных условиях в нетрансформированных клетках p53 нестабилен и достаточно быстро деградирует. Под воздействием стресса в клетках наблюдается усиление синтеза и стабилизация p53. Для p53 показаны оба – Ub-независимый и Ub-зависимый – способа деградации. Ub-зависимый механизм будет вкратце освещен в разделе «Протеасома и медицина». Здесь мы остановимся на Ub-независимых механизмах. В настоящее время хорошо изучены два механизма Ub-независимой деградации p53.

*Е6-зависимая Ub-независимая деградация p53.* Папилломавирусы высокого онкогенного риска (типы 16 и 18) экспрессируют белок E6, который связывается с p53 и вызывает его деградацию [222]. Локализованы два сайта связывания белка E6 с молекулой p53: один находится в ДНК-связывающем домене p53 (66-326 а.о.), второй – в С-концевой части (376-384 а.о.). Связывание E6 с С-концевым участком p53 осуществляется без посредников, а связывание E6 с ДНК-связывающим доменом p53 опосредуется белком E6-AP (E6-associated protein). После образования комплекса E6/p53 или E6/E6-AP/p53 белок p53 подвергается Ub-независимой протеасомной деградации [223]. Однако остается невыясненным, какой именно протеасомный комплекс – 20S или 26S – вовлечен в деградацию p53 и как E6 осуществляет презентацию p53 для протеасомы. Известно, что E6 может вызывать и Ub-зависимую деградацию p53. В этом механизме также задействован белок E6-AP. Этот белок является специфичной для p53 клеточной E3-лигазой, но в норме он не убиквитинирует p53. Участие E6 и E6-AP в Ub-зависимой деградации p53 более подробно освещено в разделе «Протеасома и медицина».

*NQO1-ингибируемая Ub-независимая деградация p53.* Белок NQO1 (NAD(P)H quinone oxidoreductase 1) является ферментом, регулирующим содержание хинонов в клетке. Значительная часть этого белка находится в комплексе с 20S, но не с 26S протеасомой. NQO1 способен взаимодействовать с p53 и, более того, NQO1, p53 и 20S обнаруживаются в тройственном комплексе [195]. Было показано, что взаимодействие NQO1 с 20S протеасомой не зависит от NADH и не разрушается дикумаролом (конкурентный ингибитор NQO1). Связывание же NQO1 с p53, напротив, усиливается в присутствии NADH и разрушается при добавлении дикумарола или других ингибиторов NQO1. Была выдвинута гипотеза, согласно которой свободный или сидящий на 20S протеасоме белок NQO1 в присутствии NADH связывается с p53, стабилизирует его и локально повышает его концентрацию вблизи 20S протеасомы. Считается, что каталитическая активность NQO1 не важна для стабилизации p53

[224]. В отсутствие NADH p53 диссоциирует от NQO1 и разрушается 20S протеасомой. Однако механизм узнавания и процессирования p53 протеасомой остается неясным. Высказано предположение, что NQO1 выступает в роли своеобразного привратника, который способен открывать пору в протеолитическую полость протеасомы для p53, p73 $\alpha$ , ODC и других неструктурированных белков [225].

**Rb.** Онкосупрессорные Rb белки, наряду с p107 и p130, являются членами мультигенного семейства. Эти белки играют ключевую роль в таких клеточных процессах, как контроль клеточного цикла, ответ на ДНК-повреждающий стресс, репликация ДНК, репарация ДНК, дифференцировка и старение клеток [226]. Содержание этих белков в клетке регулируется за счет их протеасомной деградации. Описаны оба – Ub-независимый и Ub-зависимый – механизмы деградации.

*pp71-индуцируемая Ub-независимая деградация Rb.* Известно несколько белков, кодируемых ДНК-содержащими вирусами, которые индуцируют протеасомную деградацию Rb. Это белок E7 вирусов папилломы человека [227], белок EBNA3C вируса Эпштейна-Барр [228], NS5B вируса гепатита С [229] и pp71 цитомегаловируса человека [230]. Показано, что белки E7, EBNA3C и NS5B вызывают усиление убиквитинирования Rb и, соответственно, индукцию его Ub-зависимой деградации. Белок pp71 вызывает Ub-независимую деградацию Rb, однако ее молекулярный механизм изучен еще недостаточно.

*Mdm2-индуцируемая Ub-независимая деградация Rb.* Онкобелок Mdm2 оверэкспрессируется при многих типах рака человека, а его C-концевая область является RING-домен-содержащей E3-лигазой. Было показано, что Mdm2 специфично связывается с гипофосфорилированной формой белка Rb и индуцирует его протеасомную деградацию [231, 232]. Существуют две противоположные точки зрения на механизм Mdm2-индуцируемой деградации Rb: (1) Mdm2 усиливает убиквитинирование Rb, что свидетельствует в пользу Ub-зависимого механизма деградации Rb в клетке [232], (2) Mdm2 не стимулирует убиквитинирование Rb в клетках, и в этом случае протеасомная деградация Rb идет по Ub-независимому механизму [231]. В пользу второго механизма говорят следующие факты: Rb более чувствителен к 20S, чем к 26S форме протеасомы; в экспериментах по гель-фильтрации клеточных экстрактов Rb коэлюируется с 20S, а не с 26S протеасомой. Mdm2 и Rb связываются с  $\alpha$ 7-субъединицей протеасомы. За связывание с  $\alpha$ 7-субъединицей отвечают RING-домен Mdm2 и C-карман Rb; при этом оба эти участка необходимы для Mdm2-индуцируемой деградации Rb *in vivo*. В отсутствие

RING-домена Mdm2 не способен промотировать/стабилизировать взаимодействие Rb с  $\alpha 7$ -субъединицей протеасомы. Все эти факты указывают на возможность Ub-независимой деградации Rb в клетке. Однако остается непонятным, почему одна группа исследователей видит убиквитинирование Rb, а другая нет.

#### ПРОЦЕССИНГ

Как уже отмечено выше, классический механизм деградации белков 26S протеасомой включает этапы разворачивания и транслокации полипептидной цепи в протеолитическую полость. Считается, что субстрат проникает одним из своих концов в протеолитическую полость 20S CP через пору, и деградация происходит процессивно с конца (экзопротеолитически). Однако было обнаружено, что р50 субъединица транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B образуется из р105-предшественника котрансляционно протеасомозависимо. Исходя из того, что процессированная р50-субъединица содержала N-концевую часть р105-предшественника, а С-концевая часть была связана с рибосомой, возникла гипотеза о способности протеасомы осуществлять эндопротеолиз, то есть вносить разрыв в полипептидную цепь субстрата на значительном удалении от ее концов [189]. При этом предполагается, что растущая полипептидная цепь складывается в виде шпильки, которая и проходит в протеолитическую полость протеасомы. Такая возможность была продемонстрирована в экспериментах *in vitro* по деградации барназы, полипептидная цепь которой была прошита дисульфидными связями. В этой работе было показано, что пора 20S CP может расширяться до 20 Å и это позволяет проходить через нее одновременно трем полипептидным цепям [29]. Чуть позже возможность эндопротеолиза была продемонстрирована напрямую в экспериментах *in vitro* по деградации модельных субстратов протеасомы. Субстраты представляли собой белки  $\alpha$ -синуклеин ( $\alpha$ -synuclein) и р21<sup>Cip1</sup>, к С- и/или N-концам которых генноинженерным способом были «пришиты» молекулы белка GFP.  $\alpha$ -Синуклеин и р21<sup>Cip1</sup> являются неструктурированными белками, способными расщепляться 20S и 26S PR Ub-независимым образом. GFP, напротив, является структурированной молекулой, устойчивой к протеасомной деградации. В этих экспериментах было показано, что как в GFP- $\alpha$ -синуклеине и GFP-р21<sup>Cip1</sup> (в которых N-конец неструктурированных белков защищен от инициации деградации), так и в  $\alpha$ -синуклеине-GFP и р21<sup>Cip1</sup>-GFP (в которых С-конец неструктурированных белков защищен от инициации деградации) 20S и 26S формы протеасомы способны деградировать неструктурированную часть ( $\alpha$ -синуклеин

или p21<sup>Cip1</sup>), оставляя GFP интактным. Это указывает на возможность деградации субстрата протеасомой с обоих концов полипептидной цепи.  $\alpha$ -Синуклеин и p21<sup>Cip1</sup> в составе субстратов (GFP- $\alpha$ -синуклеин-GFP и GFP-p21<sup>Cip1</sup>-GFP), несмотря на защищенность обоих концов от инициации деградации, также подвергались протеасомной деградации, в то время как GFP оставался интактным. Все это указывает на эндопротеолитический характер деградации этих модельных субстратов и позволяет говорить об ограниченной деградации или процессинге [38]. После этой экспериментальной статьи альтернативную Ub-независимую протеасомную деградацию перестали считать артефактным явлением и 20S форму протеасомы стали рассматривать как «полноценный» фермент, способный осуществлять регуляцию функций белков клетки через их деградацию или процессинг.

**NF- $\kappa$ B p105.** NF- $\kappa$ B – это семейство димерных транскрипционных факторов. Контролируя экспрессию широкого спектра генов, они вовлечены в регуляцию иммунного ответа, воспалительных реакций и апоптоза. Семейство NF- $\kappa$ B включает пять членов: p50, p52, p65/RelA, c-rel и RelB [233]. Среди них p50 и p52 образуются в результате процессинга из предшественников p105 и p100, соответственно. Как уже упоминалось выше, p50-субъединица является N-концевой частью p105-предшественника. Согласно экспериментальным данным, процессинг p105 может осуществляться как Ub-зависимо 26S протеасомой [234], так и АТР-/Ub-независимо 20S протеасомой [198].

Первоначально считалось, что образование p50 из p105-предшественника осуществляется котрансляционно [189]. Согласно этой гипотезе, p50 образуется не из полностью синтезированного p105-предшественника, а формируется котрансляционно. При трансляции мРНК *p105* рибосома делает паузу в районе триплета, соответствующего аминокислотному остатку 530. В это время к синтезируемому полипептиду присоединяется протеасома, которая осуществляет ограниченный эндопротеолиз. В результате С-концевая часть деградирует полностью, а N-концевая (1–433 а.о.) – остается интактной. Если рибосома не делает паузу, то синтезируется полноразмерный полипептид p105, который уже не способен подвергаться процессингу до p50. Этот белок функционирует как ингибитор активности целого ряда других белков: он связывается с белками Trl2, FLIP, LYL1, ZUD5 и субъединицами NF- $\kappa$ B [235–238]. Под воздействием определенных стимулов активируется I $\kappa$ B киназа  $\beta$ , которая фосфорилирует p105 по остаткам Ser-927 и Ser-932, что запускает его протеасомную деградацию [239].

Позже появились данные, согласно которым *in vitro* p50 может образовываться в результате процессинга под действием 20S протеасомы из полностью синтезированного p105-предшественника. В экспериментах *in vivo* показано, что процессинг проходит независимо от трансляции и не требует убиквитинирования p105 [198]. Эксперименты с серией делеционных мутантов p105 выявили следующее: (1) процессинг начинается с эндопротеолиза в неструктурированной области p105, соответствующей аминокислотным остаткам 430–530; (2) элементом, предотвращающим полную деградацию белка, является область GRR (glycine-rich region, 365–430 а.о.); удаление этой области приводит к полной деградации p105. Почему GRR предотвращает полную деградацию, остается непонятным.

**УВ-1.** УВ-1 – это ДНК/РНК-связывающий ядерно-цитоплазматический белок клеток животных, принимающий участие практически во всех ДНК- и мРНК-зависимых процессах. Он повышает устойчивость клеток к ионизирующей радиации и генотоксическим ксенобиотикам, служит маркером множественной лекарственной устойчивости и рака, может вызывать или подавлять онкогенную трансформацию клеток. Многочисленные функции УВ-1, выполняемые им в клетке, зависят от его количества, активности и внутриклеточного распределения [240].

В экспериментах *in vitro* было показано, что УВ-1 расщепляется АТР-/Ub-независимо 20S протеасомой на два фрагмента. Расщепление осуществляется каспазоподобной активностью 20S СР по пептидной связи после остатка Glu-219. Такое же расщепление УВ-1 под действием протеасомы наблюдается в раковых клетках после их обработки рядом терапевтических агентов, повреждающих ДНК. Однако в клетках удается обнаружить лишь больший N-концевой фрагмент УВ-1 (С-концевая часть, по всей видимости, подвергается дальнейшей деградации) [37]. Сходное расщепление обнаружено и в эндотелиальных клетках, обработанных тромбином, однако протеаза, ответственная за процессинг, не была идентифицирована [241]. После протеасомного процессинга N-концевой фрагмент УВ-1 (1–219 а.о.) переходит в клеточное ядро [37]. Переход в ядро укороченного УВ-1 объясняется присутствием в нем сигнала ядерной локализации (183–205 а.о.). В целом белке содержится и другой сигнал – сигнал цитоплазматического удержания (247–290 а.о.), который локализован в отщепляемой С-концевой части молекулы. Этот сигнал доминирует над сигналом ядерной локализации или маскирует его, что определяет цитоплазматическую локализацию целого белка [242]. Выяснилось, что накопление в ядрах процессированной формы УВ-1 коррелирует с возникновением у клеток устойчивости к ДНК-повреждающим

агентам. На данный момент мы не знаем, необходим ли процессинг белка YB-1 только для регуляции его ядерно-цитоплазматического распределения или также и для модулирования функциональной активности YB-1. До сих пор не ясны молекулярные механизмы, запускающие Ub-независимый процессинг YB-1.

Помимо АТР-/Ub-независимого процессинга, YB-1 может претерпевать полную Ub-зависимую деградацию. Первоначально в клетках, обработанных ингибитором протеасомы, было обнаружено накопление убиквитинированного YB-1 [37], а позже найдены и E3-лигазы, вовлеченные этот процесс. Одной из них оказалась E3-лигаза SCF<sup>Fbx33</sup>, которая состоит из белков Skp1, Cull1 и F-box белка FBX33 (последний является субстратузнающим компонентом этого мультисубъединичного фермента) [243]. Еще одной специфичной к YB-1 E3-лигазой является RING-домен содержащий белок RBBP6 (retinoblastoma binding protein 6) [244]. Вероятнее всего, количество YB-1 в клетке строго регулируется деградацией по Ub-зависимому механизму, тогда как Ub-независимый процессинг YB-1 запускается в определенных условиях и направлен на регуляцию внутриклеточного распределения и/или модуляцию активностей YB-1.

**eIF4G и eIF3a.** Инициация трансляции клеточных и вирусных мРНК в эукариотической клетке осуществляется при помощи специальных белков – факторов инициации трансляции. Исследователями неоднократно отмечалось, что при выделении этих факторов из лизатов ретикулоцитов кролика некоторые из них подвергаются протеолитической фрагментации, существенно сказывающейся на их активности. Наиболее заметно такой фрагментации подвержены субъединицы eIF4G фактора eIF4F и eIF3a фактора eIF3. Добавление ингибиторов протеасомы в клеточный лизат при фракционировании белков предотвращало их фрагментацию, из чего был сделан вывод об участии протеасомы в их процессинге. Этот вывод подтвержден в опытах *in vitro*. Было показано, что 20S протеасома способна Ub-независимо расщеплять eIF4G и eIF3a [245]. Расщепление 20S протеасомой факторов eIF4F и eIF3 оказывает ингибирующее влияние на трансляцию мРНК, зависящих от этих факторов. Известно, что некоторые клеточные и вирусные мРНК «менее требовательны» и могут эффективно вовлекаться в трансляцию даже в отсутствие некоторых инициаторных факторов [246, 247]. Исходя из этих данных, авторами работы высказано предположение о том, что протеасомный процессинг белков eIF4G и eIF3a является одним из механизмов регуляции трансляции в клетке.

## V. РЕГУЛЯЦИЯ ПРОТЕАСОМЫ

26S протеасома отвечает за регулируемый протеолиз многих внутриклеточных белков, при этом сама она находится под постоянным контролем. Относительное содержание протеасомы и ее локализация в клетке динамично изменяются, подстраиваются в соответствии с потребностями клетки и определенными стрессовыми условиями. Протеасома постоянно собирается и разбирается, а ее субъединицы являются мишенями для большого числа посттрансляционных модификаций [248]. Как следует из изложенного выше, протеасома функционирует в постоянном взаимодействии со множеством белков, которые ее стабилизируют, регулируют активности, помогают в узнавании субстратов, в утилизации Ub и т.д. Кратко охарактеризуем основные механизмы регуляции Ub-зависимой деградации.

### *Гетерогенность протеасом в клетке*

Как нам уже известно, 26S PR состоит из 20S CP и регуляторных частиц, которые могут присоединяться к одному или обоим концам 20S CP. Гетерогенность регуляторных частиц и число комбинаций, в которых они могут присоединяться к 20S CP, дают целый набор протеасом с разными функциями. Содержание регуляторных субчастиц в клетке и, соответственно, функции протеасом могут сильно меняться (смотри раздел «Строение протеасомы»). Иммунопротеасома – еще один яркий пример регуляции функций протеасомы путем изменения ее субъединичного состава. Как уже упоминалось выше, после стимуляции клеток  $\gamma$ -интерфероном активируется синтез трех протеасомных субъединиц –  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  и  $\beta 5i$ , которые во время сборки протеасомы встраиваются вместо конститутивно синтезируемых субъединиц  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$ . Пептиды, генерируемые иммунопротеасомой, не подвергаются дальнейшей деградации клеточными пептидазами, а используются в презентации антигена. Помимо этого, содержание индивидуальных протеасомных субъединиц может зависеть от пола организма [249] или, как в случае Rpn10, субъединицы протеасомы могут синтезироваться в виде тканеспецифичных изоформ, возникающих в результате альтернативного сплайсинга предшественников их мРНК [250].

### *Синтез протеасомных субъединиц*

Механизмы регуляции синтеза субъединиц протеасомы изучены недостаточно хорошо, и пока известно лишь несколько примеров такой регуляции. Протеасомные субъединицы синтезируются в стехиометрических количествах, что свидетельствует в пользу координированного контроля экспрессии протеасомных генов.

У *S. cerevisiae* была обнаружена система регуляции на уровне транскрипции: в промоторах генов протеасомных субъединиц и целого ряда других генов (их более 700) обнаружен регуляторный элемент PACE (proteasome activation control element), который узнается транскрипционным фактором Son1. В ранних работах этот белок был обнаружен в комплексе с субъединицами протеасомы, поэтому за ним закрепилось название Rpn4. Rpn4/Son1 связывается с элементом PACE в промоторах протеасомных генов и активирует их транскрипцию. Это приводит к увеличению содержания протеасомы в клетке. В нормальных условиях Rpn4 является короткоживущим. Его период полураспада составляет около двух минут, а деградация происходит под действием вновь синтезированных протеасом по Ub-независимому механизму [251]. В стрессовых условиях, когда требуется большее количество протеасом в клетке или когда их активность подавлена мутациями в субъединицах или ингибиторами, деградация Rpn4 замедляется, и период полураспада увеличивается в несколько раз [194]. Механизм регуляции синтеза протеасомных субъединиц фактором Rpn4 подтверждается элегантным экспериментом, в котором синтез устойчивого к протеасомной деградации Rpn4 привел к значительному повышению содержания протеасомы [252].

Известно, что общий уровень экспрессии протеасомных субъединиц у высших эукариот зависит от пролиферативного состояния клетки. Так, синтез протеасомы в пролиферирующих лейкозных клетках идет более активно по сравнению с неделяющимися клетками, достигшими конечной стадии дифференцировки [253]. Усиление синтеза протеасомных субъединиц обнаружено в клетках, обработанных ингибиторами протеасомы [254]. Механизмы регуляции синтеза протеасом у высших эукариот пока не исследованы, но очевидно, что они отличаются от вышеописанного механизма, функционирующего в дрожжах, поскольку в клетках эукариот не обнаружено ни ортолога Rpn4, ни элементов PACE в промоторах протеасомных генов.

#### *Локализация протеасом*

Протеасомы в эукариотических клетках локализуются как в цитоплазме, так и в ядре. К примеру, в гепатоцитах 17% от общего количества протеасом находится в ядре, 14% связано с ЭПР, а оставшаяся доля обнаруживается в цитоплазматическом матриксе; содержание протеасом в ядрах клеток легочного эпителия составляет 51% [255]. Приведенные цифры свидетельствуют о том, что ядерно-цитоплазматическое распределение протеасом может быть тканеспецифичным. Распределение протеасом между цитоплазмой и ядром существенным

образом изменяется во время эмбриогенеза. В сперматозоидах и яйцеклетках протеасомы сконцентрированы в цитоплазме, на ранних этапах дробления они переходят в ядро, а к стадии бластоцисты внутриклеточная локализация протеасом уже близка к их распределению в соматических клетках [256, 257]. Помимо этого, внутриклеточное распределение протеасом динамично изменяется в зависимости от стадии клеточного цикла [258]. Продвижение клетки по циклу регулируется двумя основными биохимическими механизмами. Это фосфорилирование-дефосфорилирование и протеолиз белков, вовлеченных в процессы регуляции клеточного цикла (например, циклинов и циклин-зависимых киназ) [259]. Протеасомная деградация циклинов в ядре является обязательным условием нормального прохождения клеточного цикла [260].

Механизмы регуляции внутриклеточного распределения протеасом остаются малоизученными. Некоторые субъединицы протеасом содержат сигналы ядерной локализации (NLS, nuclear localization signal) [261–263]. Большая часть субъединиц фосфорилируется [248]. По меньшей мере, шесть протеасомных субъединиц фосфорилируются по остаткам Туг, и такое фосфорилирование, вероятно, вовлечено в регуляцию перераспределения протеасом между ядром и цитоплазмой [262, 264, 265]. Недавно появились работы, в которых сообщалось, что протеасомы могут локализоваться не только в клетке, но и вне ее. Протеасомы были обнаружены в сыворотке крови как здоровых людей, так и больных разными формами рака (лейкемия, миелома, карцинома и т.д.) [266–268]. Исходя из того, что в сыворотке больных содержание протеасом было намного выше, авторы пришли к заключению, что это является следствием их повышенной секреции из раковых клеток [266]. Было также показано, что уровень синтеза протеасом в лейкозных клетках значительно выше чем в нормальных клетках крови [253]. Повышенное содержание протеасом в сыворотке крови отмечено и у больных с различными аутоиммунными заболеваниями и этот показатель используется в настоящее время как один из клинических маркеров протекания заболеваний (смотри раздел «Протеасома и медицина»). Молекулярные механизмы секреции протеасом остаются малоизученными.

#### *Модификации субъединиц протеасом*

В клетке многие белки претерпевают различные структурные изменения в результате котрансляционных и посттрансляционных модификаций. Описано более 100 различных модификаций, однако роль большинства из них не выяснена. Некоторые модификации

случайны и, по-видимому, не имеют функционального значения, но есть и такие, которые важны для жизни клетки, так как они строго контролируются специфическими ферментами. Для субъединиц 26S PR показано, что они могут подвергаться фосфорилированию, N-ацетилюрованию, N-концевому процессингу, расщеплению каспазами, N-миристоилрованию, O-гликозилированию, S-глутатионилированию, алкилированию и окислению серосодержащих а.о. (см. обзор [248]). Некоторые из этих модификаций могут модулировать функции протеасомы. Приведем несколько примеров такой регуляции.

**Фосфорилирование.** Фосфорилирование 20S PR протеинкиназой A *in vitro* (по субъединицам  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  и  $\beta 7$ ) значительно повышает химотрипсин- и каспазоподобную активности [269]. Имеются данные, согласно которым фосфорилирование субъединицы  $\alpha 2$  по остатку Thr-120 необходимо для ядерной локализации протеасомы [265]. Фосфорилирование субъединиц  $\alpha 3$  и  $\alpha 7$  20S CP может оказывать влияние на присоединение регуляторных частиц к концам 20S CP [270, 271]. В частности, фосфорилирование казеинкиназой II (СКII) по субъединице  $\alpha 7$  стабилизирует комплекс 20S CP с 19S RP, тогда как дефосфорилирование усиливает связывание 20S CP с PA28 $\alpha/\beta$  [272]. Недавно было обнаружено, что около половины всех фосфорилированных остатков протеасомы находится в консенсусах для митоген-активируемых и циклин-зависимых киназ, то есть фосфорилирование протеасомы и, следовательно, ее функции могут сильно изменяться в зависимости от стадии клеточного цикла [119].

**N-концевой процессинг.** Пять из семи  $\beta$ -субъединиц ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$  и  $\beta 7$ ) 20S протеасомы имеют N-концевые пропептидные последовательности. Они необходимы как для сборки протеасомы, так и для защиты остатков Thr-1 в будущих каталитических центрах от ацетилювания и инактивации [273]. Преждевременное отщепление пропептидных последовательностей от субъединиц  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$  приводит к инактивации каталитических центров и снижает эффективность сборки 20S CP.

**N-миристоилрование.** Масс-спектральным анализом было обнаружено, что субъединица Rpt2 19S RP подвергается миристоилрованию по N-концевому остатку Gly. Известно, что обычно такая модификация влияет на белок-белковые взаимодействия и взаимодействие белков с мембранами. Было высказано предположение, что миристоилрование субъединицы Rpt2 также регулирует взаимодействие протеасомы с белками и мембранами [119]. Экспериментальных подтверждений этому пока не получено.

**S-глутатионилирование.** Показано, что глутатионилирование субъединиц 20S протеасомы *S. cerevisiae* по остаткам Cys инактивирует химотрипсин- и трипсиноподобную активности, но не каспазоподобную активность протеасомы [274].

**O-гликозилирование.** Многие Rpn, Rpt,  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы протеасомы гликозилируются. Так как обратимому гликозилированию и фосфорилированию подвергаются одни и те же остатки полипептидной цепи, серины и треонины, при чем их влияние на функции часто антагонистично, переключение с одного типа модификации на другой способно быстро модулировать активность протеасомы. Известно, что АТРазная субъединица Rpt2 19S RP гликозилируется *in vivo* и *in vitro*. Такая модификация приводит к ингибированию АТРазной активности и, как следствие, к снижению эффективности протеолиза [275].

**Расщепление каспазами.** Некоторые субъединицы 20S CP, а также субъединицы Rpn2, Rpn10 и Rpt5 в клетках человека при апоптозе подвергаются расщеплению каспазой 3. Субъединицы Rpn2 и Rpn10 играют важную роль в присоединении основания к крышке 19S RP. Помимо этого, Rpn10 является основной субъединицей, вовлеченной в узнавание полиубиквитинированных субстратов 26S PR. Логично, что их расщепление приводит к подавлению деградации белков, накоплению убиквитинированных белков, в том числе проапоптотических [276].

#### Адаптерные белки

ПолиUb цепь может напрямую связываться с протеасомными субъединицами (подробно описано в разделе «19S регуляторная частица»). Тем не менее большую роль в регуляции взаимодействия полиубиквитинированного субстрата с протеасомой играет семейство адаптерных полиUb-связывающих белков UbL-UbA. Они взаимодействуют с протеасомой своим N-концевым доменом UbL (Ub-like domain), а с убиквитинированным субстратом при помощи C-концевого домена UbA (Ub-association domain). Показано, что белки UbL-UbA могут обладать как разной, так и перекрывающейся субстратной специфичностью [97, 99, 277]. К UbL-UbA белкам относятся, например, белки Rad23, Dsk2 и Ddi1 [67]. Специфичность узнавания субстратов этими адаптерными белками может обеспечивать локальное повышение концентрации протеасомы в местах, где требуется срочная утилизация белков. Так, например, при ДНК-повреждающем стрессе белок Rad23 связывается с белком Rad4, вовлеченным в репарацию ДНК, и таким способом привлекает протеасому к участкам

поврежденной ДНК, вовлекая ее в деградацию белков в этих участках хроматина, что необходимо для эффективной репарации ДНК [278].

В роли адаптера между протеасомой и субстратом могут выступать некоторые лигазы E3. Они могут напрямую или через вспомогательные белки взаимодействовать с протеасомой. В этом случае E3-лигаза может обеспечивать эффективную субстрат-специфичную деградацию двумя способами: напрямую, локально увеличивая концентрацию специфичного субстрата, или опосредованно, удлиняя полиUb-цепь специфичного субстрата и, тем самым, увеличивая его сродство к протеасоме [98].

Для некоторых субстратов связывание с протеасомой возможно лишь в присутствии присоединенного к ней комплекса Cdc48/p97 [279]. Cdc48 – это АТР-зависимый шаперон, состоящий из шести идентичных субъединиц. Он может взаимодействовать с лигазами E3, деубиквитинирующими ферментами, может связывать субстраты напрямую или через большое семейство адаптерных белков UbX-UbA. Помимо узнавания специфичных субстратов, комплекс Cdc48 участвует в их разворачивании [98].

## VI. ПРОТЕАСОМА И МЕДИЦИНА

Практически все внутриклеточные процессы, включая контроль клеточного цикла, регуляцию транскрипции и трансляции, клеточный ответ на стрессовые воздействия и т.д., находятся под контролем Ub-протеасомной системы. Внушительное число ключевых регуляторных белков клетки элиминируется или процессируется протеасомой. Среди них циклины, ингибиторы циклин-зависимых киназ, фосфатазы, киназы, факторы транскрипции и трансляции. Многочисленные примеры участия протеасомы в регуляции клеточных процессов были подробно изложены в обзоре Константиновой и соавт. [248]. Такая важная биологическая роль протеасомной системы подразумевает, что она неминуемо должна быть вовлечена в патофизиологические процессы, результатом которых является развитие рака, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний. Кратко рассмотрим изменения в протеасомной системе, которые приводят к развитию различных заболеваний.

### ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ

К настоящему времени известно несколько примеров того, как протеасомная система может участвовать в развитии злокачественных

новообразований. Если говорить в общем, то к развитию рака может привести стабилизация онкобелка или дестабилизация супрессора опухолей.

**p53.** Многофункциональный белок p53 является одним из наиболее хорошо изученных супрессоров опухолей. Он участвует в широком спектре клеточных процессов, в том числе в индукции апоптоза, стимуляции процессов репарации ДНК, остановке клеточного цикла и регуляции основного метаболизма [280]. На сегодняшний день известно несколько способов регуляции активности p53 в клетке. Многие из них, так или иначе, связаны с деградацией этого белка 26S или 20S протеасомами. Существует несколько E3-лигаз для p53: Mdm2, E6-AP/E6, COP1, Pirh2, ARF-BP1, Topors и CHIP [281–288]. Мутации в этих ферментах, нарушение их активности, а также дубликации их генов или нарушение регуляции их экспрессии могут приводить к злокачественному перерождению клеток в результате недостаточной активности p53. Это легко продемонстрировать на примере Mdm2: в ряде видов опухолей были обнаружены такие нарушения, как амплификация гена [289, 290], повышенный синтез белка [291–293] и неправильный сплайсинг пре-мРНК Mdm2 [294, 295]. Кроме того, в промоторе гена Mdm2 человека (HDM2) был обнаружен полиморфизм по одному нуклеотиду: в 309-м положении первого интрона может находиться либо тимин, либо гуанин (SNP309T или SNP309G). Замена Т на G приводит к тому, что транскрипционный фактор Sp1 более прочно связывается с интронной ДНК, в результате чего повышается уровень транскрипции с гена Mdm2 [296]. Согласно данным одних исследователей, этот полиморфизм никак не влияет на вероятность развития рака [297–299], а по данным других – гомо- или гетерозиготное состояние SNP309G коррелирует с повышенным риском развития злокачественных новообразований [300, 301], плохим прогнозом на выживание [302] и более ранним началом заболевания [296, 303, 304]. Стоит заметить, что Mdm2 может способствовать формированию опухолей и по механизму, независимому от p53 [305].

Недавно при анализе генов, экспрессия которых повышена в гепатоклеточной карциноме, был обнаружен белок ганкирин (gankyrin), содержание которого было повышено во всех проанализированных образцах опухолей. Независимо этот белок был идентифицирован как компонент p28/PSMD10 19S регуляторной частицы протеасомы и как белок, специфически взаимодействующий с АТФазой S6b/Tbp7/PSMC4 [306]. Было показано, что ганкирин может связываться с белком Mdm2 и способствовать взаимодействию

последнего с p53. Ганкирин увеличивает способность Mdm2 моно- и полиубиквитинировать p53; в результате при увеличении содержания этого белка происходит усиленная Mdm2-зависимая деградация p53 [307]. Кроме того, высказано предположение, что ганкирин может доставлять полиубиквитинированный p53 в комплексе с Mdm2 прямо к протеасоме за счет связывания с S6b [308].

Помимо Mdm2, ряд опухолей характеризуется повышенным содержанием и других E3-лигаз, специфичных в отношении p53. Так, повышенное количество E3-лигазы ARF-BP1 связано с возникновением колоректального рака [309], экспрессия E3-лигазы COP1 усиливается во многих карциномах яичника и молочной железы [284], а Pirh2 – в опухолях легких [310].

Усиленная деградация p53 играет важную роль в развитии рака шейки матки, вызванного вирусами папилломы человека высокого онкогенного риска (типы 16 и 18). Обнаружено значительное снижение p53 в этих опухолях, но при этом, в отличие от многих невирусных карцином шейки матки, они в большинстве своем содержат мутантный ген p53 [311]. Детальные исследования показали, что белок E6 вируса папилломы может образовывать комплекс с клеточными белками p53 и E6-AP (E6-associated protein) [312–314]. E6-AP является E3-лигазой, которая, однако, в норме не взаимодействует с p53 [315]. E6 выступает в качестве посредника, который объединяет E6-AP и p53 в единый комплекс; в составе такого комплекса E6-AP может убиквитинировать p53 [316]. Можно сказать, что в данном случае роль E3-лигазы выполняет комплекс E6-AP/E6.

**p27<sup>Kip1</sup>.** Белок p27<sup>Kip1</sup> является ингибитором активности комплексов Cdk2/CyclinA и Cdk2/CyclinE и таким образом предотвращает вхождение клеток в S-фазу клеточного цикла [317]. В ответ на действие митогенных стимулов p27 убиквитинируется и подвергается протеасомной деградации. Специфичной E3-лигазой для p27 является комплекс SCF<sup>Skp2</sup>, который состоит из белков Skp1, Cul1 и Skp2, последний из них служит субстрат-узнающим компонентом комплекса [318, 319]. Для узнавания и эффективного убиквитинирования p27 комплексом SCF<sup>Skp2</sup> нужен также небольшой дополнительный белок Cks1 [320, 321].

Как негативный регулятор клеточного деления p27 обладает свойствами супрессора опухолей. Пониженное содержание p27 является характерной чертой раковых опухолей разного происхождения [322–324]. Как антагонисты p27, Skp2 и Cks1 являются онкобелками, их повышенный синтез коррелирует с низким уровнем p27 и плохим прогнозом для больного [322, 324–329]. Skp2 узнает еще ряд

супрессоров опухолей помимо p27, а именно: ингибиторы циклинзависимых киназ p21<sup>Cip1</sup>, p57, p130 [330-332] и фактор транскрипции FOXO1 [333]. В связи с этим можно говорить об онкогенной функции SKP2, независимой от p27.

**pVHL.** Еще одним примером того, как мутация одного из компонентов убиквитинирующего комплекса может быть связана с возникновением злокачественных новообразований, является болезнь фон Гиппеля-Линдау. Это наследственное заболевание, вызванное аутомсомной доминантной мутацией в одном из аллелей гена VHL, который кодирует субчастицу мультимерной E3-лигазы. Болезнь встречается с частотой 1 случай на 35000 человек [334]. Больные имеют повышенную предрасположенность к появлению некоторых видов опухолей, таких как феохромоцитомы, гемангиобластомы центральной нервной системы, почечноклеточные карциномы и ангиомы сетчатки. Собственно развитие этих новообразований начинается после соматической инактивации аллеля дикого типа или после его мутации. Характерными чертами опухолей, возникающих при болезни фон Гиппеля-Линдау, является высокая степень их васкуляризации и гиперэкспрессия белков, синтез которых обычно индуцируется только при гипоксии, таких как VEGF (*v*ascular *e*ndothelial *g*rowth *f*actor) [335, 336].

Продукт гена VHL – белок pVHL – является субстратузнающим компонентом мультимерной E3-лигазы [337-341]. Помимо pVHL, в состав этого мультисубъединичного комплекса также входят белки куллин 2A, Rbx/Hrt1, элонгин B и элонгин C [342-344]. Наиболее изученным и известным субстратом этого фермента является HIF1 $\alpha$  – субъединица гетеродимерного фактора транскрипции HIF-1.

Гетеродимерный фактор транскрипции HIF-1 играет ключевую роль в реакции клеток на гипоксию. Он состоит из двух субъединиц: одного из трех вариантов HIF $\alpha$  и HIF $\beta$ 1 [345]. Достаточное количество HIF $\beta$ 1 присутствует в клетках постоянно, в то время как формы HIF $\alpha$  в присутствии кислорода очень быстро деградируют. В условиях же гипоксии HIF $\alpha$  стабилизируется и вместе с HIF $\beta$ 1 формирует функциональный транскрипционный фактор HIF-1, который, связываясь с консенсусной последовательностью HRE (*h*ypoxia-*r*esponsive *e*lement), активирует транскрипцию ряда генов, участвующих в ангиогенезе, контроле клеточного цикла, метаболизме глюкозы и апоптозе [345]. Недавно был раскрыт механизм такой зависимой от кислорода регуляции уровня HIF-1 в клетке. Было показано, что в присутствии кислорода HIF1 $\alpha$  быстро убиквитинируется и расщепляется протеасомой [346]. Эта деградация ока-

залась зависимой от домена ODD (oxygen-dependent degradation), который узнается pVHL. Для того, чтобы белок pVHL узнавал HIF1 $\alpha$ , важно, чтобы в последнем были гидроксированы остатки Pro-402 и особенно Pro-564. Это гидроксирование осуществляется особыми пролилгидроксилазами в присутствии кислорода [347–351]. В условиях гипоксии данная реакция практически не протекает, поэтому уровень HIF1 $\alpha$  повышается; то же самое происходит при мутациях гена VHL. Активной HIF-1-зависимой транскрипцией можно объяснить высокую степень васкуляризации опухолей при болезни фон Гиппеля-Линдау. Однако известно, что далеко не все клетки с повышенным уровнем HIF-1 претерпевают раковую трансформацию. Это дает основания считать, что у белка pVHL есть дополнительные функции, не связанные с HIF-1 [334].

**BRCA1/BARD1.** Белок BRCA1 (breast cancer type 1 susceptibility protein) – хорошо известный супрессор опухолей молочной железы и яичников. Ген BRCA1 часто оказывается инактивированным в результате мутаций как в случае наследственных раков, так и в случае спорадических [352, 353]. Кроме того, дисфункция BRCA1 коррелирует с базальным фенотипом клеток опухолей и плохим прогнозом на выживание [354, 355].

BRCA1 содержит RING-домен в N-концевой части молекулы и образует комплекс с родственным по структуре белком BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein 1), в котором также присутствует RING-домен [356]. Мутации BARD1 встречаются также при раке груди и яичников, хотя и с меньшей частотой, чем мутации BRCA1 [357]. Комплекс BRCA1/BARD1 обладает E3-лигазной активностью и способен к аутоубиквитинированию, которое повышает его стабильность и активность [358–360]. Существует ряд косвенных данных, которые указывают на то, что функции BRCA1 и BARD1, как супрессоров опухолей, реализуются через активность их гетеродимерного комплекса и что при этом важна целостность доменов, участвующих в убиквитинировании [358, 361, 362]. Недавно на мышинных моделях это было прямо показано, однако осталось не ясным, важна ли для супрессии опухолей E3-лигазная активность комплекса BRCA1/BARD1 [363]. На сегодняшний день известно несколько субстратов BRCA1/BARD1: гистоны,  $\gamma$ -тубулин, фосфорилированная РНК-полимераза II, рецептор эстрогена и некоторые другие [360, 364–368]. Тем не менее вопрос о том, взаимодействие с какими субстратами опосредует противоопухолевое действие BRCA1/BARD1, пока не решен.

## СИНДРОМ ЛИДДЛА

Это наследственное аутосомно-доминантное заболевание впервые описано Лиддлом в 1960-х годах. Его симптомами являются сильная гипертензия уже в молодом возрасте, гипокалиемия и метаболический алкалоз, связанные с повышенной реабсорбцией ионов натрия в почках, при низких уровнях альдостерона и ренина [369, 370]. Оказалось, что эта болезнь связана с нарушением регуляции активности эпителиального  $\text{Na}^+$ -канала (ENaC), который состоит из трех гомологичных субъединиц:  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -ENaC [371]. Активность ENaC регулируется большей частью на уровне включения его в цитоплазматическую мембрану. Показано, что нонсенс- и миссенс-мутации в С-концевых частях  $\beta$ - и  $\gamma$ -ENaC, затрагивающие консервативный пролин-богатый мотив, приводят к повышению количества ENaC в мембране и развитию синдрома Лиддла [372–378]. Выяснилось, что PY-мотивы в С-концевых частях субъединиц ENaC являются местами связывания E3-лигаз семейства NEDD4, которые негативно регулируют активность ENaC [379–383]. Хотя ингибировать ENaC способны несколько членов этого семейства, наиболее значимым регулятором *in vivo* является NEDD4-2 [384]. Считается, что лигаза NEDD4-2 связывается с ENaC на цитоплазматической мембране и убиквитинирует его. Это приводит к выходу субъединиц ENaC из мембраны и их последующей деградации [385, 386]. В мембране постоянно присутствуют два пула ENaC: интактные каналы и каналы,  $\alpha$ - и  $\gamma$ -субъединицы которых подверглись ограниченному протеолизу в области внеклеточного домена. Расщепленные каналы являются более активными, вероятность открытого состояния у них выше. Интересно, что NEDD4-2 действует таким образом, что в первую очередь из мембраны удаляются именно более активные ENaC [387].

## НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

К нейродегенеративным заболеваниям относят болезни, основным признаком которых является утрата функций и отмирание клеток головного и спинного мозга. Характерной особенностью этих болезней является формирование крупных внутриклеточных агрегатов, состоящих из неправильно свернутых молекул белков. Во многих случаях в составе агрегатов обнаруживается Ub и протеасомы [388–391]. Роль Ub-протеасомной системы в патогенезе нейродегенеративных заболеваний до сих пор точно не установлена. Не ясно также, являются ли тельца включения токсичными для клетки. Первоначально было высказано предположение, что причиной образо-

вания телец включения при нейродегенеративных заболеваниях являются нарушения в функционировании Ub-протеасомной системы. Действительно, несколькими группами исследователей было показано, что ингибиторы протеасомы вызывают формирование телец включения и апоптотическую смерть нейронов в модельных системах [392–394]. Кроме того, оказалось, что ферментативная активность протеасом снижена в нейронах, пораженных болезнью Паркинсона [395]. С другой стороны, известно, что агрегировавшие белки могут сами нарушать работу протеасомы [396–398]. С некоторой степенью определенности удалось установить связь между развитием болезни и дисфункцией Ub-протеасомной системы только для некоторых типов наследственных болезней Паркинсона и Альцгеймера. Рассмотрим один из таких случаев.

На сегодняшний день известно 6 генов, мутации в которых могут стать причиной наследственной болезни Паркинсона. Это  $\alpha$ -синуклеин ( $\alpha$ -synuclein), паркин (parkin), UCH-L1, DJ-1, PINK 1 и LRRK2 [399–403]. Белок паркин является E3-лигазой, содержащей два RING-домена и домен Ubl, за счет которого он может связываться с субъединицей Rpn10 протеасомы [404–407]. Мутации, снижающие лигазную активность паркина, приводят к развитию болезни. Сегодня известно несколько субстратов паркина, среди них O-гликозилированный  $\alpha$ -синуклеин, CDCrel-1 и рецептор Pael [404, 406, 408]. Хотя имеющиеся данные позволяют предполагать, что паркин играет весьма важную роль в патогенезе наследственной болезни Паркинсона, до сих пор не известно, является ли накопление какого-либо из его субстратов токсичным для нейронов.

#### ВИРУСНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Вирусы выработали различные стратегии для того, чтобы не быть замеченными иммунной системой хозяина и успешно размножаться. Некоторые из этих стратегий, так или иначе, связаны с Ub-протеасомной системой.

**HCMV (цитомегаловирус человека).** HCMV и родственные ему вирусы предотвращают узнавание инфицированных клеток цитотоксическими лимфоцитами. Эти вирусы вызывают обратный транспорт гликозилированных тяжелых цепей белков МНС-I (major histocompatibility complex class I) из ЭПР обратно в цитозоль, где они дегликозилируются, полиубиквитинируются и подвергаются протеасомной деградации. За эти процессы отвечают трансмембранные вирусные гликопротеины US-2 и US-11, которые отличаются друг от друга механизмом транспорта тяжелых цепей МНС-I [409–413].

Для эффективного US-11- и US-2-зависимого транспорта тяжелых цепей МНС-I необходимо наличие функциональной системы убиквитинирования, однако известно, что в случае US-11-зависимого транспорта тяжелые цепи не являются акцепторами убиквитина. Для US-11-зависимой деградации тяжелых цепей МНС-I необходимы белки, которые в норме активируются, если ЭПР перегружен неправильно свернутыми белками. US-11 запускает сигнальный путь, который приводит к синтезу этих белков [414, 415].

Кроме того, HCMV ингибирует процесс презентации антигена еще одним способом. Известно, что пептидные лиганды для молекул МНС-I продуцируются иммунопротеасомами. Специфические субъединицы иммунопротеасом синтезируются в ответ на стимуляцию клеток  $\gamma$ -интерфероном. Белок M27 цитомегаловируса ингибирует STAT2, компонент сигнального пути, начинающегося с рецептора интерферона, и, тем самым, предотвращает формирование иммунопротеасом [416].

**Вирусы герпеса.** Мышиный  $\gamma$ -герпесвирус 68 и герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши (герпесвирус 8), также нарушают процесс презентации антигена в инфицированных клетках, но на более поздней стадии, чем цитомегаловирус. Белок МК3  $\gamma$ -герпесвируса 68 и белки K3 и K5 герпесвируса 8 являются E3-лигазами, которые убиквитинируют цитоплазматические участки молекул МНС-I и других молекул, важных для иммунного узнавания, таких как ICAM-1 и B7-2 [417–420]. Убиквитинирование этих молекул приводит к тому, что они быстро уводятся из мембраны посредством клатрин-зависимого эндоцитоза и расщепляются в лизосомах.

**EBV (вирус Эпштейна-Барр).** Белок вируса Эпштейна-Барр EBNA1 (Epstein-Barr virus (EBV)-encoded nuclear antigen 1) является единственным из 9 его белков, который всегда обнаруживается во всех EBV-ассоциированных опухолях. Цитотоксические лимфоциты не узнают клетки, в которых синтезируется EBNA1. Это связано с тем, что в N-концевой части EBNA1 присутствуют протяженные Gly-Ala-повторы, которые защищают этот белок от расщепления иммунопротеасомой [421, 422]. В результате фрагменты EBNA1 не представляются на мембране инфицированной клетки в комплексе с МНС-I. Считается, что Gly-Ala-повторы мешают транслокации полипептидной цепи в каталитическую полость протеасомы, поэтому протеолиз белков с такими повторами оказывается неполным [423, 424].

**Парамиксовирусы.** JAK-STAT-сигнальный путь (Janus kinase – signal transducers and activators of transcription) является центральным в защите организма-хозяина от вирусных инфекций, поэтому действие

некоторых вирусов направлено на подавление активности этого пути. Так, белок V вируса свинки (а также белки V родственных ему вирусов парагриппа человека 2 типа и вируса SV5) инициирует сборку комплексной E3-лигазы, состоящей из белка V и ряда клеточных белков. Такой комплексный фермент убиквитинирует STAT1 и STAT3 в случае вируса свинки, STAT2 – в случае вируса парагриппа и STAT1 – в случае SV5 [425-427]. После убиквитинирования эти белки расщепляются протеасомой.

**Вирус гепатита С.** Известны примеры того, как вирусные белки могут связываться напрямую с компонентами протеасомы и менять ее протеолитическую активность. Так, белок NS3 вируса гепатита С взаимодействует с субъединицей LMT7 иммунопротеасомы и снижает ее трипсиноподобную и каспазоподобную активности [428].

#### ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ И АУТОИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Ub-протеасомная система играет немалую роль в механизмах иммунной защиты организма. Во-первых, она участвует в процессинге антигена в антигенпрезентирующих клетках. Во-вторых, она регулирует передачу сигналов от рецептора Т-клеток для антигена и ко-стимуляторной молекулы CD28. Наконец, в-третьих, она участвует в активации NF-κB, ключевого регулятора активности генов многих воспалительных цитокинов, адгезионных молекул и рецепторов иммунной системы. Остановимся на последней функции Ub-протеасомной системы чуть подробнее.

Ub-протеасомная система активирует гетеро- и гомодимерные транскрипционные факторы семейства NF-κB в два этапа. Сначала протеасома осуществляет Ub-зависимый процессинг фосфорилированных предшественников p100 и p105 с образованием активных субъединиц транскрипционных факторов p50 (NF-κB1) и p52 (NF-κB2). Активные факторы удерживаются в цитоплазме ингибиторами NF-κB (IκB). После сигнал-индуцированного фосфорилирования и убиквитинирования IκB расщепляются протеасомой, и освободившиеся факторы переходят в ядро, где активируют транскрипцию соответствующих генов [429]. Считается, что патологическая активация NF-κB является причиной многих воспалительных заболеваний.

Присутствие в крови повышенных количеств протеасом сопутствует ряду аутоиммунных и онкологических заболеваний [268, 430, 431]. Кроме того, отмечают наличие антител против компонентов протеасом и регуляторной частицы PA28 в крови больных системной красной волчанкой, миозитом, рассеянным склерозом и синдромом

Съегрена [432–435]. Функциональное значение этих аутоантител пока не установлено, хотя было показано, что они могут блокировать активацию протеасомы регуляторной частицей RA28. Это дает основание предполагать, что антитела против протеасомы могут как-то регулировать ее активность [436].

Известно, что патологическая активация Т-хелперов 2 типа (Th2) приводит к развитию симптомов астмы и аллергии. При активации Th2 происходит JunB-зависимая транскрипция генов ряда интерлейкинов (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) [437, 438]. Важную роль в развитии иммунологической толерантности Т-клеток играет Е3-лигаза Itch. После фосфорилирования киназой JNK1 Itch активируется и убиквитинирует JunB, который затем расщепляется протеасомой [439]. Известно, что мыши, у которых отсутствует ген *Itch*, страдают от различных проявлений аллергии [440].

Ревматоидный артрит – это аутоиммунное заболевание, которое характеризуется хроническим воспалением синовиальной ткани и повреждением костей и хрящей. Показано, что в патогенез ревматоидного артрита вовлечена активация NF-κB [441, 442].

Ингибиторы протеасомы рассматриваются как потенциальные лекарства от аутоиммунных и воспалительных заболеваний, действующие, в основном, путем ингибирования NF-κB. Вопрос о применении ингибиторов Ub-протеасомной системы в медицине более подробно рассмотрен ниже.

#### ИНГИБИТОРЫ УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНОЙ СИСТЕМЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВА

Как было сказано выше, нарушение работы тех или иных компонентов Ub-протеасомной системы может быть причиной различных заболеваний. Поэтому поиск специфичных ингибиторов этой системы кажется привлекательным направлением. Однако необходимо учитывать тот факт, что Ub-протеасомная система непрерывно участвует в ключевых для жизни клетки событиях и что в результате ее ингибирования нарушается нормальное течение огромного количества процессов.

Наименее специфичными ингибиторами Ub-протеасомной системы являются ингибиторы ферментативной активности 20S протеасомы и E1. Большинство используемых ингибиторов 20S протеасомы направлено на подавление ее химоотрипсинподобной активности. Это связано, во-первых, с тем, что блокирование именно этой активности приводит к наибольшему снижению уровня расщепления белков, а во-вторых, ингибиторы этой активности обычно

представляют собой весьма гидрофобные молекулы и поэтому легко проникают в клетку, в отличие от ингибиторов других каталитических центров протеасомы, которые содержат заряженные участки [443]. По химической структуре большая часть ингибиторов – это короткие пептиды, несущие хромофоры, взаимодействующие с каталитическими остатками в активном центре. Высокоспецифичными ингибиторами 20S протеасом являются пептидборонаты [443].

При достаточно длительном воздействии ингибиторы 20S протеасомы оказываются токсичными для клеток и приводят к их гибели в результате апоптоза, причем пролиферирующие клетки обычно более чувствительны к этим веществам [444–447]. Принимая во внимание этот факт, а также антиангиогенное действие ингибиторов, можно предположить, что эти вещества должны быть эффективны в борьбе с раком [445, 448]. Один из протеасомных ингибиторов, бортезомиб (bortezomib, PS-341, пиразинилкарбонил-Phe-Leu-боронат, Velcade), уже сегодня эффективно применяется в этом качестве.

Бортезомиб представляет собой сильный ингибитор химотрипсинподобной и отчасти трипсиноподобной активности протеасомы. После того, как была описана противоопухолевая активность бортезомиба *in vitro* и *in vivo*, начались его испытания в клинике [449, 450]. Выяснилось, что бортезомиб в основном не эффективен как монопредпарат в лечении солидных опухолей, но дает очень хорошие результаты в случае множественной миеломы и других гематологических заболеваний [451–456].

Сейчас идет поиск новых ингибиторов протеасомы, которые могут превзойти по своей эффективности бортезомиб и его производные. Например, недавно из морских бактерий был выделен высокоспецифичный ингибитор салиноспорамид А (NPI-0052), который, в отличие от бортезомиба, может необратимо связываться со всеми каталитическими центрами протеасомы [457]. В исследованиях *in vitro* было показано, что NPI-0052 лучше ингибирует протеасому и NF-κB, чем бортезомиб, при использовании их в равных концентрациях, а также сильнее стимулирует апоптоз изолированных лимфоцитов от пациентов с хронической лимфоцитарной лейкемией [458, 459]. Кроме того, NPI-0052 вызывает апоптоз клеток множественной миеломы, устойчивых к бортезомибу и другим лекарствам [460]. Недавно начаты клинические испытания этого вещества.

Более тонким подходом, чем использование ингибиторов 20S протеасомы, является поиск и применение ингибиторов E3-лигаз и конкретных взаимодействий белок-субстрат-E3. Здесь можно выде-

лить несколько подходов. Во-первых, в качестве ингибиторов E3 можно использовать пептиды, соответствующие области белка-субстрата, с которой связывается E3-лигаза. Так, например, было показано, что фосфопептид, отвечающий N-концевой области IκB, защищает целый белок от протеасомной деградации, а микроинъекции такого фосфопептида в клетки препятствуют активации в них NF-κB [461].

Во-вторых, можно вести поиск малых молекул, которые будут специфично ингибировать активные центры E3 или сайты их связывания с субстратом. Подбор и рациональная модификация таких соединений существенно упрощаются, когда известны структуры целевых комплексов субстрат-E3. Рассмотрим результаты применения такого подхода на примере поиска ингибиторов взаимодействия p53-Mdm2. В результате скрининга большой библиотеки малых молекул было идентифицировано семейство HLI-98, представители которого ингибировали автоубиквитинирование Mdm2 *in vitro*. Хотя эти молекулы ингибировали и другие E3-лигазы, а при больших концентрациях даже E2, они были способны вызывать апоптоз трансформированных клеток, почти не оказывая токсического действия на нормальные клетки [462]. Это исследование наглядно показало, что ингибирование E3, в частности Mdm2, является очень перспективным направлением в лечении рака.

Сейчас известно уже несколько более специфичных низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия p53-Mdm2. Первыми были открыты нутлины (Nutlins), производные цис-имидазолина, которые способны вытеснять p53 из комплекса с Mdm2 [463]. Нутлины занимают гидрофобный карман Mdm2, в котором обычно располагаются боковые цепи трех аминокислот p53, и, таким образом, не дают последнему связываться с Mdm2. Обработка нутлинами приводит к накоплению в клетках p53 и продуктов генов, которые он активирует (например, p21 и p27). Нутлин-3 вызывает апоптоз раковых клеток с p53 дикого типа, а у нормальных клеток – замедление роста при сохранении жизнеспособности [463]. Однако позднее выяснилось, что нутлины ингибируют, помимо p53-Mdm2, и другие белок-белковые взаимодействия. Так, белок HIF1α связывается с тем же участком Mdm2, что и p53, поэтому нутлин-3 нарушает и это взаимодействие [464]. Нутлины могут оказывать терапевтическое действие и на раковые клетки с мутантным p53: в таких клетках они вызывают повышение чувствительности ко многим лекарствам [465]. В настоящий момент изучаются свойства ряда других ингибиторов взаимодействия p53-Mdm2 (RITA, MI-63), их эффекты сходны с влиянием нутлинов [466–468].

Приведем еще несколько примеров действия низкомолекулярных ингибиторов E3-лигаз. Пептидные аптамеры, связывающие белок E6 вируса папилломы человека, вызывают апоптотическую элиминацию HPV16-положительных раковых клеток, не оказывая действия на нормальные клетки [469]. Совсем недавно открытый ингибитор комплексной лигазы SCF<sup>Skp2</sup>, CpdA (Compound A), предотвращает включение Skp2 в состав фермента. CpdA вызывает остановку клеточного цикла и SCF<sup>Skp2</sup>- и p27-зависимую клеточную смерть, действуя преимущественно на раковые клетки [470].

В целом, применение веществ, модулирующих активность Ub-протеасомной системы, в терапевтических целях представляется весьма перспективным. Сегодня их пытаются использовать в первую очередь для лечения рака, однако, принимая во внимание то, что нарушения в слаженной работе Ub-протеасомной системы имеют место и при других заболеваниях, можно предположить, что вскоре область применения ингибиторов этой системы в медицине будет расширена.

## VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые 20S протеасому увидели в 1968 г. на электронных микрофотографиях лизата эритроцитов человека. Из-за цилиндрической формы обнаруженная структура была названа «циллиндрин» (cyllindrin), но функции этого циллиндрина тогда остались невыясненными [471]. В конце 70-х–начале 80-х годов стали появляться работы, описывающие высокомолекулярные протеазы цилиндрической формы с молекулярной массой 600-700 кДа. Эти протеазы состояли из нескольких субъединиц с молекулярной массой 24–28 кДа и гидролизovali субстраты после гидрофобных, положительно и отрицательно заряженных а.о., то есть были мультиспецифичны [472–475]. Два этих свойства дали собирательное название для обнаруженного фермента: «мультикаталитическая протеиназа» (multicatalytic proteinase). По другой «линии» исследований примерно в это же время были обнаружены частицы, получившие название «просома» (prosome) или 19S RNP (19S ribonucleoprotein) [476]. По своему размеру и субъединичному составу они сильно напоминали мультикаталитическую протеиназу, но, считалось, что они были ассоциированы с мРНК и вовлечены в регуляцию трансляции [477]. Однако чуть позже все стало на свои места: было показано, что «просома» и «мультикаталитическая протеиназа» – это идентичные частицы [478]. В это же время появилось новое название для этих

частиц, которое отражало протеолитическую сущность и комплексную структуру – 20S proteasome. Спустя четверть века с момента обнаружения протеасомы, стало ясно что протеасома является основой сложной многокомпонентной клеточной машины по утилизации отработанных белков внутри клетки, названной «убиквитин-протеасомная система». За это время удалось значительно продвинуться в изучении структуры и функционирования протеасомы в частности и Ub-протеасомной системы в целом. Важность открытия Ub-протеасомной системы подтверждена присуждением его авторам в 2004 г. Нобелевской премии по химии. Однако и на сегодняшний день остается еще много вопросов, касающихся ее функционирования.

В этом обзоре систематизированы современные данные об Ub-протеасомной системе. Подробно описано строение протеасомы, система убиквитинирования, классический АТФ/Ub-зависимый механизм деградации белков, а также обращено внимание читателей на существование альтернативных механизмов протеасомной деградации и процессинга белков. В отдельном блоке представлены некоторые данные о нарушениях протеасомной системы, которые приводят к развитию различных заболеваний. Надеемся, что данный обзор будет интересен широкому кругу исследователей.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Schoenheimer, R. (1942) *The Dynamic State of Body Constituents*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
2. Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L. (1994) *Cell*, **78**, 761–771.
3. Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C.F., Fenteany, G., Goldberg, A.L., Rock, K.L. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 13437–13445.
4. Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Goldberg, A.L. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 1982–1989.
5. Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M., Goldberg, A.L. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 3363–3371.
6. Glickman, M.H., Ciechanover, A. (2002) *Physiol Rev*, **82**, 373–428.
7. Groll, M., Huber, R. (2003) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **35**, 606–616.
8. Dahlmann, B. (2005) *Essays Biochem.*, **41**, 31–48.
9. Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A., Kloetzel, P.M. (1994) *J. Mol. Biol.*, **236**, 975–981.
10. Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D.B., Monaco, J.J. (1997) *EMBO J.*, **16**, 5363–5375.
11. Griffin, T.A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H.J., Kaer, L.V., Monaco, J.J., Colbert, R.A. (1998) *J. Exp. Med.*, **187**, 97–104.
12. Kloetzel, P.M., Soza, A., Stohwasser, R. (1999) *Biol. Chem.*, **380**, 293–297.
13. Kloetzel, P.M. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**, 179–187.
14. Yewdell, J.W., Schubert, U., Bannink, J.R. (2001) *J. Cell Sci.*, **114**, 845–851.
15. Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A.L. (1996) *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 801–847.
16. Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., Seemuller, E. (1998) *Cell*, **92**, 367–380.

17. Kisselev, A.F., Songyang, Z., Goldberg, A.L. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 14831–14837.
18. Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., Wolf, D.H. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 25200–25209.
19. Arendt, C.S., Hochstrasser, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7156–7161.
20. Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., Finley, D. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1062–1067.
21. Kohler, A., Bajorek, M., Groll, M., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., Finley, D. (2001) *Biochimie*, **83**, 325–332.
22. Orłowski, M., Cardozo, C., Michaud, C. (1993) *Biochemistry*, **32**, 1563–1572.
23. Dick, T.P., Nussbaum, A.K., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stevanovic, S., Wolf, D.H., Huber, R., Rammensee, H.G., Schild, H. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 25637–25646.
24. Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N., Tsukihara, T. (2002) *Structure*, **10**, 609–618.
25. Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R. (1995) *Science*, **268**, 533–539.
26. Zwickl, P., Ng, D., Woo, K.M., Klenk, H.P., Goldberg, A.L. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 26008–26014.
27. Navon, A., Goldberg, A.L. (2001) *Mol. Cell*, **8**, 1339–1349.
28. Forster, A., Hill, C.P. (2003) *Trends Cell Biol.*, **13**, 550–553.
29. Lee, C., Prakash, S., Matouschek, A. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 34760–34765.
30. Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., Huber, R. (1997) *Nature*, **386**, 463–471.
31. Benaroudj, N., Zwickl, P., Seemuller, E., Baumeister, W., Goldberg, A.L. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 69–78.
32. Smith, D.M., Kafri, G., Cheng, Y., Ng, D., Walz, T., Goldberg, A.L. (2005) *Mol. Cell*, **20**, 687–698.
33. Smith, D.M., Chang, S.C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., Goldberg, A.L. (2007) *Mol. Cell*, **27**, 731–744.
34. Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., Finley, D. (1998) *Cell*, **94**, 615–623.
35. DeMartino, G.N., Slaughter, C.A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 22123–22126.
36. Rechsteiner, M., Realini, C., Ustrell, V. (2000) *Biochem. J.*, **345 Pt 1**, 1–15.
37. Sorokin, A.V., Selyutina, A.A., Skabkin, M.A., Guryanov, S.G., Nazimov, I.V., Richard, C., Th'ng, J., Yau, J., Sorensen, P.H., Ovchinnikov, L.P., Evdokimova, V. (2005) *EMBO J.*, **24**, 3602–3612.
38. Liu, C.W., Corboy, M.J., DeMartino, G.N., Thomas, P.J. (2003) *Science*, **299**, 408–411.
39. Tanaka, K., Yoshimura, T., Ichihara, A. (1989) *J. Biochem.*, **106**, 495–500.
40. Bajorek, M., Finley, D., Glickman, M.H. (2003) *Curr. Biol.*, **13**, 1140–1144.
41. Zwickl, P., Kleinz, J., Baumeister, W. (1994) *Nat. Struct. Biol.*, **1**, 765–770.
42. Seemuller, E., Lupas, A., Baumeister, W. (1996) *Nature*, **382**, 468–471.
43. Grziwa, A., Maack, S., Puhler, G., Wiegand, G., Baumeister, W., Jaenicke, R. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **223**, 1061–1067.
44. Seelig, A., Multhaup, G., Pesold-Hurt, B., Beyreuther, K., Kloetzel, P.M. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 25561–25567.
45. Gerards, W.L., Enzlin, J., Haner, M., Hendriks, I.L., Aebi, U., Bloemendal, H., Boelens, W. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 10080–10086.
46. Gerards, W.L., de Jong, W.W., Bloemendal, H., Boelens, W. (1998) *J. Mol. Biol.*, **275**, 113–121.

47. Rosenzweig, R., Glickman, M.H. (2008) *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 807–812.
48. Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., Murata, S. (2005) *Nature*, **437**, 1381–1385.
49. Le Tallec, B., Barrault, M.B., Courbeyrette, R., Guerois, R., Marsolier-Kergoat, M.C., Peyroche, A. (2007) *Mol. Cell*, **27**, 660–674.
50. Li, X., Kusmierczyk, A.R., Wong, P., Emili, A., Hochstrasser, M. (2007) *EMBO J.*, **26**, 2339–2349.
51. Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Niwa, S., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Takagi, K., Suzuki, A., Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., Tanaka, K. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 228–236.
52. Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., Murata, S. (2006) *Mol. Cell*, **24**, 977–984.
53. Kusmierczyk, A.R., Kunjappu, M.J., Funakoshi, M., Hochstrasser, M. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 237–244.
54. Schmidtke, G., Schmidt, M., Kloetzel, P.M. (1997) *J. Mol. Biol.*, **268**, 95–106.
55. Ramos, P.C., Hockendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A., Dohmen, R.J. (1998) *Cell*, **92**, 489–499.
56. Marques, A.J., Glanemann, C., Ramos, P.C., Dohmen, R.J. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 34869–34876.
57. Ramos, P.C., Marques, A.J., London, M.K., Dohmen, R.J. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 14323–14330.
58. Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frommel, C., Lowe, J., Huber, R., Kloetzel, P. M., Schmidt, M. (1996) *EMBO J.*, **15**, 6887–6898.
59. Schmidt, M., Zantopf, D., Kraft, R., Kostka, S., Preissner, R., Kloetzel, P.M. (1999) *J. Mol. Biol.*, **288**, 117–128.
60. Chen, P., Hochstrasser, M. (1996) *Cell*, **86**, 961–972.
61. Heinemeyer, W., Ramos, P.C., Dohmen, R.J. (2004) *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 1562–1578.
62. Fehlker, M., Wendler, P., Lehmann, A., Enenkel, C. (2003) *EMBO Rep.*, **4**, 959–963.
63. Russell, S.J., Steger, K.A., Johnston, S.A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 21943–21952.
64. Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R.Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M.C., Hendil, K.B., Tanaka, K., Dyson, J., Rivett, J. (2000) *Biochem. J.*, **346 Pt 1**, 155–161.
65. Beyer, A. (1997) *Protein Sci.*, **6**, 2043–2058.
66. Ogura, T., Wilkinson, A.J. (2001) *Genes Cells*, **6**, 575–597.
67. Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J., Deshaies, R.J. (2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**, 3425–3439.
68. Deveraux, Q., Jensen, C., Rechsteiner, M. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 23726–23729.
69. Qiu, X.B., Ouyang, S.Y., Li, C.J., Miao, S., Wang, L., Goldberg, A.L. (2006) *EMBO J.*, **25**, 5742–5753.
70. Hori, T., Kato, S., Saeki, M., DeMartino, G.N., Slaughter, C.A., Takeuchi, J., Toh-e, A., Tanaka, K. (1998) *Gene*, **216**, 113–122.
71. Watanabe, T.K., Saito, A., Suzuki, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Slaughter, C.A., DeMartino, G.N., Hendil, K.B., Chung, C.H., Tanahashi, N., Tanaka, K. (1998) *Genomics*, **50**, 241–250.
72. Sone, T., Saeki, Y., Toh-e, A., Yokosawa, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 28807–28816.

73. Fujimuro, M., Tanaka, K., Yokosawa, H., Toh-e, A. (1998) FEBS Lett., **423**, 149–154.
74. Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M.H., Vierstra, R.D. (2001) EMBO J., **20**, 7096–7107.
75. Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A.J., Baumeister, W. (1998) J. Struct. Biol., **121**, 19–29.
76. da Fonseca, P.C., Morris, E.P. (2008) J. Biol. Chem., **283**, 23305–23314.
77. Davy, A., Bello, P., Thierry-Mieg, N., Vaglio, P., Hitti, J., Doucette-Stamm, L., Thierry-Mieg, D., Reboul, J., Boulton, S., Walhout, A. J., Coux, O., Vidal, M. (2001) EMBO Rep., **2**, 821–828.
78. Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., Rothberg, J. M. (2000) Nature, **403**, 623–627.
79. Cagney, G., Uetz, P., Fields, S. (2001) Physiol. Genomics, **7**, 27–34.
80. Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreaault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A.R., Sassi, H., Nielsen, P.A., Rasmussen, K.J., Andersen, J.R., Johansen, L.E., Hansen, L.H., Jaspersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B.D., Matthiesen, J., Hendrickson, R.C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M.F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C.W., Figey, D., Tyers, M. (2002) Nature, **415**, 180–183.
81. Santamaria, P.G., Finley, D., Ballega, J.P., Remacha, M. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 6687–6695.
82. Isono, E., Saito, N., Kamata, N., Saeki, Y., Toh, E. A. (2005) J. Biol. Chem., **280**, 6537–6547.
83. Sharon, M., Taverner, T., Ambroggio, X.I., Deshaies, R.J., Robinson, C.V. (2006) PLoS Biol., **4**, e267.
84. Chen, C., Huang, C., Chen, S., Liang, J., Lin, W., Ke, G., Zhang, H., Wang, B., Huang, J., Han, Z., Ma, L., Huo, K., Yang, X., Yang, P., He, F., Tao, T. (2008) Proteomics, **8**, 508–520.
85. Kajava, A.V. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 49791–49798.
86. Kajava, A.V., Gorbea, C., Ortega, J., Rechsteiner, M., Steven, A.C. (2004) J. Struct. Biol., **146**, 425–430.
87. Rosenzweig, R., Glickman, M.H. (2008) Nat. Struct. Mol. Biol., **15**, 218–220.
88. Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S., Finley, D. (1998) EMBO J., **17**, 4909–4919.
89. Kohler, A., Cascio, P., Leggett, D.S., Woo, K. M., Goldberg, A.L., Finley, D. (2001) Mol. Cell, **7**, 1143–1152.
90. Gillette, T.G., Kumar, B., Thompson, D., Slaughter, C.A., DeMartino, G.N. (2008) J. Biol. Chem., **283**, 31813–31822.
91. Ma, C.P., Slaughter, C.A., DeMartino, G.N. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 10515–10523.
92. Rosenzweig, R., Osmulski, P.A., Gaczynska, M., Glickman, M.H. (2008) Nat. Struct. Mol. Biol., **15**, 573–580.
93. Baboshina, O.V., Haas, A.L. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 2823–2831.
94. Fu, H., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D., Vierstra, R. D. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 1970–1981.
95. Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C.M. (2000) EMBO J., **19**, 94–102.

96. van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D., Vierstra, R.D. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6020–6028.
97. Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Muller, B., Hanna, J., Finley, D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 26817–26822.
98. Elsasser, S., Finley, D. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 742–749.
99. Verma, R., Oania, R., Graumann, J., Deshaies, R.J. (2004) *Cell*, **118**, 99–110.
100. Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K.J., Finley, D., Dikic, I. (2008) *Nature*, **453**, 481–488.
101. Lupas, A., Baumeister, W., Hofmann, K. (1997) *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 195–196.
102. Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., Schmidt, M. (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 221–226.
103. Strickland, E., Hakala, K., Thomas, P.J., DeMartino, G.N. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 5565–5572.
104. Hershko, A., Leshinsky, E., Ganoth, D., Heller, H. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1619–1623.
105. Yao, T., Cohen, R.E. (2002) *Nature*, **419**, 403–407.
106. Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V., Deshaies, R.J. (2002) *Science*, **298**, 611–615.
107. Amerik, A.Y., Hochstrasser, M. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1695**, 189–207.
108. Guterman, A., Glickman, M.H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 1729–1738.
109. Papa, F.R., Amerik, A.Y., Hochstrasser, M. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 741–756.
110. Eytan, E., Ganoth, D., Armon, T., Hershko, A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7751–7755.
111. Liu, C.W., Li, X., Thompson, D., Wooding, K., Chang, T.L., Tang, Z., Yu, H., Thomas, P.J., DeMartino, G.N. (2006) *Mol. Cell*, **24**, 39–50.
112. Isono, E., Nishihara, K., Saeki, Y., Yashiroda, H., Kamata, N., Ge, L., Ueda, T., Kikuchi, Y., Tanaka, K., Nakano, A., Toh-e, A. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 569–580.
113. Isono, E., Saeki, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 27168–27176.
114. Kurucz, E., Ando, I., Sumegi, M., Holzl, H., Kapelari, B., Baumeister, W., Udvardy, A. (2002) *Biochem. J.*, **365**, 527–536.
115. Babbitt, S.E., Kiss, A., Deffenbaugh, A.E., Chang, Y.H., Bailly, E., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Buranda, T., Sklar, L.A., Baumler, J., Gogol, E., Skowyra, D. (2005) *Cell*, **121**, 553–565.
116. Kiss, P., Szabo, A., Hunyadi-Gulyas, E., Medzihradszky, K.F., Lipinszki, Z., Pal, M., Udvardy, A. (2005) *Biochem. J.*, **391**, 301–310.
117. Leggett, D.S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R.T., Walz, T., Ploegh, H., Finley, D. (2002) *Mol. Cell*, **10**, 495–507.
118. Schmidt, M., Hanna, J., Elsasser, S., Finley, D. (2005) *Biol. Chem.*, **386**, 725–737.
119. Wang, X., Chen, C.F., Baker, P.R., Chen, P.L., Kaiser, P., Huang, L. (2007) *Biochemistry*, **46**, 3553–3565.
120. Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I., Tanaka, K. (2003) *EMBO J.*, **22**, 3557–3567.
121. Tone, Y., Tanahashi, N., Tanaka, K., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Toh-e, A. (2000) *Gene*, **243**, 37–45.
122. Rechsteiner, M., Hill, C.P. (2005) *Trends Cell Biol.*, **15**, 27–33.
123. Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., Rechsteiner, M. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 22369–22377.

124. Stohwasser, R., Salzmann, U., Giesebrecht, J., Kloetzel, P.M., Holzhutter, H.G. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6221–6230.
125. Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T. P., Schild, H., Rammensee, H. G., Koszinowski, U.H., Kloetzel, P.M. (1996) *Nature*, **381**, 166–168.
126. Whitby, F.G., Masters, E.I., Kramer, L., Knowlton, J.R., Yao, Y., Wang, C.C., Hill, C.P. (2000) *Nature*, **408**, 115–120.
127. Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt, G., Rechsteiner, M. (2002) *EMBO J.*, **21**, 3516–3525.
128. Schmidt, M., Haas, W., Crosas, B., Santamaria, P.G., Gygi, S.P., Walz, T., Finley, D. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 294–303.
129. Iwanczyk, J., Sadre-Bazzaz, K., Ferrell, K., Kondrashkina, E., Formosa, T., Hill, C. P., Ortega, J. (2006) *J. Mol. Biol.*, **363**, 648–659.
130. Gorbea, C., Goellner, G.M., Tetter, K., Holmes, R.K., Rechsteiner, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 54849–54861.
131. Tanahashi, N., Kawahara, H., Murakami, Y., Tanaka, K. (1999) *Mol. Biol. Rep.*, **26**, 3–9.
132. Zaiss, D.M., Standera, S., Kloetzel, P.M., Sijts, A.J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14344–14349.
133. Tanaka, E., Takagi Sawada, M., Morinaga, C., Yokosawa, H., Sawada, H. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **374**, 181–188.
134. Sakai, N., Sawada, M.T., Sawada, H. (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 776–784.
135. Wei, N., Deng, X.W. (1992) *Plant Cell*, **4**, 1507–1518.
136. Schwechheimer, C. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1695**, 45–54.
137. Deshaies, R.J. (1999) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 435–467.
138. Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., Serino, G., Tsuge, T., Zhou, C., Wolf, D.A., Wei, N., Deshaies, R.J. (2001) *Science*, **292**, 1382–1385.
139. Zhou, C., Wee, S., Rhee, E., Naumann, M., Dubiel, W., Wolf, D.A. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 927–938.
140. Groisman, R., Polanowska, J., Kurraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K., Nakatani, Y. (2003) *Cell*, **113**, 357–367.
141. Liu, C., Powell, K.A., Mundt, K., Wu, L., Carr, A.M., Caspari, T. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 1130–1140.
142. Seeger, M., Ferrell, K., Frank, R., Dubiel, W. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 8145–8148.
143. Hu, Z., Zhang, Z., Doo, E., Coux, O., Goldberg, A.L., Liang, T.J. (1999) *J. Virol.*, **73**, 7231–7240.
144. Guo, G.G., Gu, M., Etlinger, J.D. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 12399–12402.
145. Grünberg-Etkovitz, N., Greenbaum, L., Grinblat, B., Malik, Z. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1762**, 819–827.
146. Boyer, S.N., Wazer, D.E., Band, V. (1996) *Cancer Res.*, **56**, 4620–4624.
147. Gaczynska, M., Osmulski, P.A., Gao, Y., Post, M.J., Simons, M. (2003) *Biochemistry*, **42**, 8663–8670.
148. Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., Jentsch, S. (1999) *Cell*, **96**, 635–644.
149. Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A., Ciechanover, A. (1998) *EMBO J.*, **17**, 5964–5973.
150. Ben-Saadon, R., Fajerman, I., Ziv, T., Hellman, U., Schwartz, A. L., Ciechanover, A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 41414–41421.
151. Cadwell, K., Coscoy, L. (2005) *Science*, **309**, 127–130.
152. D'Andrea, A., Pellman, D. (1998) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 337–352.

153. Chung, C.H., Baek, S.H. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **266**, 633–640.
154. Ha, B.H., Kim, E.E. (2008) *BMB Rep*, **41**, 435–443.
155. Catic, A., Sun, Z.Y., Ratner, D.M., Misaghi, S., Spooner, E., Samuelson, J., Wagner, G., Ploegh, H.L. (2007) *EMBO J.*, **26**, 3474–3483.
156. Hicke, L., Dunn, R. (2003) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 141–172.
157. Muratani, M., Tansey, W.P. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **4**, 192–201.
158. Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., Jentsch, S. (2002) *Nature*, **419**, 135–141.
159. Stelter, P., Ulrich, H.D. (2003) *Nature*, **425**, 188–191.
160. Gregory, R.C., Taniguchi, T., D'Andrea, A.D. (2003) *Semin. Cancer Biol.*, **13**, 77–82.
161. Haglund, K., Di Fiore, P.P., Dikic, I. (2003) *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 598–603.
162. Pickart, C.M., Fushman, D. (2004) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 610–616.
163. Varadan, R., Walker, O., Pickart, C., Fushman, D. (2002) *J. Mol. Biol.*, **324**, 637–647.
164. Varadan, R., Assfalg, M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C., Fushman, D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 7055–7063.
165. Hershko, A., Ciechanover, A. (1998) *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425–479.
166. Wu, C.J., Conze, D.B., Li, T., Srinivasula, S.M., Ashwell, J.D. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 398–406.
167. Hofmann, R.M., Pickart, C.M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 27936–27943.
168. Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., Gygi, S.P. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21**, 921–926.
169. Kim, I., Rao, H. (2006) *Sci. STKE*, **2006**, pe18.
170. Jentsch, S., Pyrowolakis, G. (2000) *Trends Cell Biol.*, **10**, 335–342.
171. Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D., Hay, R.T. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 1043–1054.
172. Seeler, J.S., Dejean, A. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **4**, 690–699.
173. Muller, S., Ledl, A., Schmidt, D. (2004) *Oncogene*, **23**, 1998–2008.
174. Meluh, P.B., Koshland, D. (1995) *Mol. Biol. Cell*, **6**, 793–807.
175. Bohren, K.M., Nadkarni, V., Song, J.H., Gabbay, K.H., Owerbach, D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 27233–27238.
176. Hochstrasser, M. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 901–907.
177. Xirodimas, D.P., Saville, M.K., Bourdon, J.C., Hay, R.T., Lane, D.P. (2004) *Cell*, **118**, 83–97.
178. Korant, B. D., Blomstrom, D.C., Jonak, G.J., Knight, E., Jr. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 14835–14839.
179. Malakhova, O.A., Yan, M., Malakhov, M.P., Yuan, Y., Ritchie, K.J., Kim, K.I., Peterson, L.F., Shuai, K., Zhang, D.E. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 455–460.
180. Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J.M., Gygi, S., Krug, R.M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 10200–10205.
181. Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E. (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 2503–2518.
182. Ohsumi, Y. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**, 211–216.
183. Raasi, S., Schmidtke, G., Groettrup, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 35334–35343.
184. Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., Iemura, S., Tanida, I., Okazaki, N., Ueno, T., Kominami, E., Natsume,

- T., Tanaka, K. (2004) EMBO J., **23**, 1977–1986.
185. Sasakawa, H., Sakata, E., Yamaguchi, Y., Komatsu, M., Tatsumi, K., Kominami, E., Tanaka, K., Kato, K. (2006) Biochem. Biophys. Res. Commun., **343**, 21–26.
186. Orłowski, M., Wilk, S. (2003) Arch. Biochem. Biophys., **415**, 1–5.
187. Li, X., Amazit, L., Long, W., Lonard, D.M., Monaco, J.J., O'Malley, B.W. (2007) Mol. Cell, **26**, 831–842.
188. Tofaris, G.K., Layfield, R., Spillantini, M.G. (2001) FEBS Lett., **509**, 22–26.
189. Lin, L., DeMartino, G.N., Greene, W.C. (1998) Cell, **92**, 819–828.
190. Bercovich, Z., Rosenberg-Hasson, Y., Ciechanover, A., Kahana, C. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 15949–15952.
191. Jin, Y., Lee, H., Zeng, S.X., Dai, M.S., Lu, H. (2003) EMBO J., **22**, 6365–6377.
192. David, D.C., Layfield, R., Serpell, L., Narain, Y., Goedert, M., Spillantini, M.G. (2002) J. Neurochem., **83**, 176–185.
193. Amici, M., Sagratini, D., Pettinari, A., Pucciarelli, S., Angeletti, M., Eleuteri, A.M. (2004) Arch. Biochem. Biophys., **422**, 168–174.
194. Ju, D., Xie, Y. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 23851–23854.
195. Asher, G., Tsvetkov, P., Kahana, C., Shaul, Y. (2005) Genes Dev., **19**, 316–321.
196. Kong, X., Lin, Z., Liang, D., Fath, D., Sang, N., Caro, J. (2006) Mol. Cell. Biol., **26**, 2019–2028.
197. Ying, H., Xiao, Z. X. (2006) Cell Cycle, **5**, 506–508.
198. Moorthy, A.K., Savinova, O.V., Ho, J.Q., Wang, V.Y., Vu, D., Ghosh, G. (2006) EMBO J., **25**, 1945–1956.
199. Pande, A.H., Moe, D., Jannadas, M., Tatulian, S.A., Teter, K. (2006) Biochemistry, **45**, 13734–13740.
200. Ito, T., Fujio, Y., Takahashi, K., Azuma, J. (2007) J. Biol. Chem., **282**, 1152–1160.
201. Lim, S.K., Gopalan, G. (2007) Biochem. J., **403**, 119–127.
202. Voigt, A., Salzmann, U., Seifert, U., Dathe, M., Soza, A., Kloetzel, P.M., Kuckelkorn, U. (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun., **355**, 549–554.
203. Chen, C., Zhou, Z., Guo, P., Dong, J.T. (2007) FEBS Lett., **581**, 1124–1130.
204. Yuksek, K., Chen, W.L., Chien, D., Ou, J.H. (2009) J. Virol., **83**, 612–621.
205. Jariel-Encontre, I., Pariat, M., Martin, F., Carillo, S., Salvat, C., Piechaczyk, M. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 11623–11627.
206. Tarcsa, E., Szymanska, G., Lecker, S., O'Connor, C.M., Goldberg, A.L. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 20295–20301.
207. Benaroudj, N., Tarcsa, E., Cascio, P., Goldberg, A.L. (2001) Biochimie, **83**, 311–318.
208. Grune, T., Reinheckel, T., Davies, K.J. (1997) FASEB J., **11**, 526–534.
209. Fink, A.L. (2005) Curr. Opin. Struct. Biol., **15**, 35–41.
210. Wright, P.E., Dyson, H.J. (1999) J. Mol. Biol., **293**, 321–331.
211. Davies, K.J. (2001) Biochimie, **83**, 301–310.
212. Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., Ichihara, A. (1992) Nature, **360**, 597–599.
213. Jariel-Encontre, I., Bossis, G., Piechaczyk, M. (2008) Biochim. Biophys. Acta, **1786**, 153–177.
214. Zhang, M., Pickart, C.M., Coffino, P. (2003) EMBO J., **22**, 1488–1496.
215. Blagosklonny, M.V., Wu, G.S., Omura, S., el-Deiry, W.S. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., **227**, 564–569.

216. Kim, G.Y., Mercer, S.E., Ewton, D.Z., Yan, Z., Jin, K., Friedman, E. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 29792–29802.
217. Jascur, T., Brickner, H., Salles-Pasador, I., Barbier, V., El Khissin, A., Smith, B., Fotedar, R., Fotedar, A. (2005) *Mol. Cell*, **17**, 237–249.
218. Chen, X., Barton, L.F., Chi, Y., Clurman, B.E., Roberts, J.M. (2007) *Mol. Cell*, **26**, 843–852.
219. Touitou, R., Richardson, J., Bose, S., Nakanishi, M., Rivett, J., Allday, M. J. (2001) *EMBO J.*, **20**, 2367–2375.
220. Kriwacki, R.W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S.I., Wright, P.E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11504–11509.
221. Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J. (2000) *Nature*, **408**, 307–310.
222. zur Hausen, H. (2000) *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**, 690–698.
223. Camus, S., Menendez, S., Cheok, C. F., Stevenson, L.F., Lain, S., Lane, D.P. (2007) *Oncogene*, **26**, 4059–4070.
224. Anwar, A., Dehn, D., Siegel, D., Kepa, J.K., Tang, L.J., Pietenpol, J.A., Ross, D. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 10368–10373.
225. Asher, G., Reuven, N., Shaul, Y. (2006) *Bioessays*, **28**, 844–849.
226. Classon, M., Harlow, E. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 910–917.
227. Scheffner, M., Whitaker, N.J. (2003) *Semin. Cancer Biol.*, **13**, 59–67.
228. Knight, J.S., Sharma, N., Robertson, E.S. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 18562–18566.
229. Munakata, T., Nakamura, M., Liang, Y., Li, K., Lemon, S.M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 18159–18164.
230. Kalejta, R.F., Bechtel, J. T., Shenk, T. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 1885–1895.
231. Sdek, P., Ying, H., Chang, D.L., Qiu, W., Zheng, H., Touitou, R., Allday, M.J., Xiao, Z.X. (2005) *Mol. Cell*, **20**, 699–708.
232. Uchida, C., Miwa, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Isobe, T., Otani, S., Oda, T., Sugimura, H., Kamijo, T., Ookawa, K., Yasuda, H., Kitagawa, M. (2005) *EMBO J.*, **24**, 160–169.
233. Neumann, M., Naumann, M. (2007) *FASEB J.*, **21**, 2642–2654.
234. Coux, O., Goldberg, A.L. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 8820–8828.
235. Beinke, S., Deka, J., Lang, V., Bellich, M.P., Walker, P. A., Howell, S., Smerdon, S.J., Gamblin, S.J., Ley, S.C. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 4739–4752.
236. Li, Z., Zhang, J., Chen, D., Shu, H.B. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **309**, 980–985.
237. Zhang, J., Xu, L.G., Han, K.J., Shu, H.B. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 17819–17825.
238. Ferrier, R., Nougarede, R., Doucet, S., Kahn-Perles, B., Imbert, J., Mathieu-Mahul, D. (1999) *Oncogene*, **18**, 995–1005.
239. Lang, V., Janzen, J., Fischer, G.Z., Soneji, Y., Beinke, S., Salmeron, A., Allen, H., Hay, R.T., Ben-Neriah, Y., Ley, S.C. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 402–413.
240. Skabkin, M.A., Liabin, D.N., Ovchinnikov, L.P. (2006) *Mol. Biol. (Mosc.)*, **40**, 620–633.
241. Stenina, O.I., Poptic, E.J., DiCorleto, P.E. (2000) *J. Clin. Invest.*, **106**, 579–587.
242. Jurchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Dietel, M., Royer, H.D. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 27988–27996.
243. Lutz, M., Wempe, F., Bahr, I., Zopf, D., von Melchner, H. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 3921–3930.

244. Chibi, M., Meyer, M., Skepu, A., G Rees, D.J., Moolman-Smook, J.C., Pugh, D.J. (2008) *J. Mol. Biol.*, **384**, 908–916.
245. Baugh, J.M., Pilipenko, E.V. (2004) *Mol. Cell*, **16**, 575–586.
246. Jackson, R.J. (2005) *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 1231–1241.
247. Qin, X., Sarnow, P. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 13721–13728.
248. Konstantinova, I.M., Tsimokha, A.S., Mittenberg, A.G. (2008) *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **267**, 59–124.
249. Ma, J., Katz, E., Belote, J.M. (2002) *Insect Mol. Biol.*, **11**, 627–639.
250. 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. (2000) *EMBO J.*, **19**, 4144–4153.
251. Xie, Y., Varshavsky, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3056–3061.
252. Ju, D., Wang, L., Mao, X., Xie, Y. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **321**, 51–57.
253. Kumatori, A., Tanaka, K., Inamura, N., Sone, S., Ogura, T., Matsumoto, T., Tachikawa, T., Shin, S., Ichihara, A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7071–7075.
254. Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., Kloetzel, P.M., Kruger, E. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 21517–21525.
255. Rivett, A.J., Palmer, A., Knecht, E. (1992) *J. Histochem. Cytochem.*, **40**, 1165–1172.
256. Wojcik, C., Benchaib, M., Lornage, J., Czyba, J.C., Guerin, J.F. (2000) *Mol. Hum. Reprod.*, **6**, 331–336.
257. Wojcik, C., Benchaib, M., Lornage, J., Czyba, J.C., Guerin, J.F. (2000) *Int. J. Androl.*, **23**, 169–177.
258. Lafarga, M., Fernandez, R., Mayo, I., Berciano, M.T., Castano, J.G. (2002) *Glia*, **38**, 313–328.
259. Nurse, P. (2000) *Cell*, **100**, 71–78.
260. Johnson, D.G., Walker, C.L. (1999) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 295–312.
261. Nederlof, P.M., Wang, H.R., Baumeister, W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12060–12064.
262. Wang, H.R., Kania, M., Baumeister, W., Nederlof, P.M. (1997) *Eur. J. Cell Biol.*, **73**, 105–113.
263. Sorokin, A.V., Kim, E.R., Ovchinnikov, L.P. (2007) *Biochemistry (Mosc.)*, **72**, 1439–1457.
264. Tanaka, K., Yoshimura, T., Tamura, T., Fujiwara, T., Kumatori, A., Ichihara, A. (1990) *FEBS Lett.*, **271**, 41–46.
265. Benedict, C.M., Ren, L., Clawson, G.A. (1995) *Biochemistry*, **34**, 9587–9598.
266. Wada, M., Kosaka, M., Saito, S., Sano, T., Tanaka, K., Ichihara, A. (1993) *J. Lab. Clin. Med.*, **121**, 215–223.
267. Feist, E., Brychcy, M., Hausdorf, G., Hoyer, B., Egerer, K., Dorner, T., Kuckelkorn, U., Burmester, G.R. (2007) *Ann. Rheum. Dis.*, **66**, 5–11.
268. Jakob, C., Egerer, K., Liebisch, P., Turkmen, S., Zavrski, I., Kuckelkorn, U., Heider, U., Kaiser, M., Fleissner, C., Sterz, J., Kleeberg, L., Feist, E., Burmester, G.R., Kloetzel, P.M., Sezer, O. (2007) *Blood*, **109**, 2100–2105.
269. Zong, C., Gomes, A.V., Drews, O., Li, X., Young, G.W., Berhane, B., Qiao, X., French, S.W., Bardag-Gorce, F., Ping, P. (2006) *Circ. Res.*, **99**, 372–380.
270. Bose, S., Mason, G.G., Rivett, A.J. (1999) *Mol. Biol. Rep.*, **26**, 11–14.
271. Bose, S., Brooks, P., Mason, G.G., Rivett, A.J. (2001) *Biochem. J.*, **353**, 291–297.

272. Bose, S., Stratford, F.L., Broadfoot, K.I., Mason, G.G., Rivett, A.J. (2004) *Biochem. J.*, **378**, 177–184.
273. Arendt, C.S., Hochstrasser, M. (1999) *EMBO J.*, **18**, 3575–3585.
274. Demasi, M., Silva, G.M., Netto, L.E. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 679–685.
275. Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J., Kudlow, J.E. (2003) *Cell*, **115**, 715–725.
276. Sun, X.M., Butterworth, M., MacFarlane, M., Dubiel, W., Ciechanover, A., Cohen, G.M. (2004) *Mol. Cell*, **14**, 81–93.
277. Medicherla, B., Kostova, Z., Schaefer, A., Wolf, D.H. (2004) *EMBO Rep.*, **5**, 692–697.
278. Schaubert, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., Potts, W., Madura, K. (1998) *Nature*, **391**, 715–718.
279. Meyer, H.H., Wang, Y., Warren, G. (2002) *EMBO J.*, **21**, 5645–5652.
280. Chumakov, P.M. (2007) *Biochemistry (Mosc)*, **72**, 1399–1421.
281. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M. (1997) *Nature*, **387**, 296–299.
282. Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Howley, P.M. (1993) *Mol. Cell Biol.*, **13**, 775–784.
283. Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., Howley, P.M. (1993) *Cell*, **75**, 495–505.
284. Dornan, D., Bheddah, S., Newton, K., Ince, W., Frantz, G.D., Dowd, P., Koepfen, H., Dixit, V.M., French, D.M. (2004) *Cancer Res.*, **64**, 7226–7230.
285. Leng, R.P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J.M., Lozano, G., Hakem, R., Benchimol, S. (2003) *Cell*, **112**, 779–791.
286. Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J., Gu, W. (2005) *Cell*, **121**, 1071–1083.
287. Rajendra, R., Malegaonkar, D., Pungaliya, P., Marshall, H., Rasheed, Z., Brownell, J., Liu, L.F., Lutzker, S., Saleem, A., Rubin, E.H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 36440–36444.
288. Esser, C., Scheffner, M., Hohfeld, J. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 27443–27448.
289. Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L., Vogelstein, B. (1992) *Nature*, **358**, 80–83.
290. Forslund, A., Zeng, Z., Qin, L.X., Rosenberg, S., Ndubuisi, M., Pincas, H., Gerald, W., Notterman, D.A., Barany, F., Paty, P.B. (2008) *Mol. Cancer Res.*, **6**, 205–211.
291. Bueso-Ramos, C.E., Manshour, T., Haidar, M.A., Yang, Y., McCown, P., Ordonez, N., Glassman, A., Sneige, N., Albitar, M. (1996) *Breast Cancer Res. Treat.*, **37**, 179–188.
292. Lianes, P., Orlow, I., Zhang, Z.F., Oliva, M.R., Sarkis, A.S., Reuter, V.E., Cordon-Cardo, C. (1994) *J. Natl. Cancer Inst.*, **86**, 1325–1330.
293. Lim, K.P., Sharifah, H., Lau, S.H., Teo, S.H., Cheong, S.C. (2005) *Oncol Rep.*, **14**, 963–968.
294. Lukas, J., Gao, D.Q., Keshmeshian, M., Wen, W.H., Tsao-Wei, D., Rosenberg, S., Press, M.F. (2001) *Cancer Res.*, **61**, 3212–3219.
295. Bartel, F., Taubert, H., Harris, L.C. (2002) *Cancer Cell*, **2**, 9–15.
296. Bond, G.L., Hu, W., Bond, E.E., Robins, H., Lutzker, S.G., Arva, N.C., Bargonetti, J., Bartel, F., Taubert, H., Wuerl, P., Onel, K., Yip, L., Hwang, S.J., Strong, L.C., Lozano, G., Levine, A.J. (2004) *Cell*, **119**, 591–602.
297. Alhopuro, P., Ylisaukko-Oja, S.K., Koskinen, W.J., Bono, P., Arola, J., Jarvinen, H.J., Mecklin, J.P., Atula, T., Kontio, R., Makitie, A.A., Suominen, S., Leivo, I., Vahteristo, P., Aaltonen, L.M., Aaltonen, L.A. (2005) *J. Med. Genet.*, **42**, 694–698.

298. *Sotamaa, K., Liyanarachchi, S., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., de la Chapelle, A.* (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 6840–6844.
299. *Zainuddin, N., Berglund, M., Wanders, A., Ren, Z.P., Amini, R.M., Lindell, M., Kanduri, M., Roos, G., Rosenquist, R., Enblad, G.* (2009) *Leuk. Res.*, **33**, 60–66.
300. *Lind, H., Zienolddiny, S., Ekstrom, P.O., Skaug, V., Haugen, A.* (2006) *Int. J. Cancer*, **119**, 718–721.
301. *Bond, G.L., Menin, C., Bertorelle, R., Alhopuro, P., Aaltonen, L.A., Levine, A.J.* (2006) *J. Med. Genet.*, **43**, 950–952.
302. *Han, J.Y., Lim, H.S., Yoo, Y.K., Shin, E.S., Park, Y.H., Lee, S.Y., Lee, J.E., Lee, D.H., Kim, H.T., Lee, J.S.* (2007) *Cancer*, **110**, 138–147.
303. *Bougeard, G., Baert-Desurmont, S., Tournier, I., Vasseur, S., Martin, C., Brugieres, L., Chompret, A., Bressac-de Paillerets, B., Stoppa-Lyonnet, D., Bonaiti-Pellie, C., Frebourg, T.* (2006) *J. Med. Genet.*, **43**, 531–533.
304. *Menin, C., Scaini, M.C., De Salvo, G.L., Biscuola, M., Quaggio, M., Esposito, G., Belluco, C., Montagna, M., Agata, S., D'Andrea, E., Nitti, D., Amadori, A., Bertorelle, R.* (2006) *J. Natl. Cancer Inst.*, **98**, 285–288.
305. *Bouska, A., Lushnikova, T., Plaza, S., Eischen, C.M.* (2008) *Mol. Cell Biol.*, **28**, 4862–4874.
306. *Dawson, S., Apcher, S., Mee, M., Higashitsuji, H., Baker, R., Uhle, S., Dubiel, W., Fujita, J., Mayer, R.J.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 10893–10902.
307. *Higashitsuji, H., Itoh, K., Sakurai, T., Nagao, T., Sumitomo, Y., Masuda, T., Dawson, S., Shimada, Y., Mayer, R.J., Fujita, J.* (2005) *Cancer Cell*, **8**, 75–87.
308. *Higashitsuji, H., Liu, Y., Mayer, R.J., Fujita, J.* (2005) *Cell Cycle*, **4**, 1335–1337.
309. *Yoon, S.Y., Lee, Y., Kim, J.H., Chung, A.S., Joo, J.H., Kim, C.N., Kim, N.S., Choe, I.S., Kim, J.W.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **326**, 7–17.
310. *Duan, W., Gao, L., Druhan, L.J., Zhu, W.G., Morrison, C., Otterson, G.A., Villalona-Calero, M.A.* (2004) *J. Natl. Cancer Inst.*, **96**, 1718–1721.
311. *Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J.C., Howley, P.M.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5523–5527.
312. *Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., Howley, P.M.* (1990) *Cell*, **63**, 1129–1136.
313. *Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Howley, P.M.* (1991) *EMBO J.*, **10**, 4129–4135.
314. *Thomas, M., Pim, D., Banks, L.* (1999) *Oncogene*, **18**, 7690–7700.
315. *Beer-Romero, P., Glass, S., Rolfe, M.* (1997) *Oncogene*, **14**, 595–602.
316. *Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Howley, P.M.* (1993) *Mol. Cell Biol.*, **13**, 4918–4927.
317. *Sherr, C.J., Roberts, J.M.* (1999) *Genes Dev.*, **13**, 1501–1512.
318. *Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A., Pagano, M.* (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 193–199.
319. *Sutterluty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Muller, U., Krek, W.* (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 207–214.
320. *Ganoth, D., Bornstein, G., Ko, T.K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M., Hershko, A.* (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**, 321–324.
321. *Spruck, C., Strohmaier, H., Watson, M., Smith, A.P., Ryan, A., Krek, T.W., Reed, S.I.* (2001) *Mol. Cell*, **7**, 639–650.

322. Lahav-Baratz, S., Ben-Izhak, O., Sabo, E., Ben-Eliezer, S., Lavie, O., Ishai, D., Ciechanover, A., Dirnfeld, M. (2004) *Mol. Hum. Reprod.*, **10**, 567–572.
323. Slotky, M., Shapira, M., Ben-Izhak, O., Linn, S., Futerman, B., Tsalic, M., Hershko, D.D. (2005) *Breast Cancer Res.*, **7**, R737–744.
324. Hershko, D.D., Shapira, M. (2006) *Cancer*, **107**, 668–675.
325. Kudo, Y., Kitajima, S., Sato, S., Miyauchi, M., Ogawa, I., Takata, T. (2001) *Cancer Res.*, **61**, 7044–7047.
326. Huang, H.Y., Kang, H.Y., Li, C.F., Eng, H.L., Chou, S.C., Lin, C.N., Hsiung, C.Y. (2006) *Clin. Cancer Res.*, **12**, 487–498.
327. Inui, N., Kitagawa, K., Miwa, S., Hattori, T., Chida, K., Nakamura, H., Kitagawa, M. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**, 978–984.
328. Kitajima, S., Kudo, Y., Ogawa, I., Bashir, T., Kitagawa, M., Miyauchi, M., Pagano, M., Takata, T. (2004) *Am. J. Pathol.*, **165**, 2147–2155.
329. Yokoi, S., Yasui, K., Mori, M., Iizasa, T., Fujisawa, T., Inazawa, J. (2004) *Am. J. Pathol.*, **165**, 175–180.
330. Yu, Z.K., Gervais, J.L., Zhang, H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11324–11329.
331. Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nakayama, K. I. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 10231–10236.
332. Tedesco, D., Lukas, J., Reed, S.I. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 2946–2957.
333. Huang, H., Regan, K.M., Wang, F., Wang, D., Smith, D.I., van Deursen, J.M., Tindall, D.J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1649–1654.
334. Kim, W.Y., Kaelin, W.G. (2004) *J. Clin. Oncol.*, **22**, 4991–5004.
335. Igarashi, H., Esumi, M., Ishida, H., Okada, K. (2002) *Cancer*, **95**, 47–53.
336. Stratmann, R., Krieg, M., Haas, R., Plate, K.H. (1997) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **56**, 1242–1252.
337. Lisztwan, J., Imbert, G., Wirbelauer, C., Gstaiger, M., Krek, W. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 1822–1833.
338. Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Klausner, R.D., Pause, A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12436–12441.
339. Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., Ratcliffe, P.J. (1999) *Nature*, **399**, 271–275.
340. Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., Poellinger, L. (2000) *EMBO J.*, **19**, 4298–4309.
341. Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Maxwell, P.H. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 25733–25741.
342. Duan, D.R., Pause, A., Burgess, W.H., Aso, T., Chen, D.Y., Garrett, K.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Linehan, W.M., Klausner, R.D. (1995) *Science*, **269**, 1402–1406.
343. Pause, A., Lee, S., Worrell, R.A., Chen, D.Y., Burgess, W.H., Linehan, W.M., Klausner, R.D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2156–2161.
344. Kamura, T., Koepp, D.M., Conrad, M.N., Skowyra, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Jr., Elledge, S.J., Conaway, R.C., Harper, J.W., Conaway, J.W. (1999) *Science*, **284**, 657–661.
345. Patiar, S., Harris, A.L. (2006) *Endocr. Relat. Cancer*, **13 Suppl 1**, S61–75.
346. Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H.F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7987–7992.
347. Bruick, R.K., McKnight, S.L. (2001) *Science*, **294**, 1337–1340.

348. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Jr. (2001) *Science*, **292**, 464–468.
349. Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. (2001) *Science*, **292**, 468–472.
350. Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. (2001) *EMBO J.*, **20**, 5197–5206.
351. Yu, F., White, S.B., Zhao, Q., Lee, F.S. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9630–9635.
352. Gayther, S.A., Russell, P., Harrington, P., Antoniou, A.C., Easton, D.F., Ponder, B.A. (1999) *Am. J. Hum. Genet.*, **65**, 1021–1029.
353. Staff, S., Isola, J., Tanner, M. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 4978–4983.
354. Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lonning, P.E., Brown, P.O., Borresen-Dale, A.L., Botstein, D. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8418–8423.
355. Turner, N.C., Reis-Filho, J.S., Russell, A.M., Springall, R.J., Ryder, K., Steele, D., Savage, K., Gillett, C.E., Schmitt, F.C., Ashworth, A., Tutt, A.N. (2007) *Oncogene*, **26**, 2126–2132.
356. Wu, L.C., Wang, Z.W., Tsan, J.T., Spillman, M.A., Phung, A., Xu, X. L., Yang, M.C., Hwang, L.Y., Bowcock, A.M., Baer, R. (1996) *Nat. Genet.*, **14**, 430–440.
357. Thai, T.H., Du, F., Tsan, J.T., Jin, Y., Phung, A., Spillman, M.A., Massa, H.F., Muller, C.Y., Ashfaq, R., Mathis, J.M., Miller, D.S., Trask, B.J., Baer, R., Bowcock, A.M. (1998) *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 195–202.
358. Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., Ogata, H., Ohta, T. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 14537–14540.
359. Chen, A., Kleiman, F.E., Manley, J.L., Ouchi, T., Pan, Z.Q. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 22085–22092.
360. Mallery, D.L., Vandenberg, C.J., Hiom, K. (2002) *EMBO J.*, **21**, 6755–6762.
361. Joukov, V., Chen, J., Fox, E.A., Green, J.B., Livingston, D.M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12078–12083.
362. Baer, R., Ludwig, T. (2002) *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 86–91.
363. Shakya, R., Szabolcs, M., McCarthy, E., Ospina, E., Basso, K., Nandula, S., Murty, V., Baer, R., Ludwig, T. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7040–7045.
364. Xia, Y., Pao, G.M., Chen, H.W., Verma, I.M., Hunter, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 5255–5263.
365. Starita, L. M., Machida, Y., Sankaran, S., Elias, J.E., Griffin, K., Schlegel, B.P., Gygi, S.P., Parvin, J.D. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 8457–8466.
366. Starita, L.M., Horwitz, A.A., Keogh, M.C., Ishioka, C., Parvin, J.D., Chiba, N. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 24498–24505.
367. Eakin, C.M., Maccoss, M.J., Finney, G.L., Klevit, R.E. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5794–5799.
368. Starita, L.M., Parvin, J.D. (2006) *Cancer Biol. Ther.*, **5**, 137–141.
369. Reinstein, E., Ciechanover, A. (2006) *Ann. Intern. Med.*, **145**, 676–684.
370. Debigare, R., Price, S.R. (2003) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **285**, F1–8.
371. Snyder, P.M. (2005) *Endocrinology*, **146**, 5079–5085.
372. Shimkets, R.A., Warnock, D.G., Bositis, C.M., Nelson-Williams, C.,

- Hansson, J.H., Schambelan, M., Gill, J.R., Jr., Ulick, S., Milora, R.V., Findling, J.W., et al. (1994) *Cell*, **79**, 407–414.
373. Firsov, D., Schild, L., Gautschi, I., Merillat, A.M., Schneeberger, E., Rossier, B.C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15370–15375.
374. Schild, L., Lu, Y., Gautschi, I., Schneeberger, E., Lifton, R.P., Rossier, B.C. (1996) *EMBO J.*, **15**, 2381–2387.
375. Hansson, J.H., Schild, L., Lu, Y., Wilson, T.A., Gautschi, I., Shimkets, R., Nelson-Williams, C., Rossier, B.C., Lifton, R.P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11495–11499.
376. Tamura, H., Schild, L., Enomoto, N., Matsui, N., Marumo, F., Rossier, B.C. (1996) *J. Clin. Invest.*, **97**, 1780–1784.
377. Inoue, J., Iwaoka, T., Tokunaga, H., Takamune, K., Naomi, S., Araki, M., Takahama, K., Yamaguchi, K., Tomita, K. (1998) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 2210–2213.
378. Furuhashi, M., Kitamura, K., Adachi, M., Miyoshi, T., Wakida, N., Ura, N., Shikano, Y., Shinshi, Y., Sakamoto, K., Hayashi, M., Satoh, N., Nishitani, T., Tomita, K., Shimamoto, K. (2005) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **90**, 340–344.
379. Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., Rotin, D. (1996) *EMBO J.*, **15**, 2371–2380.
380. Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L., Rotin, D. (1997) *EMBO J.*, **16**, 6325–6336.
381. Goulet, C.C., Volk, K.A., Adams, C.M., Prince, L.S., Stokes, J.B., Snyder, P.M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 30012–30017.
382. Abriel, H., Loffing, J., Rebhun, J.F., Pratt, J.H., Schild, L., Horisberger, J.D., Rotin, D., Staub, O. (1999) *J. Clin. Invest.*, **103**, 667–673.
383. Harvey, K.F., Dinudom, A., Cook, D.I., Kumar, S. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 8597–8601.
384. Snyder, P.M., Steines, J.C., Olson, D.R. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 5042–5046.
385. Zhou, R., Patel, S.V., Snyder, P.M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 20207–20212.
386. Wiemuth, D., Ke, Y., Rohlf, M., McDonald, F.J. (2007) *Biochem. J.*, **405**, 147–155.
387. Knight, K.K., Olson, D.R., Zhou, R., Snyder, P.M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2805–2808.
388. Sieradzian, K.A., Mehan, A.O., Jones, L., Wanker, E.E., Nukina, N., Mann, D.M. (1999) *Exp. Neurol.*, **156**, 92–99.
389. Ii, K., Ito, H., Tanaka, K., Hirano, A. (1997) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **56**, 125–131.
390. Kuzuhara, S., Mori, H., Izumiyama, N., Yoshimura, M., Ihara, Y. (1988) *Acta Neuropathol.*, **75**, 345–353.
391. Ciechanover, A., Brundin, P. (2003) *Neuron*, **40**, 427–446.
392. Sawada, H., Kohno, R., Kihara, T., Izumi, Y., Sakka, N., Ibi, M., Nakaniishi, M., Nakamizo, T., Yamakawa, K., Shibasaki, H., Yamamoto, N., Akaike, A., Inden, M., Kitamura, Y., Taniguchi, T., Shimohama, S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 10710–10719.
393. Rideout, H.J., Larsen, K.E., Sulzer, D., Stefanis, L. (2001) *J. Neurochem.*, **78**, 899–908.
394. Sun, F., Anantharam, V., Zhang, D., Latchoumycandane, C., Kanthasamy, A., Kanthasamy, A.G. (2006) *Neurotoxicology*, **27**, 807–815.
395. McNaught, K.S., Jenner, P. (2001) *Neurosci Lett*, **297**, 191–194.
396. Bence, N.F., Sampat, R.M., Kopito, R.R. (2001) *Science*, **292**, 1552–1555.
397. Zhang, N.Y., Tang, Z., Liu, C.W. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 20288–20298.

398. Emmanouilidou, E., Stefanis, L., Vekrellis, K. (2008) *Neurobiol. Aging*.
399. Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanasiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L. (1997) *Science*, **276**, 2045–2047.
400. Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N. (1998) *Nature*, **392**, 605–608.
401. Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z., Lansbury, P.T., Jr. (2002) *Cell*, **111**, 209–218.
402. Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G., Wood, N.W. (2004) *Science*, **304**, 1158–1160.
403. Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J.W., Vanacore, N., van Swieten, J.C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C.M., Oostra, B.A., Heutink, P. (2003) *Science*, **299**, 256–259.
404. Zhang, Y., Gao, J., Chung, K.K., Huang, H., Dawson, V.L., Dawson, T.M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13354–13359.
405. Chung, K.K., Zhang, Y., Lim, K.L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C.A., Dawson, V.L., Dawson, T.M. (2001) *Nat. Med.*, **7**, 1144–1150.
406. Shimura, H., Schlossmacher, M.G., Hattori, N., Frosch, M.P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K.S., Selkoe, D.J. (2001) *Science*, **293**, 263–269.
407. Sakata, E., Yamaguchi, Y., Kurimoto, E., Kikuchi, J., Yokoyama, S., Yamada, S., Kawahara, H., Yokosawa, H., Hattori, N., Mizuno, Y., Tanaka, K., Kato, K. (2003) *EMBO Rep.*, **4**, 301–306.
408. Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y., Takahashi, R. (2001) *Cell*, **105**, 891–902.
409. Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J., Ploegh, H.L. (1996) *Cell*, **84**, 769–779.
410. Kikkert, M., Hassink, G., Barel, M., Hirsch, C., van der Wal, F.J., Wiertz, E. (2001) *Biochem. J.*, **358**, 369–377.
411. Shamu, C.E., Flierman, D., Ploegh, H.L., Rapoport, T.A., Chau, V. (2001) *Mol. Biol. Cell*, **12**, 2546–2555.
412. Furman, M.H., Loureiro, J., Ploegh, H.L., Tortorella, D. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 34804–34811.
413. Hassink, G.C., Barel, M.T., Van Voorden, S.B., Kikkert, M., Wiertz, E.J. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 30063–30071.
414. Tirosh, B., Iwakoshi, N.N., Lilley, B.N., Lee, A.H., Glimcher, L.H., Ploegh, H.L. (2005) *J. Virol.*, **79**, 2768–2779.
415. Barel, M.T., Hassink, G.C., van Voorden, S., Wiertz, E.J. (2006) *Mol. Immunol.*, **43**, 1258–1266.
416. Khan, S., Zimmermann, A., Basler, M., Groettrup, M., Hengel, H. (2004) *J. Virol.*, **78**, 1831–1842.
417. Coscoy, L., Ganem, D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8051–8056.
418. Coscoy, L., Sanchez, D.J., Ganem, D. (2001) *J. Cell Biol.*, **155**, 1265–1273.
419. Boname, J. M., Stevenson, P.G. (2001) *Immunity*, **15**, 627–636.

420. Coscoy, L., Ganem, D. (2001) *J. Clin. Invest.*, **107**, 1599–1606.
421. Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G., Masucci, M.G. (1995) *Nature*, **375**, 685–688.
422. Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., Masucci, M.G. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12616–12621.
423. Zhang, M., Coffino, P. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 8635–8641.
424. Heessen, S., Leonchiks, A., Issaeva, N., Sharipo, A., Selivanova, G., Masucci, M.G., Dantuma, N.P. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1532–1537.
425. Andrejeva, J., Young, D.F., Goodbourn, S., Randall, R.E. (2002) *J. Virol.*, **76**, 2159–2167.
426. Ulane, C.M., Rodriguez, J.J., Parisien, J.P., Horvath, C.M. (2003) *J. Virol.*, **77**, 6385–6393.
427. Ulane, C.M., Kentsis, A., Cruz, C.D., Parisien, J.P., Schneider, K.L., Horvath, C.M. (2005) *J. Virol.*, **79**, 10180–10189.
428. Khu, Y.L., Tan, Y.J., Lim, S.G., Hong, W., Goh, P.Y. (2004) *Biochem. J.*, **384**, 401–409.
429. Van Waes, C. (2007) *Clin. Cancer Res.*, **13**, 1076–1082.
430. Egerer, K., Kuckelkorn, U., Rudolph, P.E., Ruckert, J.C., Dorner, T., Burmester, G.R., Kloetzel, P.M., Feist, E. (2002) *J. Rheumatol.*, **29**, 2045–2052.
431. Lavabre-Bertrand, T., Henry, L., Carillo, S., Guiraud, I., Ouali, A., Dutaud, D., Aubry, L., Rossi, J.F., Bureau, J.P. (2001) *Cancer*, **92**, 2493–2500.
432. Feist, E., Dorner, T., Kuckelkorn, U., Schmidtke, G., Micheel, B., Hiepe, F., Burmester, G.R., Kloetzel, P. M. (1996) *J. Exp. Med.*, **184**, 1313–1318.
433. Feist, E., Kuckelkorn, U., Dorner, T., Donitz, H., Scheffler, S., Hiepe, F., Kloetzel, P.M., Burmester, G.R. (1999) *Arthritis Rheum.*, **42**, 697–702.
434. Mayo, I., Arribas, J., Villoslada, P., Alvarez DoForno, R., Rodriguez-Vilarino, S., Montalban, X., De Sagarra, M.R., Castano, J.G. (2002) *Brain*, **125**, 2658–2667.
435. Matsushita, M., Takasaki, Y., Takeuchi, K., Yamada, H., Matsudaira, R., Hashimoto, H. (2004) *J. Rheumatol.*, **31**, 252–259.
436. Brychcy, M., Kuckelkorn, U., Hausdorf, G., Egerer, K., Kloetzel, P. M., Burmester, G. R., Feist, E. (2006) *Arthritis Rheum.*, **54**, 2175–2183.
437. Li, B., Tournier, C., Davis, R.J., Flavell, R.A. (1999) *EMBO J.*, **18**, 420–432.
438. Hartenstein, B., Teurich, S., Hess, J., Schenkel, J., Schorpp-Kistner, M., Angel, P. (2002) *EMBO J.*, **21**, 6321–6329.
439. Gao, M., Labuda, T., Xia, Y., Gallagher, E., Fang, D., Liu, Y.C., Karin, M. (2004) *Science*, **306**, 271–275.
440. Venuprasad, K., Elly, C., Gao, M., Salek-Ardakani, S., Harada, Y., Luo, J. L., Yang, C., Croft, M., Inoue, K., Karin, M., Liu, Y.C. (2006) *J. Clin. Invest.*, **116**, 1117–1126.
441. Tsao, P. W., Suzuki, T., Totsuka, R., Murata, T., Takagi, T., Ohmachi, Y., Fujimura, H., Takata, I. (1997) *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **83**, 173–178.
442. Firestein, G.S. (2004) *Arthritis Rheum.*, **50**, 2381–2386.
443. Kisselev, A.F., Goldberg, A.L. (2001) *Chem. Biol.*, **8**, 739–758.
444. An, B., Goldfarb, R.H., Siman, R., Dou, Q.P. (1998) *Cell Death Differ.*, **5**, 1062–1075.
445. Drexler, H.C., Risau, W., Konecny, M.A. (2000) *FASEB J.*, **14**, 65–77.

446. Chen, L., Smith, L., Wang, Z., Smith, J.B. (2003) *Mol. Pharmacol.*, **64**, 334–345.
447. Fribley, A., Wang, C.Y. (2006) *Cancer Biol. Ther.*, **5**, 745–748.
448. Roccaro, A.M., Hideshima, T., Raje, N., Kumar, S., Ishitsuka, K., Yasui, H., Shiraishi, N., Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Dammacco, F., Richardson, P.G., Anderson, K.C. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 184–191.
449. 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) *Cancer Res.*, **59**, 2615–2622.
450. Teicher, B.A., Ara, G., Herbst, R., Palombella, V.J., Adams, J. (1999) *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2638–2645.
451. Adams, J. (2002) *Oncologist*, **7**, 9–16.
452. Maki, R.G., Kraft, A.S., Scheu, K., Yamada, J., Wadler, S., Antonescu, C.R., Wright, J.J., Schwartz, G.K. (2005) *Cancer*, **103**, 1431–1438.
453. Markovic, S.N., Geyer, S.M., Dawkins, F., Sharfman, W., Albertini, M., Maples, W., Fracasso, P.M., Fitch, T., Lorusso, P., Adjei, A.A., Erlichman, C. (2005) *Cancer*, **103**, 2584–2589.
454. Richardson, P.G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, S.V., Srkalovic, G., Alsina, M., Alexanian, R., Siegel, D., Orłowski, R.Z., Kuter, D., Limentani, S.A., Lee, S., Hideshima, T., Esseltine, D.L., Kauffman, M., Adams, J., Schenkein, D.P., Anderson, K.C. (2003) *N. Engl. J. Med.*, **348**, 2609–2617.
455. Ludwig, H., Khayat, D., Giaccone, G., Facon, T. (2005) *Cancer*, **104**, 1794–1807.
456. Blade, J., Cibeira, M.T., Rosinol, L. (2005) *Acta Oncol.*, **44**, 440–448.
457. Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **42**, 355–357.
458. Ahn, K.S., Sethi, G., Chao, T.H., Neuteboom, S.T., Chaturvedi, M.M., Palladino, M.A., Younes, A., Aggarwal, B.B. (2007) *Blood*, **110**, 2286–2295.
459. Ruiz, S., Krupnik, Y., Keating, M., Chandra, J., Palladino, M., McConkey, D. (2006) *Mol Cancer Ther.*, **5**, 1836–1843.
460. Chauhan, D., Catley, L., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Velankar, M., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Yasui, H., Letai, A., Ova, H., Berkers, C., Nicholson, B., Chao, T.H., Neuteboom, S.T., Richardson, P., Palladino, M.A., Anderson, K.C. (2005) *Cancer Cell*, **8**, 407–419.
461. Yaron, A., Gonen, H., Alkalay, I., Hatzubai, A., Jung, S., Beyth, S., Mercurio, F., Manning, A.M., Ciechanover, A., Ben-Neriah, Y. (1997) *EMBO J.*, **16**, 6486–6494.
462. Yang, Y., Ludwig, R.L., Jensen, J.P., Pierre, S.A., Medaglia, M.V., Davydov, I.V., Safiran, Y.J., Oberoi, P., Kenten, J.H., Phillips, A.C., Weissman, A.M., Vousden, K.H. (2005) *Cancer Cell*, **7**, 547–559.
463. Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N., Liu, E.A. (2004) *Science*, **303**, 844–848.
464. LaRusch, G.A., Jackson, M.W., Dunbar, J.D., Warren, R.S., Donner, D.B., Mayo, L.D. (2007) *Cancer Res.*, **67**, 450–454.
465. Ambrosini, G., Sambol, E.B., Carvajal, D., Vassilev, L.T., Singer, S., Schwartz, G.K. (2007) *Oncogene*, **26**, 3473–3481.
466. Issaeva, N., Bozko, P., Enge, M., Protopopova, M., Verhoef, L. G., Masucci, M., Pramanik, A., Selivanova, G. (2004) *Nat. Med.*, **10**, 1321–1328.

467. Ding, K., Lu, Y., Nikolovska-Coleska, Z., Wang, G., Qiu, S., Shangary, S., Gao, W., Qin, D., Stuckey, J., Krajewski, K., Roller, P.P., Wang, S. (2006) *J. Med. Chem.*, **49**, 3432–3435.
468. Jones, R.J., Chen, Q., Voorhees, P.M., Young, K.H., Bruyey-Sedano, N., Yang, D., Orlowski, R.Z. (2008) *Clin. Cancer Res.*, **14**, 5416–5425.
469. Butz, K., Denk, C., Ullmann, A., Scheffner, M., Hoppe-Seyler, F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6693–6697.
470. Chen, Q., Xie, W., Kuhn, D.J., Voorhees, P.M., Lopez-Girona, A., Mendy, D., Corral, L.G., Krenitsky, V.P., Xu, W., Moutouh-de Parseval, L., Webb, D.R., Mercurio, F., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Orlowski, R.Z. (2008) *Blood*, **111**, 4690–4699.
471. Harris, J.R. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 534–537.
472. DeMartino, G.N., Goldberg, A.L. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 3712–3715.
473. Wilk, S., Orlowski, M. (1980) *J. Neurochem.*, **35**, 1172–1182.
474. Hase, J., Kobashi, K., Nakai, N., Mitsui, K., Iwata, K., Takadera, T. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **611**, 205–213.
475. Kleinschmidt, J.A., Hugle, B., Grund, C., Franke, W.W. (1983) *Eur. J. Cell Biol.*, **32**, 143–156.
476. Schmid, H.P., Akhayat, O., Martins De Sa, C., Puvion, F., Koehler, K., Scherrer, K. (1984) *EMBO J.*, **3**, 29–34.
477. Kloetzel, P.M., Falkenburg, P.E., Hossli, P., Glatzer, K.H. (1987) *Exp Cell Res*, **170**, 204–213.
478. Arrigo, A.P., Tanaka, K., Goldberg, A.L., Welch, W.J. (1988) *Nature*, **331**, 192–194.