

## ПРОТЕАСОМА: НАНОМАШИНЕРИЯ СОЗИДАТЕЛЬНОГО РАЗРУШЕНИЯ

©2019 г. А. А. КУДРЯЕВА<sup>1</sup>, А. А. БЕЛОГУРОВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва*

<sup>2</sup> *Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,  
Москва*

I. Введение. II. Убиквитин-протеасомная система. III. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Внутриклеточная концентрация полипептидов обуславливается скоростью их синтеза и деградации. Для поддержания гомеостаза клеточных белков, или протеостаза, в клетке существует комплексная и адаптивная система, контролирующая весь жизненный цикл белка: синтез, сворачивание, поддержание его правильной конформации, необходимого количества, субклеточную локализацию, а также деградацию. Так, например, в процессе трансляции происходит распознавание aberrantных молекул РНК и опосредуется деградация полипептидных продуктов с этих РНК [1–3]. Далее подавляющему большинству белков необходимо свернуться в заранее предопределенную трехмерную структуру, которая закодирована в его аминокислотной последовательности, что необходимо для их дальнейшего корректного функционирования. Некоторые белки должны обладать конформационной подвижностью, другие же имеют частично или даже полностью неупорядоченную структуру, что в свою очередь повышает риск неправильного сворачивания или даже агрегации таких белковых молекул [4]. Кроме того, белки с нарушенной конформацией могут появиться в результате генетических мутаций

---

Принятые сокращения: АЛС – аутофаго-лизосомная система, УПС – убиквитин-протеасомная система, ГКГС (МНС) – главный комплекс гистосовместимости, IFN – интерферон, МВР – основной белок миелина (myelin basic protein), ODC – орнитиндекарбоксилаза (ornithine decarboxylase), Ub – убиквитин.

*Адрес для корреспонденции:* anna.kudriaeva@gmail.com, belogurov@mx.ibch.ru

Работа поддержана грантом РФФ 14-14-00585-П.

или ошибок рибосомы, или уже свернутые белки могут утратить правильную структуру при денатурации, старении или химических модификациях. Таким образом, основной проблемой протеостаза является не только регуляция концентрации внутриклеточных белков, но и защита клетки от пагубного воздействия аномальных и потенциально токсичных белков, какими являются неправильно свернутые или поврежденные белки, которые могут серьезно нарушить клеточный метаболизм.

Белки, утратившие функциональную конформацию, подвергаются регулируемой деградации, в том числе котрансляционно, агрегировавшие же белковые молекулы также уничтожаются благодаря различным клеточным механизмам [5–7]. Во многих случаях в этом процессе участвуют молекулярные шапероны разных классов и их регуляторы, способствующие правильной укладке белка, а также поддержанию его в растворимом состоянии. Тем не менее, шапероны не только способствуют сворачиванию белков, но также участвуют в их деградации при неправильной укладке [8]. Резюмируя, можно утверждать, что поддержание протеостаза является абсолютно необходимым для клеточного метаболизма, биогенеза органелл и адаптации клетки к стрессу, что в значительной степени влияет на ее жизнеспособность [9].

На настоящий момент аутофаго-лизосомная (АЛС) и убиквитин-протеасомная системы (УПС) позиционируются в качестве основных протеолитических путей в клетке, однако в гидролизе белков также могут принимать участие внелизосомные протеазы – в первую очередь каспазы и кальпаины. Фундаментальное значение систем деградации было признано тремя Нобелевскими премиями: в 1974 году биохимик Кристиан де Дюв был удостоен Нобелевской премии по медицине и физиологии за свой вклад в раскрытие структурной и функциональной организации клетки (открытие лизосомы), в 2004 году Нобелевская премия по химии была совместно присуждена Аарону Чехановеру, Авраму Хершко и Ирвину Роузу за открытие убиквитин-опосредованной деградации белков, и в 2016 году Йошинори Осуми получил Нобелевскую премию по медицине и физиологии за открытие механизмов аутофагии.

Убиквитин-протеасомная система является основным механизмом деградации короткоживущих, неправильно свернутых, поврежденных, а также завершивших свою функцию белков. УПС активно участвует в клеточной передаче сигналов, транскрипции, а также в других клеточных функциях, таких как продвижение по клеточному циклу, пролиферация, апоптоз [10]. В свою очередь АЛС распознает

и удаляет большие и потенциально опасные клеточные компоненты, такие как белковые агрегаты и нефункциональные или избыточные органеллы, и является важным адаптивным механизмом для борьбы с различными клеточными стрессами, такими как уменьшение количества питательных веществ, гипоксия, окислительный стресс и т. д. [11]. Считается, что УПС и АЛС ответственны за приблизительно 80–90% и 10–20% клеточного протеолиза, соответственно, хотя данные соотношения могут меняться в зависимости от физиологических состояний и типа клеток [12, 13]. В цитозоле УПС и АЛС действуют одновременно, имеют общие компоненты и постоянно взаимодействуют между собой [14]. Убиквитинирование используется как сигнал деградации для маркировки субстратов в обеих системах. Дегроны белков, содержащие убиквитин (Ub, ubiquitin), распознаются и связываются белками, обладающими убиквитин-связывающими доменами (UBD, ubiquitin-binding domains) [15]. UBD расшифровывают полиубиквитиновый код (тип связи и длину цепи) и доставляют убиквитинированные субстраты к протеасоме (например, RAD23 и UBQLN) или к аутофагосомным вакуолям (например, p62 и BRCA1 (NBR1)), другие направляют белки к мишеням, не участвующим в протеолитических процессах, например, при повреждении ДНК и воспалении [16].

В данном обзоре мы рассмотрим механизмы работы УПС, а также пути ее регуляции. Так как гидролиз белков происходит непрерывно, данный процесс имеет важное физиологическое значение, а его нарушение приводит к множественным отклонениям в нормальном функционировании клетки, и, в конечном итоге, тяжелым заболеваниям. К таковым относят диабет и злокачественную трансформацию, а также ряд нейродегенеративных нарушений, таких как рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Крейтцфельда-Якоба и болезнь Хантингтона [17]. На настоящий момент очевидно, что деградация внутриклеточных белков является специфическим процессом, а их стабильность варьируется в широких пределах в зависимости как от свойств самого белка, так и от внешних факторов. Если в середине XX века постулировалось, что данный процесс является вероятностным и неконтролируемым, то в настоящий момент достоверно известно, что разрушение белков – это очень сложный и жестко регулируемый во времени и пространстве процесс, который играет невероятно важную роль в подавляющем большинстве метаболических путей.

## II. УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА

### ПРОТЕАСОМА

Протеасома представляет собой мультисубъединичный протеиназный комплекс, ответственный за деградацию большинства внутриклеточных белков. В дополнение к деградации завершивших свою функцию и поврежденных белков, протеасома регулирует многие важные клеточные процессы посредством контролируемой деградации белков, например, факторов транскрипции, регуляторов клеточного цикла и жизненно важных ферментов. Эукариотические протеасомы имеют три каталитические субъединицы:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$ , каждая из которых обладает своей субстратной специфичностью. Кроме того, известно, что разнообразные типы клеток содержат варианты протеасом с различными профилями активности и специфичности, функции этих пулов протеасом до сих пор изучены не полностью. Многие ингибиторы протеолитической активности протеасомы в настоящий момент применяются как лекарственные средства для лечения гематологических злокачественных новообразований, а также активно изучается возможность их применения для терапии других заболеваний, в том числе аутоиммунной природы.

Сигналом протеасомной деградации является цепь из молекул убиквитина, ковалентно связанная с белком-мишенью. Специфичность сигнала определяется длиной и структурой полиубиквитиновых цепей, которые распознаются рецепторами в составе регуляторных субчастиц протеасомы. На настоящий момент очевидно, что система убиквитин-опосредованной модификации является неоднозначной, так как известны как минимум семь функциональных остатков лизина, по которым может происходить рост полиубиквитиновой цепи. После связывания полипептидного субстрата с протеасомой посредством убиквитиновой метки происходит инициация его гидролиза в неупорядоченной области, которая сама по себе является одним из компонентов сигнала деградации.

Кроме убиквитин-зависимой деградации, существует также убиквитин-независимая деградация, в этом случае сигналом для протеолиза является либо последовательность внутри самого белка, либо некоторая вспомогательная молекула. На настоящий момент известно около двух десятков белков, подвергающихся гидролизу без предварительной модификации убиквитином. Например, некоторые протоонкобелки и белки-онкосупрессоры являются убиквитин-независимыми субстратами протеасомы, видоизмененная деградация которых может иметь туморогенный эффект. Идентификация уни-

квитин-независимых механизмов деградации свидетельствует о множественности путей разрушения белковых субстратов.

### *Строение и функции протеасомы*

В цитоплазме и ядре эукариотических клеток подавляющее большинство белков подвергаются гидролизу протеасомой, являющейся частью убиквитин-протеасомной системы. Протеасома – много-субъединичный белковый комплекс массой около 2.5 МДа – осуществляет контроль за концентрацией более сотни регуляторных белков, а также разрушает неправильно фолдированные и поврежденные белки [18]. Протеасомы присутствуют во всех без исключения клетках эукариот, а также у некоторых видов бактерий, что подтверждает их высокую значимость для нормальной жизнедеятельности клеток [19]. Подобно тому, как синтез белков регулируется на различных уровнях, не менее сложная система существует для контроля гидролиза белков протеасомой. Именно поэтому протеасома невероятно селективна, принципиально она скорее всего способна гидролизовать любой клеточный белок, модифицированный убиквитином, но в то же время исключается возможность случайной деградации остальной части клеточного протеома.

Протеасомный комплекс функционально и структурно разделен на две части. Название «протеасома» относится к разным типам частиц различной молекулярной массы. 20S протеасома, являющаяся каталитическим ядром протеасомы, способна связываться с множеством регуляторных субчастиц, таких как 19S регулятор, PA28 $\alpha\beta$ , PA28 $\gamma$ , PA200, EMC29, PI31 и другими, тем самым образуя различные формы протеасомы, известные как 26S протеасома (19S–20S), 30S протеасома (19S–20S–19S), гибридная протеасома (19S–20S–PA28), PA28-протеасома (PA28–20S–PA28) и другие [20]. Считается, что «свободная» 20S протеасома не может разрушать структурированные белки, а только небольшие пептиды и развернутые белковые молекулы [21]. При оценке относительного содержания всех протеасомных комплексов в клетках линии HeLa с помощью иммунопреципитации и иммуноблоттинга было установлено, что, по-видимому, около 40% общего количества 20S протеасом находятся в «свободной» форме, оставшаяся часть связана с регуляторами PA28 и 19S в различных комбинациях [22]. Более высокий уровень «свободной» 20S протеасомы был обнаружен в клетках U947, обработанных  $\gamma$ -интерфероном [23]. С помощью электронной криотомографии были собраны сведения о количестве 26S и 30S протеасом в нейронах, в которых регулятор PA28 отсутствует, и обнаружено, что четверть

всех протеасом находится в форме 30S, а оставшаяся часть в форме 26S [24]. Учитывая специфические функции многих типов клеток в организме млекопитающих, весьма вероятно, что каждый тип клеток содержит свой индивидуальный пул протеасомных комплексов, в том числе и потому, что не все регуляторные субчастицы экспрессируются во всех типах клеток [25]. Недавно был обнаружен 20S протеасомный комплекс, ассоциированный с плазматической мембраной нейронов с помощью GPM6 гликопротеинов [26]. Данный комплекс может подвергать деградации внутриклеточные белки в биологически активные внеклеточные пептиды, которые индуцируют передачу кальция через NMDA-рецепторы.

#### *20S протеасома*

Исходя из данных рентгеноструктурного анализа, 20S протеасома состоит из четырех гептамерных колец, составляющих полый цилиндр, длина которого составляет примерно 15–17 нм, а диаметр 11–12 нм [27]. В состав каждого кольца входит 7 субъединиц, массой от 20 до 35 кДа, а общая масса комплекса составляет приблизительно 750 кДа. Внешние кольца состоят из субъединиц  $\alpha$ -типа, а внутренние – из субъединиц  $\beta$ -типа. Четыре кольца, собранных в стопку, образуют три внутренние полости диаметром приблизительно 5 нм [28]. Объем центральной протеолитической полости составляет примерно 84 нм<sup>3</sup> и в нее может поместиться до 70 кДа белка, но доступ в нее ограничен малой шириной входных отверстий [29]. Присутствие двух копий 14 различных субъединиц является общей особенностью всех эукариотических 20S протеасом. Протеасомы более простые по составу, но с одинаковой базовой архитектурой (один тип  $\alpha$ - и один тип  $\beta$ -субъединиц) также обнаружены в археях (например, *Thermoplasma acidophilum*) и в некоторых бактериях (например, *Rhodococcus erythropolis*, *M. tuberculosis*) [30]. Тем не менее их состав может варьироваться от одной  $\alpha$ -типа и двух  $\beta$ -типа, двух  $\alpha$ -типа и двух  $\beta$ -типа или же двух  $\alpha$ -типа и одной субъединицы  $\beta$ -типа. Среди видов, которые синтезируют два типа  $\beta$ -субъединиц, одна из двух  $\beta$ -субъединиц считается неактивной в *Sulfolobus*, *Pyrobaculum* и *Aeropyrum*.

В центральной полости эукариотического 20S протеасомного комплекса расположено шесть каталитических центров, образованных двумя  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- и  $\beta$ 5-субъединицами. Таким образом, протеасома обладает тремя основными типами каталитической активности: она способна расщеплять белки со специфичностью по типу трипсина (расщепление после положительно заряженных аминокислотных остатков), по типу химотрипсина (после ароматических аминокис-

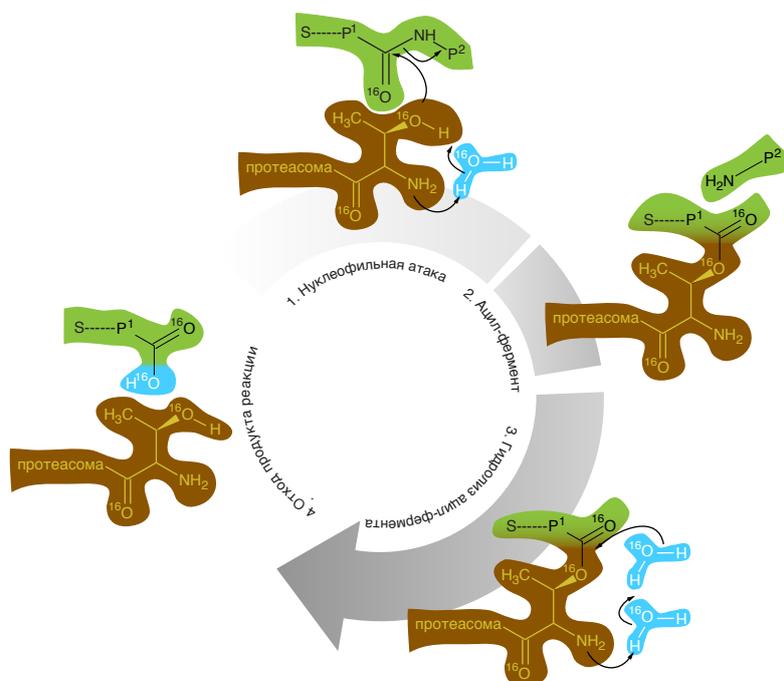


Рис. 1. Каталитический механизм расщепления полипептидной связи протеасомой.

Механизм катализа был установлен методами рентгеноструктурного анализа, а каталитически важный остаток – методом мутагенеза. В ходе реакции протон гидроксильной группы треонина переносится на аминогруппу этой же аминокислоты, а молекула воды в активном центре действует как основание. По подобному механизму работают еще три других фермента: пенициллинацилаза (в активном центре N-концевой серин), глутамин-амидотрансфераза (в активном центре N-концевой цистеин), аспартилглюкозаминидаза (в активном центре N-концевой треонин).

лотных остатков), по типу каспазы (после отрицательно заряженных остатков). Обладая еще некоторыми дополнительными типами активности, протеасома может разрушать полипептидную цепь практически между любыми аминокислотными остатками. Каталитический механизм расщепления полипептидной связи включает в себя атаку гидроксила N-концевого остатка треонина каталитической субъединицы протеасомы карбонильного атома углерода с последующей реактивацией гидроксила молекулой воды (рис. 1).

Отличительной особенностью крупных внутриклеточных протеаз, таких как протеасома или трипептидил-пептидаза II (ТРРП), является расположение активных центров во внутренних полостях,

создаваемых субъединицами комплекса (компарментализация). Изоляция активных сайтов от клеточной среды защищает клеточные белки от нежелательной деградации [31].

Сборка протеасомы из субъединиц – сложный многостадийный процесс.  $\beta$ -субъединицы в клетке синтезируются в виде неактивных предшественников, удлинённых с N-конца по сравнению со зрелыми  $\beta$ -субъединицами. N-концевые пептиды являются сигналами для белковых факторов, участвующих в сборке протеасомы, а также предотвращают преждевременную активацию  $\beta$ -субъединиц. При сборке сначала формируются относительно стабильные интермедиаты – «пре-протеасомы», состоящие из одного  $\alpha$ -кольца, частично собранного кольца из  $\beta$ -предшественников и вспомогательных факторов. Затем два интермедиата объединяются, формируя 20S протеасому. При этом N-концевые пропептиды отщепляются по аутокаталитическому механизму, высвобождая остатки треонина каталитических центров и одновременно отделяя их от клеточной среды [32]. Кроме того, вход в протеолитическую полость 20S протеасомы блокируют  $\alpha$ -субъединицы своими N-концевыми гидрофобными участками, что препятствует случайному гидролизу белков. Результаты использования атомно-силовой микроскопии указывают на то, что ворота в каталитическую полость находятся в динамическом равновесии между открытым и закрытым состоянием, которое смещено в сторону последнего [33]. Таким образом, пространственная конфигурация 20S протеасомы и малый размер отверстий, ведущих в каталитическую полость, препятствуют деградации свернутых белков без их предварительного разворачивания.

Было показано, что  $\alpha$ -субъединицы способны взаимодействовать с регуляторными белковыми комплексами: 19S регуляторным комплексом, активаторами PA28 и PA200, которые индуцируют конформационные изменения  $\alpha$ -субъединиц, что приводит к открытию входа в каталитическую полость [34]. Известны работы по активации 20S протеасомы низкомолекулярными соединениями [35]. Кроме того, делеция N-терминальной части субъединицы  $\alpha 3$  ( $\alpha 3\Delta N$ ) приводит к активации протеасомы в клетках млекопитающих. Так как протеасома является основным механизмом деградации, который регулирует уровень токсичных, подверженных агрегации белков [36], увеличение активности протеасомы благодаря открытому входу в протеолитическую полость может способствовать подавлению их токсичности и связанной с этим патологией протеотоксических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера [37]. Так, клетки, экспрессирующие  $\alpha 3\Delta N$ -протеасому, имеют более низкий уровень тау-белков и его агрегатов [38].

Интересно, что кроме протеолитической активности 20S протеасома (особенно субъединица  $\alpha 5$ ) проявляет РНКазную активность в присутствии двухвалентных катионов, чего не требуется для протеолитической активности [39]. Активность  $\alpha 5$ -РНКазы сильно коррелирует со степенью фосфорилирования субъединиц  $\alpha 6$  и  $\alpha 7$  и заметно возрастает при эритроидной дифференцировке и запрограммированной гибели клеток [39]. Известно также, что большинство  $\alpha$ -субъединиц (кроме  $\alpha 3$ ) проявляют РНКазную активность против мРНК p53 *in vitro* [40].

У млекопитающих было обнаружено пять дополнительных субъединиц  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$ ,  $\beta 5i$ ,  $\beta 5t$ , а также  $\alpha 4s$  [41]. Гены, кодирующие субъединицы  $\beta 1i$  и  $\beta 5i$ , находятся в регионе расположения генов МНС II класса на 6 хромосоме и их транскрипция индуцируется провоспалительными цитокинами, например, под воздействием интерферона- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) [42]. Субъединицы  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  и  $\beta 5i$  стабильно экспрессируются в клетках селезенки и в профессиональных антигенпрезентирующих гемопоэтических клетках, благодаря непрерывной активации  $\gamma$ -интерферон-индуцибельного промотора генов  $\beta 1i$  и  $\beta 5i$  посредством связывания димера нефосфорилированного транскрипционного фактора Stat-1 с белком IRF1 [43]. Данные субъединицы заменяют конститутивные субъединицы 20S протеасомы, тем самым меняя ее протеолитическую специфичность. Протеасома с субъединицами  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  и  $\beta 5i$  называется иммунопротеасомой, она теряет активность по типу каспазы, при этом по сравнению со стандартной протеасомой усиливается трипсиноподобная и химотрипсиноподобная активность. Набор антигенных пептидов, образующихся при действии иммунопротеасомы, отличается от набора пептидов, образующихся при действии конститутивной протеасомы [44, 45]. Из-за разницы в субстратной специфичности между конститутивной протеасомой и иммунопротеасомой антигенные пептиды, имеющие гидрофобный С-конец и вследствие этого больше подходящие по структуре для загрузки на молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса, производятся главным образом иммунопротеасомой. Клетки, содержащие этот тип протеасомы, представляют антигены на своей поверхности более эффективно [42].

Известны случаи так называемого протеасом-опосредованного пептидного сплайсинга, когда два пептида – продукта расщепления протеасомой, не являющиеся смежными в исходном белке, лигируются протеасомой. Данную активность протеасомы причисляют к дополнительной протеасомной активности, которая вносит свой вклад в расширение пула эпитопов, презентруемых на МНС I

класса, причем генерация сплайс-пептидов может осуществляться посредством двух механизмов – транспептидации и конденсации [46]. По каким принципам работает данная протеасомная функция, пока еще не до конца ясно, известно только, что сплайсинг не происходит случайным образом, а по-видимому требует выполнения каких-то условий, например, один из пептидов на С-конце должен содержать остаток лизина или аргинина [47], кроме того сплайсинг пептидов одного белка более вероятен, чем сплайсинг пептидов из разных белков [48]. Есть сведения, что сплайсинг пептидов является не редким явлением, как предполагалось ранее, а сплайсированные пептиды составляют одну треть от всего разнообразия пептидов, генерируемых протеасомой для презентации на молекулах МНС I класса [49].

Во многих неиммунных клетках экспрессия иммуносубъединиц зависит от интерферонов,  $TNF\alpha$  или липосахаридов [42], но их образование также может быть вызвано менее специфическими физиологическими триггерами – старением и стресс-факторами окружающей среды, такими как, например, тепловой шок. Поэтому, помимо генерации эпитопов для МНС I класса, иммунопротеасомы также обладают и другими функциями, например, быстрое устранение поврежденных белков после окислительного стресса, кроме того, они участвуют в пролиферации клеток и в производстве цитокинов [50]. Таким образом, иммунопротеасомы могут как усугублять, так и ослаблять течение различных заболеваний, например, вирусных инфекций, колита, миокардита и диабета.

Хотя интерферон- $\gamma$ -индуцибельные  $\alpha$ -субъединицы протеасомы неизвестны, существует альтернативная  $\alpha 4$  субъединица, обозначаемая  $\alpha 4s$ , поскольку она локализуется исключительно в мужских половых клетках после их дифференцировки в сперматоциты [51]. Также была обнаружена  $\beta 5t$  субъединица, экспрессирующаяся исключительно в кортикальных эпителиальных клетках тимуса. Эта субъединица заменяет субъединицу  $\beta 5i$ , что приводит к конфигурации  $\beta 1i$ – $\beta 2i$ – $\beta 5t$  называемую тимопротеасомой. Механизм регуляции экспрессии  $\beta 5t$  субъединицы до сих пор неизвестен [52]. Известно, что тимопротеасомы обладают меньшей химотрипсиноподобной активностью по сравнению со стандартными и иммунопротеасомами из-за гидрофильной природы кармана связывания субстрата в  $\beta 5t$  [53], также они отличаются восприимчивостью к ингибиторам протеасомы [54]. Считается, что тимопротеасома увеличивает репертуар пептидов для позитивной селекции Т-клеток в процессе их развития в тимусе [55] (рис. 2).

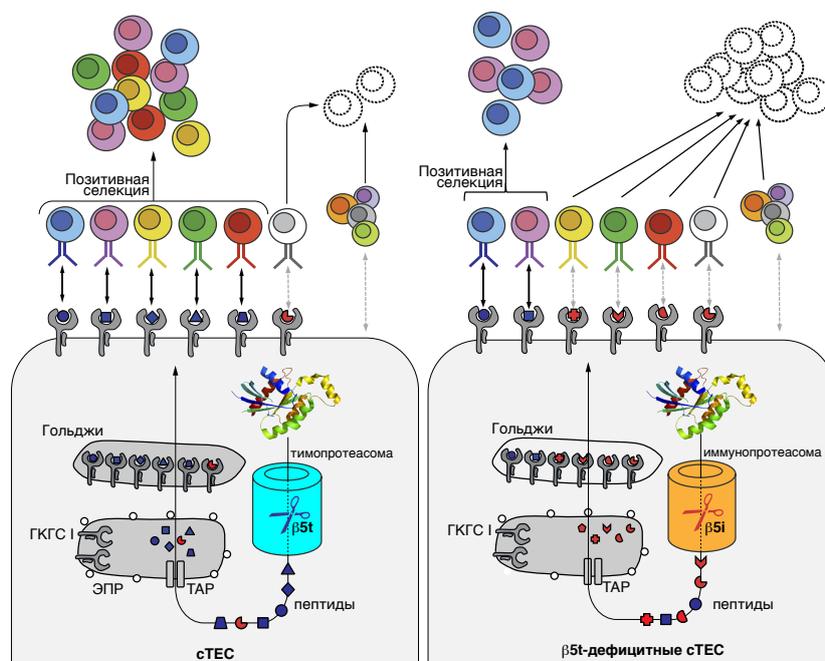


Рис. 2. Уникальная каталитическая субъединица  $\beta 5t$ , которая вместе с  $\beta 1i$  и  $\beta 2i$  входит в состав 20S протеасомы взамен  $\beta 5$  или  $\beta 5i$ , образует тимопроотеасому со сниженной химотрипсин-подобной активностью. Данный тип протеасомы играет важную роль в позитивной селекции МНС-I-специфических Т-клеток, в результате которой конечный репертуар цитотоксических лимфоцитов значительно расширяется (ГКГС – МНС I класса, сТЕС – кортикальные эпителиальные клетки тимуса (cortical thymic epithelial cell)).

### 26S протеасома

26S протеасома является самым крупным и самым сложным представителем древнего суперсемейства АТФ-зависимых протеаз [56]. Эти протеазы характеризуются наличием ААА-АТФазного (ATPases Associated with diverse cellular Activities) кольца, ответственного за разворачивание субстрата и транслокацию его через узкий канал во внутреннюю протеолитическую камеру. АТФазное кольцо преобразует химическую энергию гидролиза АТФ в механическую силу для разворачивания субстрата. Чаще всего 26S или 30S протеасомой называют 20S протеасому, которая содержит с одной или двух сторон PA700 (Protein Activator)-регуляторные комплексы (или 19S регуляторные частицы), соответственно, которые кроме АТФазного кольца, имеют в своем составе множество дополнительных специализированных субъединиц.

Регуляторные частицы отвечают за связывание, деубиквитинирование, разворачивание и перенос протеасомных субстратов в каталитическую полость, а также за открытие канала в кольце  $\alpha$ -субъединиц. 19S субчастица содержит по крайней мере 19 субъединиц общей массой около 1 МДа. Данный регуляторный комплекс можно разделить на два подкомплекса, называемых «крышка» (lid) и «основание» (base). «Основание» состоит из 9 субъединиц: 6 из них гомологичные АТФазы Rpt1-6 (regulatory particle triple A protein) и 3 не АТФазные субъединицы Rpn1, Rpn2 и Rpn13 (regulatory particle non-ATPase). Rpt1-6 образуют гетерогексамерное кольцо, которое непосредственно контактирует с кольцом  $\alpha$ -субъединиц 20S протеасомы [57]. Rpn1 и Rpn2 являются двумя крупнейшими структурными субъединицами протеасомы. Центральные части этих субъединиц состоят из 11  $\alpha$ -спиральных повторов, на которых, как полагают, располагаются как на каркасе субъединицы «крышки», а также субстраты. Субъединицы Rpn13 и Rpn10 непосредственно могут связываться с убиквитином, таким образом, данные белки являются рецепторами убиквитинированных субстратов [58, 59]. Последние исследования также причисляют к субъединицам, способным связывать убиквитин, и Rpn1 [60]. В дополнение к резидентным протеасомным субъединицам с 19S субчастицей ассоциировано большое число белков, принимающих участие в процессе деградации опосредованно. Некоторые из них (Rad23, Dsk2, Ddi1 в дрожжах) содержат убиквитин-подобные (ubiquitin-like, UBL) и убиквитин-связывающие (ubiquitin-associated, UBA) домены и выступают в качестве альтернативных убиквитиновых рецепторов. «Крышка» состоит из 9 различных Rpn субъединиц Rpn3, Rpn5-9, 11, 12 и Sem1 (Rpn15). Субъединица Rpn11 является деубиквитирующим ферментом в составе протеасомы [61]. «Крышка» структурно схожа с COP9 сигналосомой и eIF3 комплексами инициаторных факторов трансляции [62], она играет важную роль в стабилизации всего 26S протеасомного комплекса, а также осуществляет интеграцию и координацию работы разных частей протеасомы посредством аллостерической регуляции [63]. Так, связывание убиквитинированного субстрата вызывает множество структурных преобразований в 19S регуляторном комплексе. Самыми заметными изменениями, наблюдаемыми с помощью криоэлектронной микроскопии, является расширение канала, проходящего через АТФазное кольцо, а также его выравнивание со входом в 20S протеасомный комплекс. Подобные структурные изменения наблюдаются также при связывании негидролизуемого аналога аденозинтрифосфата АТР $\gamma$ S, который «замораживает» фер-

ментативный комплекс в состоянии, в которое временно переходит протеасома при связывании АТФ [64]. Биохимические и структурные исследования помогли установить, что открытие входа в канал, ведущего в протеолитическую полость 20S протеасомы, происходит, когда С-концевые НbYX мотивы трех АТФазных субъединиц (Rpt2, Rpt3 и Rpt5) 19S регуляторного комплекса связываются с лизинами внешнего кольца 20S протеасомы, образованного  $\alpha$ -субъединицами, в межсубъединичных карманах. Это взаимодействие происходит при связывании аденозинтрифосфата субъединицами АТФазного кольца и запускает перемещение N-концов  $\alpha$ -субъединиц, что открывает вход в протеолитическую камеру для субстрата. С-концевые части оставшихся трех АТФазных субъединиц, не имеющих НbYX мотивов, поддерживают ассоциацию между регуляторной субчастицей и субъединицами 20S протеасомы.

В последнее десятилетие методами электронной микроскопии высокого разрешения в сочетании с данными о кристаллических структурах отдельных субъединиц протеасомы и построением гомологических моделей удалось определить структуры 19S регуляторной субчастицы и целой 26S протеасомы почти с атомарным разрешением [65, 66] (рис. 3).

Согласно последним данным, шесть АТФ-аз Rpt1–6 образуют кольцо, которое закоривается за 20S субчастицу. Каждая АТФ-аза состоит из трех доменов: продолжительного  $\alpha$ -спирального домена, за которым следует олигонуклеотид- и олигосахарид-связывающий домен (OB domain), а также AAA+ домен [67], содержащий элементы, необходимые для связывания и гидролиза АТФ. Все шесть OB-доменов, вместе с AAA+ доменами образуют два концентрических кольца. С-концевые хвосты AAA+ доменов размещаются в полостях на поверхности 20S протеасомы, открывая вход в ее каталитическую камеру (AAA-кольцо). N-концевые  $\alpha$ -спирали AAA+ доменов образуют три пары суперспиралей (coiled coils), составляющих внешнюю границу цилиндрической части 26S протеасомы (N-кольцо) (рис. 4). Таким образом, АТФ-азное кольцо составляет примерно 2/3 от общего объема регуляторной 19S субчастицы и обеспечивает связь убиквитиновых рецепторов с АТФ-азным мотором [65, 66].

Структурная субъединица Rpn1 крепится сбоку к внешней стороне АТФ-азного кольца, рядом с 20S субчастицей, Rpn2 крепится сверху с диаметрально противоположной стороны. Убиквитиновые рецепторы Rpn10 и Rpn13 располагаются на периферии протеасомы в положении, удобном для захвата субстратов. Rpn13 связана с Rpn2 и расположена на максимальном удалении от центра протеасомы. На четверть оборота от нее чуть ближе к АТФ-азному кольцу располагается Rpn10,

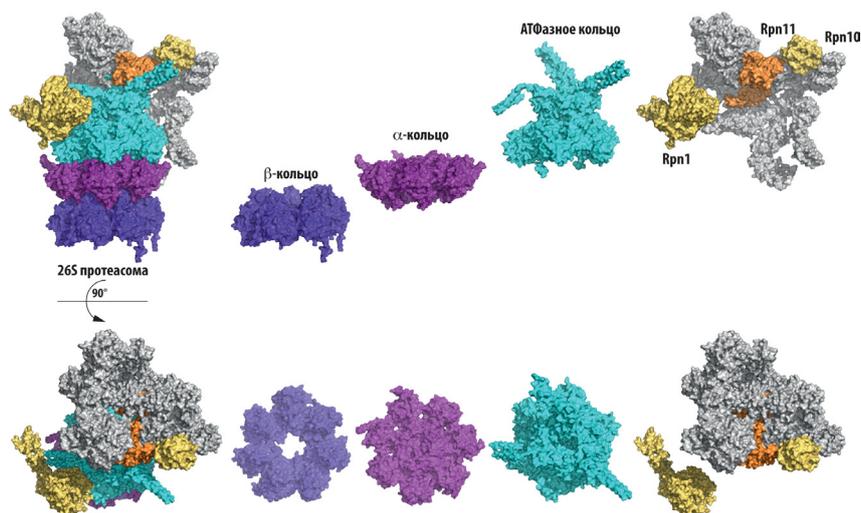


Рис. 3. Строение протеасомы.

По данным рентгеноструктурного анализа (PDB 5GJR), 20S протеасома представляет собой полый цилиндр длиной 15–17 нм и диаметром 11–12 нм, состоящий из четырех лежащих друг на друге колец, причем два одинаковых периферических кольца сформированы субъединицами  $\alpha$ -типа (сиреневый), а два одинаковых центральных кольца, которые содержат каталитические субъединицы, – субъединицами  $\beta$ -типа (фиолетовый). Каждое из колец состоит из 7 субъединиц, массой 20–35 кДа каждая. Регулятор PA700 (называемый также 19S регуляторным комплексом) имеет сложную структуру и состоит из 19 различающихся между собой белковых субъединиц. В его структуре можно выделить два основных элемента: нижний (базовый) элемент состоит из шести отличающихся по структуре субъединиц, имеющих АТФазную активность (Rpn1–6, обозначены голубым), структурной субъединицы Rpn2 и трех убиквитин-связывающих субъединиц Rpn1, Rpn10 и Rpn13 (обозначены желтым, Rpn13 не обозначена вследствие низкого разрешения). PA700 присоединяется непосредственно к  $\alpha$ -кольцу каталитического ядра и обеспечивает разворачивание полипептидной цепи белковых субстратов. Энергия гидролиза АТФ расходуется на разворачивание полипептидной цепи белкового субстрата и транслокацию ее в каталитическую полость. Верхний элемент состоит из 9 не-АТФазных субъединиц: Rpn3, 5–9, 11–12 (обозначены серым). Rpn11 сканирует полипептидную цепь субстрата и осуществляет удаление полиубиквитиновой цепи (обозначена оранжевым).

прикрепленная к деубиквитазае Rpn11. Таким образом, активные центры расположены вдоль центральной оси протеасомы на пути в протеолитическую полость в порядке осуществления воздействия на субстрат. Структурные субъединицы «крышки» Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn9, Rpn12 образуют U-образный каркас, соединяющий большую часть элементов протеасомы: Rpn2, Rpn11, АТФ-азное кольцо и  $\alpha$ -кольцо каталитической частицы. «Крышка» играет важную

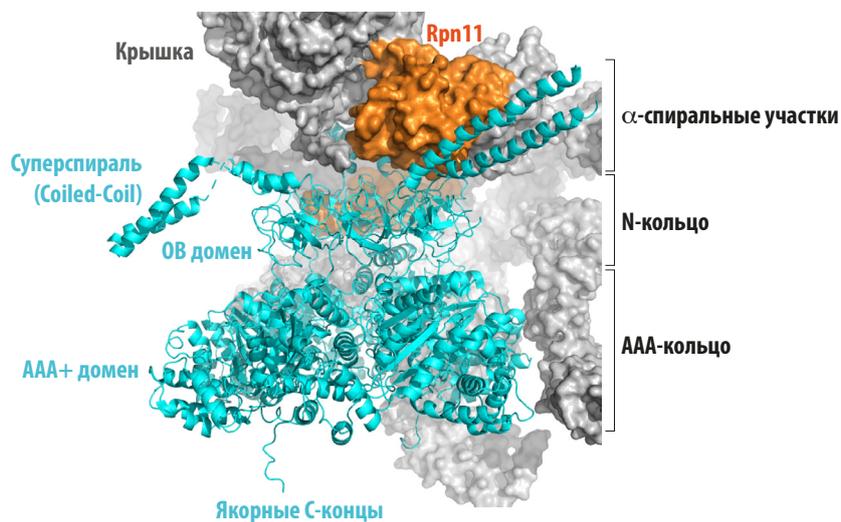


Рис. 4. Строение АТФ-азного кольца 26S протеасомы. Субъединицы, имеющие АТФазную активность Rpt1-6, обозначены голубым, деубиквитиназная субъединица Rpn11 – оранжевым. Каждая АТФ-аза состоит из трех доменов: продолжительного  $\alpha$ -спирального участка, олигонуклеотид- и олигосахарид-связывающего домена (OV domain) и AAA+ домена.

роль в стабилизации всего комплекса 26S протеасомы [68], а также осуществляет интеграцию и координацию работы разных частей протеасомы посредством аллостерической регуляции [63, 69].

Количество 20S протеасом в клетке может увеличиваться путем разборки 26S протеасомного комплекса на ее компоненты – 20S протеасому и регулятор 19S. Несколько исследований показали, что такое действительно происходит после окислительного стресса, когда существует необходимость в повышении эффективности деградации большого количества поврежденных белков [70]. По-видимому, в процессе разборки участвуют различные белки. Было обнаружено, что в клетках млекопитающих шаперон Hsp70 имеет важное значение в стабилизации регулятора 19S после его диссоциации от 20S протеасомы, а также для повторной сборки функциональных 26S протеасом по окончании окислительного стресса [71]. Было также установлено, что низкий клеточный уровень Hsp90 вызывает практически полную разборку дрожжевой 26S протеасомы и, соответственно, увеличивает количество «свободной» 20S протеасомы [44]. Недавно было показано, что уровень 26S и 20S протеасомных комплексов также зависит от метаболического состояния клетки. Например, низкое соотношение кофакторов NADH/

NAD<sup>+</sup> дестабилизирует 26S протеасомный комплекс, приводя к появлению «свободных» 20S протеасом [72]. Аналогичным образом, на соотношении 26S и 20S протеасом в клетке сказывается уменьшение количества АТФ [73].

Процесс гидролиза субстратов протеасомой обуславливает значительную конформационную реорганизацию АТФазных субъединиц Rpt1-Rpt6, которые благодаря каскадному гидролизу АТФ в субстрат-связывающих карманах проворачиваются подобно пропеллеру и выстраиваются в горизонтальной плоскости. Подобная глобальная структурная перестройка приводит к выравниванию канала, образуемого АТФазами и осевой линией 20S каталитического ядра. Еще одним важным следствием проворота АТФаз является перемещение деубиквитиназы Rpn11 в позицию непосредственно над входом в каталитическую полость, что в значительной степени облегчает сканирование полипептидной цепи и последующее отщепление конъюгированного убиквитина.

#### *Посттрансляционные модификации протеасомы*

Недавние результаты демонстрируют, что посттрансляционные модификации различных субъединиц протеасомы, такие как фосфорилирование, N-ацетилирование, убиквитинирование, миристоилирование, гликозилирование, рибозилирование, а также протеолитическое расщепление могут регулировать ее сборку, локализацию, а также влиять на протеолитическую функцию [74]. С помощью современных протеомных методов было зарегистрировано около 110 ко- и посттрансляционных модификаций дрожжевой протеасомы, но пока лишь небольшая часть из них была функционально охарактеризована [75, 76]. Количество, типы модификации, а также сайты, подвергающиеся модификации в значительной степени различаются у дрожжевой, человеческой и мышинной протеасомы несмотря на их высокую аминокислотную гомологию [76]. Известные на настоящий момент функциональные модификации часто делят на три типа. Первый тип – модификации, влияющие на сборку и стабильность протеасомы, к ним относится, например, ADP-рибозилирование, которому подвергается фактор Р131, способствующий сборке протеасомы [77]. Относящиеся ко второму типу непосредственно влияют на протеолитическую функцию протеасомы, так, например, гликолизирование одной из АТФаз Rpt2 ингибирует протеасому путем снижения активности АТФазного кольца [78]. Модификации третьего типа контролируют локализацию протеасомы, как например N-миристоилирование субъединицы Rpt2 в дрожжах [79].

### Фосфорилирование

Почти все субъединицы 26S протеасомы подвергаются фосфорилированию [76]. Фосфорилирование  $\alpha$ -субъединиц 20S протеасомы в первую очередь влияет на стабильность протеасом. Так, фосфорилирование  $\alpha 7$ -субъединицы стабилизирует ассоциацию 19S регуляторного комплекса с 20S протеасомой с образованием 26S протеасомы. В присутствии интерферона- $\gamma$  фосфорилирование  $\alpha 7$  происходит менее активно, что приводит к дестабилизации 26S протеасомного комплекса и, по некоторым данным, замене 19S на PA28 регуляторный комплекс [80], хотя в других работах это не подтверждается [81]. Фосфорилирование субъединиц регуляторного комплекса, по-видимому, преимущественно влияет на доступ субстрата к протеолитической камере. Например, фосфорилирование АТФазной субъединицы Rpt6 посредством РКА (Protein kinase A) или CaMKII ( $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II) [82–84] приводит к увеличению скорости деградации субстратов. РКА также фосфорилирует субъединицу Rpn6, не являющуюся АТФазой, тем не менее при модификации данной субъединицы происходит ускорение гидролиза субстратов *in vitro* [85].

### Убиквитинирование

Известно, что ингибиторы протеасомы или протеотоксический стресс могут индуцировать убиквитинирование протеасомных субъединиц [86, 87]. Было обнаружено, что при данных условиях происходит накопление пяти E3-лигаз на протеасоме (Ube3a/E6AP, Ube3c/Hul5, Rnf181, Huw1 и Ubr4), которые опосредуют убиквитинирование приблизительно 14 субъединиц. Множественное убиквитинирование приводит к устранению неактивных протеасом путем аутофагии (так называемая протеафагия). Тем не менее, убиквитиновый рецептор Rpn13 является специфическим субстратом E3-лигазы Ube3c/Hul5, и данная модификация не приводит к протеафагии. Модифицированные таким образом остатки лизинов, K21 и K34, расположенные в N-концевой части Ub-связывающего домена Rpn13 субъединицы Rpn13, способствуют уменьшению способности Rpn13 взаимодействовать с убиквитинированными белками, тем самым препятствуя деградации субстрата [87]. Интересно, что частичное ингибирование протеасом вызывает специфическое убиквитинирование Rpn13 как *in vivo*, так и *in vitro*, что указывает на предотвращение связывания убиквитинированных субстратов в случае ухудшения протеолитических функций протеасомы благодаря данной модификации. Физиологическая значимость такого механизма пока неизвестна. Кроме того, было показано, что второй Ub-рецеп-

тор Rpn10 также подвергается моноубиквитинированию. Моноубиквитинирование Ub-рецепторов очень часто блокирует их способность связывать убиквитинированные субстраты из-за внутримолекулярного взаимодействия Ub-связывающего домена (UBD) с Ub [88]. Это также справедливо для Rpn10 [74], способность которого распознавать протеасомальные субстраты заметно уменьшается при убиквитинировании. В отличие от убиквитинированного Rpn13, количество которого увеличивается при протеотоксическом стрессе, количество моноубиквитинированного Rpn10 снижается при стрессовых условиях.

#### *Альтернативные регуляторы*

Регулятор PA28 (также называемый REG или 11S) представляет собой гептамерный кольцеобразный комплекс массой 180 кДа. Этот регулятор способен АТФ-независимым образом присоединяться с одной или двух сторон к 20S протеасоме и существенно повышает ее способность гидролизовать короткие пептидные субстраты, но не белки или белки, конъюгированные с убиквитином. В последнее время появляется все больше работ, в которых утверждается, что 20S протеасома с регуляторами PA28 способна разрушать и белки. Кроме того, PA28 может связаться со свободным концом ассиметричной 26S протеасомы (19S–20S) с образованием «гибридной» протеасомы (19S–20S–PA28), которая гидролизует три- и тетра- пептиды с более высокой скоростью, чем 26S протеасома [89].

**PA28 $\alpha\beta$ .** У млекопитающих PA28 состоит из двух гомологичных субъединиц PA28 $\alpha$  (REG $\alpha$  или PSME1) и PA28 $\beta$  (REG $\beta$  или PSME2), экспрессия обеих индуцируется INF $\gamma$  [90]. Профессиональные антигенпрезентирующие клетки в норме экспрессируют повышенное количество PA28 $\alpha\beta$ , что согласуется с возможным участием этого комплекса в презентации антигенов на молекулах МНС I класса [91]. Кроме того, данный комплекс участвует в гомеостазе белка при окислительном стрессе [92], регуляции роста клеток и апоптозе. Было обнаружено, что PA28 $\alpha$  или PA28 $\alpha\beta$  способствует презентации некоторых, но не всех антигенов на МНС I класса. Известно, что клетки, у которых отсутствует этот регуляторный комплекс, обладают меньшей способностью презентировать определенные антигены. Согласованная экспрессия PA28 $\alpha$  и PA28 $\beta$ , а также протеасомных иммуносубъединиц  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i и  $\beta$ 5i, после индукции INF $\gamma$  приводит к образованию иммунопротеасом PA28 $\alpha\beta$ -20S *in vitro* и *in vivo*. Несмотря на это регулятор PA28 $\alpha\beta$  также был обнаружен в клетках, тканях и органах, в которых отсутствуют иммунопротеасомы, таких как эритроциты и мышцы. PA28 $\alpha\beta$  также усиливает высвобождение

пептидов, которые не могут презентироваться на МНС I класса [93], что указывает на то, что данный комплекс может функционировать как регулятор аутоиммунных реакций посредством снижения избыточных цитотоксических реакций против аутоантигенов. Кроме того, PA28 $\alpha\beta$  стимулирует 20S протеасому подвергать деградации окисленные и неправильно свернутые белки независимо от их убиквитинирования [92, 94–96].

**PA28 $\gamma$ .** Также известна третья субъединица PA28 $\gamma$  (REG $\gamma$ , PSME3 или Ki антиген), образующая гомогептамер, которая локализована в ядре [97], она не является интерферон-индуцибельной и не участвует в презентации антигенов на молекулах МНС I класса. Имеются данные о том, что паттерны расщепления пептидов и активационные свойства различаются между активаторами PA28 $\gamma$  и PA28 $\alpha\beta$ . Подобная разница может быть связана со склонностью данных регуляторов связываться с различными типами протеасом. Хотя до сих пор неясно, как субъединица PA28 $\gamma$  распознает субстраты, она может гидролизовать как короткие пептиды, так и неповрежденные, неструктурированные или естественно неупорядоченные внутриклеточные белки по убиквитин-независимому механизму. На сегодняшний день идентифицированы некоторые субстраты, гидролизующиеся с участием PA28 $\gamma$ -протеасомы, к ним относятся SRC3 [98], коровий белок 3 вируса гепатита С [99], ингибиторы циклин-зависимых киназ p21, p16 и p14 [94, 100]. PA28 $\gamma$  непосредственно взаимодействует с доменом SRC3 гистон-ацетилазы (HAT) [98] и p21 [94] *in vitro*. У мышей, нокаутных по PA28 $\gamma$ , наблюдается замедление роста и дефекты в клеточно-специфическом митозе, сопровождающиеся уменьшением массы тела взрослых особей [101, 102]. Таким образом, PA28 $\gamma$  потенциально связан с метаболизмом и патогенезом различных заболеваний путем содействия деградации субстратов убиквитин-независимым способом.

**PA200/Blm10.** Еще один альтернативный регулятор белок PA200, кодируемый геном Psme4, впервые был обнаружен в лизате ретикулоцитов кролика [103], его ортолог Blm10 был обнаружен у дрожжей [104], нематод и растений [105]. Субъединица PA200, которая представляет собой высококонсервативный белок массой 250 кДа, локализованный в ядре, может присоединяться к одному или обоим концам 20S протеасомы. *In vitro* было показано, что протеасома с этим регулятором может гидролизовать только короткие пептиды или развернутые белки, а также регулировать гомеостаз глутамин/глутамата в опухолевых клетках [106]. PA200 присутствует во всех тканях млекопитающих, но особенно много данного регулятора в семенниках. Считается, что PA200 способствует поддержанию белкового гомеостаза в митохондриях [107], эта гипо-

теза подтверждается данными, полученными в экспериментах на нокаутных по PA200 мышах. Мужские особи таких мышей оказались бесплодными, исследования показали, что данная патология была вызвана нарушением сперматогенеза [108]. Дальнейшее изучение показало, что данный регулятор также способствует стабильности хромосом [109], он участвует в АТФ- и убиквитин-независимой деградации ацетилированных гистонов в соматических клетках в ответ на повреждение ДНК [110]. PA200 и Blm10 содержат домен, подобный бромодомену (bromodomain, BRD), распознающему ацетилирование. BRD-подобные области PA200 и Blm10 способны специфически связывать ацетилированные коровые гистоны [110]. Двойной нокаут PA200 и PA28γ у мышей вызывает полное бесплодие у мужских особей с заметным дефектом подвижности сперматозоидов из-за уменьшения активности протеасомы [111]. Таким образом, учитывая нарушение нормального сперматогенеза у мышей, нокаутных по PA200, эти данные свидетельствуют, что PA200-опосредованный гидролиз гистонов является важной составляющей для правильного формирования сперматозоидов. Кроме того, дрожжи, не содержащие Blm10, являются сверхчувствительным к ДНК-разрушающим агентам и показывают снижение дыхательной способности [107]. Недостаток Blm10 также вызывает повышенную чувствительность к окислительному стрессу, увеличение деления митохондрий, а также ухудшение деградации белка деления Dnm1 [112]. Blm10-протеасомы также могут опосредовать деградацию связанного с рибосомой транскрипционного фактора Sfp1 в ответ на нехватку питательных веществ, влияя таким образом на рибосомный биосинтез [113]. Следовательно, PA200/Blm10 протеасомы могут регулировать клеточный метаболизм путем усиления протеасомной активности в отсутствие убиквитина.

**PI31.** PI31, пролин-богатый белок массой 30 кДа, впервые был описан как ингибитор протеасомной активности, он конкурирует с регуляторной субчастицей 19S (или PA28) за связывание с 20S протеасомой [114]. Исследование, проведенное в *D. melanogaster*, показало, что PI31, в комплексе с E3 убиквитин-лигазой Nutcracker, регулирует протеасомные функции, оказывая положительное влияние на активность 26S, и отрицательно влияет на активность свободной 20S протеасомы. Однако, было показано, что оверэкспрессия PI31 в мышечных эмбриональных клетках не оказывает влияния на протеасом-опосредованный гидролиз [115]. Вместо этого PI31, локализующийся на ядерной мембране или мембране эндоплазматического ретикулума, способен избирательно препятствовать созреванию комплексов-предшественников иммунопротеасомы, что в свою очередь снижает

презентацию антигенов на молекулах МНС I класса на поверхности эмбриональных клеток мыши при обработке данных клеток INF $\gamma$ .

**Ecm29.** Ecm29 представляет собой большой белок массой 205 кДа, способный связываться с 20S протеасомой и регулирующий ее функцию по нескольким механизмам. Было показано непосредственное ингибирование протеасомной активности в дрожжах, которое частично осуществлялось путем ингибирования АТФазной активности 19S регуляторной субчастицы [116]. С другой стороны, также было описано положительное влияние Ecm29 на активность дрожжевой протеасомы. Было обнаружено, что Ecm29 способствует сборке протеасом, поскольку стабилизирует промежуточное соединение 20S–19S, в котором созревание 20S протеасомного комплекса задерживается из-за временной нехватки конкретных  $\beta$ -субъединиц [117]. Другие исследования показали, что Ecm29 связывается с 19S в ответ на окислительный стресс и вызывает разборку 26S протеасомы [118]. Было высказано предположение, что Ecm29-зависимая разборка 26S протеасомного комплекса служит для увеличения количества 20S, что позволяет клеткам справляться с большим количеством окисленных белков. У млекопитающих белок Ecm29 (кодируемый геном KIAA0368) также способствует диссоциации протеасом при окислительном стрессе и ассоциирован с различными молекулярными моторами и эндосомальными компонентами. Эта ассоциация может быть связана с его способностью перемещать 26S протеасомы в различные клеточные области, такие как эндоплазматический ретикулум и центросому.

#### Протеафагия

Термин «протеафагия» используется для обозначения утилизации протеасом посредством аутофагии [119]. Было показано, что протеафагию в *Arabidopsis* можно стимулировать азотным голоданием, что способствует неселективной аутофагии, а также химическим ингибированием или ингибированием протеасомы на генетическом уровне, что вызывает селективное удаление нефункциональных протеасом. При селективной ликвидации протеасом происходит обширное убиквитинирование протеасомных субъединиц, что способствует их распознаванию внепротеасомальной Rpn10, которая связывает субъединицы, модифицированные убиквитином, своим убиквитин-связывающим мотивом (UIM, ubiquitin-interacting motif) и одновременно взаимодействует с белком ATG8, экспонированным на аутофагосомных мембранах через ATG8-связывающий мотив (AIM), действуя как классический избирательный аутофагосомный рецептор [119].

У дрожжей большинство протеасом находится в ядре, тогда как аутофагия ограничена цитозолем. Более того, дрожжевая Rpn10 не содержит AIM. Аналогично *Arabidopsis*, существует два протеафagosомных пути в дрожжах, которые реагируют либо на азотное голодание, либо на инактивацию протеасомных частиц [120, 121]. По аналогии с Rpn10 был идентифицирован белок Cue5, действующий как избирательный протеафagosомный рецептор [120].

#### МЕХАНИЗМЫ УЗНАВАНИЯ СУБСТРАТОВ ПРОТЕАСОМОЙ

Способность белка подвергаться гидролизу протеасомой обуславливается наличием сигнала деградации. В наиболее общем случае сигнал деградации включает в себя два компонента: 1) участок, который распознается протеасомой и связывается с ней и 2) участок инициации разворачивания и дальнейшей транслокации субстрата в каталитическую полость 20S протеасомного комплекса [122]. У подавляющего большинства субстратов в качестве участка распознавания выступает полиубиквитиновая цепь.

#### *Убиквитин-зависимый протеолиз*

*Система убиквитинирования.* Убиквитин – ~8,5 кДа сигнальный белок, присутствующий во всех эукариотических клетках. Посттрансляционная модификация белков убиквитином – убиквитинирование – регулирует большое количество клеточных процессов, таких как деградация, сортировка, локализация, активация и репрессия синтеза белков. Известно до 14 различных семейств убиквитина и убиквитин-подобных белков, различающихся по аминокислотной последовательности, но имеющих характерную пространственную структуру.

Убиквитин прикрепляется к белку-мишени с помощью последовательных действий сложной системы ферментов. Ковалентное присоединение убиквитина к субстратам осуществляется при помощи системы, состоящей из трех ферментов – E1 (activating enzyme), E2 (conjugating enzyme) и убиквитин-лигазы E3. Фермент E1 активирует убиквитин в процессе двухстадийной АТФ-зависимой реакции, образуя высокоэнергетический E1-убиквитин тиоэфирный комплекс. Далее активированный убиквитин переносится на убиквитин-конъюгирующий фермент E2. Убиквитин-лигазы E3 включают в себя ферменты двух типов. Имеющие RING домен E3-лигазы связываются с E2 и с субстратом, сближая их на расстояние, достаточное для переноса убиквитина на субстрат, катализируемого ферментом E2; убиквитин-лигазы с HECT доменом самостоятельно катализируют перенос убиквитина на аминокислотную группу белка-мишени. Из класса убиквитин-лигаз иногда выделяют E4-лигазы, осуществляющие исключительно удлинение убиквитиновых цепей.

Специфичность модификации субстратов достигается за счет иерархичности системы убиквитинирования. Так, в клетках млекопитающих существует всего два типа убиквитин-активирующих ферментов E1-Uba1 и Uba6 [123], около 30 конъюгирующих ферментов E2 и около 600 убиквитин-лигаз E3. Ферменты типа E1 активируют убиквитин для всех типов ферментов E2, большая часть которых взаимодействует с несколькими убиквитин-лигазами E3. Как правило, ферменты E3 способны переносить убиквитин на различные субстраты, имеющие схожие или идентичные мотивы узнавания. В то же время специфические E3-лигазы могут взаимодействовать более чем с одним ферментом E2, а некоторые субстраты могут распознаваться более чем одной E3-лигазой. Таким образом иерархия системы убиквитинирования представляет собой сложную сеть, отличную от пирамиды (рис. 5).

Существует множество способов модификации белков убиквитином, из которых выделяют моноубиквитинирование (одного или нескольких сайтов), а также полиубиквитинирование с разными параметрами связи и длинами убиквитиновых цепей.  $\epsilon$ -аминогруппы семи остатков лизина (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), входящих в состав убиквитина, позволяют ему образовывать изопептидные связи. Как правило, первый убиквитин присоединяется к остатку лизина, входящему в состав субстрата, с помощью C-концевого остатка глицина (G76). Дальнейший рост цепи обусловлен образованием изопептидных связей между внутренними остатками лизинов уже встроенного убиквитина и C-концевым остатком глицина нового убиквитина. Возможно также присоединение убиквитина непосредственно к N-концевому остатку метионина субстрата с последующим линейным сцеплением убиквитинов. Параметры цепей крайне разнообразны: они могут быть как гомогенными (то есть образовывать связи через остатки лизинов в строго определенном положении), так и гетерогенными (комбинировать разные типы связей), последние в свою очередь могут разветвляться посредством убиквитинирования сразу по нескольким сайтам [125]. Кроме того, убиквитин подвергается фосфорилированию и ацетилированию по остаткам серина, треонина и лизина [126]. Считается, что значение сигнала убиквитинирования зависит от типа связи и длины убиквитиновой цепи. Удаление этих сигналов осуществляется с помощью деубиквитинирующих ферментов (DUB), которые способны отсоединять убиквитиновые цепи от субстратов [127].

Убиквитин не просто переключатель, который инициирует деградацию и выключается, а тонко настраиваемый сигнал, который может определять, в какой последовательности белки регуляторного

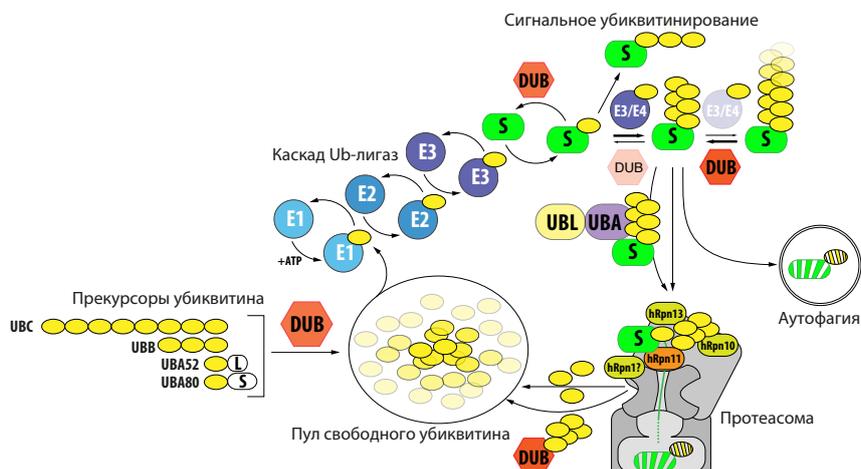


Рис. 5. Схематичное представление убиквитин-протеасомной системы.

Убиквитин (желтый овал) синтезируется в виде четырех белков-предшественников, которые далее подвергаются процессингу специализированными деубиквитилирующими ферментами – убиквитин-изопептидазами (DUB). Система убиквитинирования, включающая три типа убиквитин-лигаз (E1 (2 представителя), E2 (десятки представителей) и E3 (сотни представителей)), высоко-специфична и избирательна за счет построения по принципу иерархического усложнения. Убиквитин конъюгируется с субстратами (S) в виде мономера или полиубиквитиновой цепи, которая формируется через внутренние остатки лизина. Элонгацию полиубиквитиновой цепи обеспечивают лигазы E3 или относительно недавно открытые убиквитин-лигазы семейства E4. Между убиквитинированием и процессом удаления остатков убиквитина убиквитин-изопептидазами существует динамическое равновесие, которое обуславливает оптимальную длину цепи, по современному представлению составляющая порядка 6 убиквитинов на молекулу субстрата [124]. Далее убиквитинированный субстрат связывается с субъединицами протеасомы Rpn10, Rpn13 и Rpn1 напрямую либо с участием шаттл-белков семейства UBL–UBA, также возможен вариант специфической аутофагии. Определенный процент убиквитина попадает в протеолитическую камеру вместе с субстратом, что приводит к его разрушению. В подавляющем большинстве случаев резидентная протеасомная деубиквитиноваза Rpn11 успешно удаляет полиубиквитиновую цепь в полном составе, которая далее подвергается расщеплению на мономеры для повторного использования.

пути будут гидролизованы. Например, продвижение клетки по клеточному циклу требует деградации регуляторных белков в правильной последовательности. Так, гидролиз можно упорядочить по времени убиквитинирования, многие убиквитин-лигазы E3 распознают субстраты, только когда их сайт взаимодействия будет фосфорилирован [128]. Есть предположение, что порядок деградации также контролируется характером убиквитинирования, – во время

клеточного цикла регуляторные белки, имеющие более длинные полиубиквитиновые цепи, гидролизуются быстрее белков, модифицированных более короткими цепями [129].

*Убиквитиновые цепи.* Тысячи белков убиквитинируются в клетках, но почти половина из этих белков не является мишенью для протеасомы [130], и пока до сих пор не ясно, каким образом клетка отличает разные убиквитиновые сигналы (рис. 6). Традиционное представление состоит в том, что убиквитиновые цепи, образованные через K48 убиквитина распознаются протеасомой, и для правильного распознавания необходимо не менее четырех молекул убиквитина. Модификация одной молекулой убиквитина или полиубиквитиновых цепи, связанные через другие остатки лизина, например, через K63, а также линейные полиубиквитиновые цепи играют роль в клеточных процессах, не связанных с протеасомой, таких как регуляция структуры хроматина, мембранный транспорт и сигнальная трансдукция. Тем не менее это не совсем так, и убиквитин, полимеризованный через K63 [131], а также моноубиквитиновые теги [132] могут распознаваться протеасомой. Очищенная протеасома способна связывать K63-полиубиквитиновую цепь с почти такой же аффинностью, как и K48-полиубиквитиновые цепи [133], таким образом, специфичность распознавания различных убиквитиновых цепей возможно обуславливают некие вспомогательные белки, либо топология цепи.

Последние достижения в протеомных технологиях позволили создать карту протеома для убиквитина [134]. Комбинация количественной протеомики и использования антител против диглицина diG, которые распознают убиквитинированные пептиды в трипсинизированных фрагментах, показала, что большое количество белков (~5000) убиквитинировано в культивируемых клетках человека [130]. Несколько сайтов убиквитинирования было обнаружено в ~60% белков, при этом около ~4% содержали более 10 модифицированных сайтов, и количество ~58% убиквитинированных пептидов увеличилось после обработки клеток ингибитором протеасомы.

Другое количественное протеомное исследование с использованием меченого изотопами убиквитина показало, что убиквитинированные субстраты в основном существуют в моноубиквитинированной форме [135]. Таким образом, эти протеомные исследования показали, что значительное количество эндогенных протеасомных субстратов модифицировано несколькими моно- или полиубиквитинами, а не одной цепью. Цепи, образованные через K48, быстро накапливаются в клетках, обработанных ингибитором протеасомы, в то время, как цепи, образованные другими связями, такими как K6, K11, K27, K29, K33 и

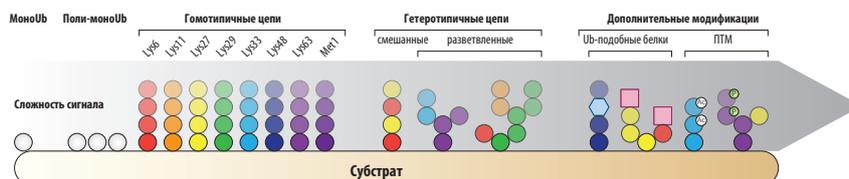


Рис. 6. Различные типы убиквитиновой цепи и ее возможные модификации.

Конъюгаты субстрата с убиквитином можно разделить на три основных типа: моноубиквитинирование, поли-моноубиквитинирование и полиубиквитинирование. Кроме того существует гомотипическое убиквитинирование, при котором каждая цепь убиквитина содержит только один вид связи, а также гетеротипическое убиквитинирование, при котором убиквитин может соединяться через две и более различных связей в цепи в одном акте полимеризации, создавая тем самым смешанную цепь. Также убиквитин способен подвергаться модификации по двум и более сайтам, образуя разветвленные цепи. Кроме того, убиквитин при полиубиквитинировании может быть конъюгирован с убиквитин-подобными модификаторами, такими как SUMO, NEDD8 и ISG15. Он также подвергается посттрансляционным модификациям, например фосфорилированию и ацетилированию.

в меньшей степени K63 также стали более многочисленными, что свидетельствует о вовлеченности данных типов цепей в протеасомную деградацию [136].

В соответствии с наблюдениями *in vivo*, недавние исследования *in vitro* показывают, что очищенные протеасомы могут распознавать очень широкий диапазон топологий убиквитиновых цепей на различных субстратах. С использованием одномолекулярного подхода, было показано, что протеасома эффективно гидролизует циклин B1 с несколькими короткими цепями убиквитина [137, 138]. В реконструированной системе большая мультибелковая E3-лигаза APC/C быстро модифицирует субстраты моно-, ди- и три-убиквитином по нескольким сайтам [139]. Кроме того, был сконструирован циклин B1, убиквитинированный цепями определенной длины, далее исследователи контролировали среднее время пребывания этого белка на протеасоме на уровне отдельных молекул с использованием флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (total internal reflection fluorescent microscopy, TIRF). Связывание субстрата возрастало экспоненциально для первых трех убиквитинов в любой конфигурации, то есть нескольких моно- или коротких цепей убиквитина, и линейно от четырех до девяти убиквитинов. Среди возможных конфигураций с четырьмя убиквитином, субстраты, модифицированные двумя K48-содержащими цепями диубиквитина, обеспечивали более эффективную деградацию, чем те, которые

были модифицированы одной K48-содержащей тетраубиквитиновой цепью. Данные наблюдения были подтверждены более поздним исследованием с использованием модельного субстрата GFP, слитного с неструктурированным участком [140]. В то же время цепи, соединенные через K48, не всегда приводят субстрат к деградации. В дрожжах активатор транскрипции Met4 [141] и Cdc34 [142] могут быть убиквитинированы длинными K48-содержащими полиубиквитиновыми цепями, но при этом протеасомой они не гидролизуются. Несколько коротких цепей, связанных через K11, K27 и K63, также способствуют связыванию субстрата с протеасомой, что указывает на то, что, возможно, протеасома не различает типы цепей при множественном убиквитинировании субстратов. Вполне вероятно, что для распознавания субстрата протеасомой важна локальная концентрация единиц убиквитина, а не тип связи в цепи.

Известно, что в клетках E3-лигаза APC/C вместе с двумя разными E2-лигазами, UBE2C и UBE2S, может собирать разветвленные убиквитиновые цепи с помощью связей K11 и K48 [143]. Субстраты APC/C, модифицированные разветвленными цепями K11/K48, более эффективно подвергаются деградации, чем те, которые содержат гомотипические цепи, образованные через K48 или K11 [143, 144]. Кроме того, цепи K11 участвуют в процессах, не связанных с протеасомной деградацией, например, разветвленные цепи K11/K63 способствует интернализации молекул МНС I класса путем эндоцитоза [145]. Существуют данные, что у дрожжей K11-содержащие цепи убиквитина почти столь же многочисленны (28% всех убиквитиновых цепей) [136], как и K48-содержащие цепи, но гораздо менее распространены в несинхронизированных клетках млекопитающих (2–5% всех убиквитиновых цепей) [146, 135]. Недавно было обнаружено, что клетки содержат существенное количество разветвленных K48/K63-содержащих убиквитиновых цепей [147]. Количество таких цепей в клетке увеличивалось при обработке клеток ингибитором протеасомы, что указывает на то, что разветвленные цепи этого типа являются сигналом протеасомной деградации. Также было продемонстрировано, что количество убиквитиновых цепей K11/K48 увеличивается при протеотоксическом стрессе, вызванном ингибированием протеасомы, HSP70 или HSP90. Белковые агрегаты только что синтезированных и неправильно свернутых белков в некоторых типах клеток, включая дифференцированные нейроны, были модифицированы K11/K48 полиубиквитиновыми цепями, что указывает на общую функцию цепей K11/K48 в качестве маркеров субстратов протеасомной системы. Кроме того, было показано, что патологический 73Q-хантингтин (НТТ), но не

доброкачественный 23Q-НТТ, модифицируется цепями K11/K48 и подвергается быстрой деградации протеасомой. Однако, при протеотоксическом стрессе, который приводит к появлению большого количества нефолдированных белков, в клетке происходит перераспределение цепей K11/K48, которые модифицируют вновь возникающие неструктурированные белки, что в свою очередь приводит к накоплению немодифицированного 73Q-НТТ [148].

Молекулы полиубиквитина, связанные через K63, составляют около 16% связей в дрожжевых клетках и, таким образом, являются третьими наиболее распространенными цепями после цепей K48 и K11. Ранее была разработана простая система убиквитинирования, использующая E3-лигазу Rsp5 типа НЕСТ и дегрон с PY-мотивом [149]. Белок Sic1, содержащий мотив PY (Sic1PY), с помощью лигазы Rsp5 сверх-убиквитинируется длинными K63-цепями. Убиквитинированный Sic1PY быстро подвергается деградации протеасомой; соответственно, эта система широко используется для анализа протеасомной функции [60, 87], но при этом, как уже было указано выше, цепи K63 практически не участвуют в протеасомной деградации в клетках. Одним из объяснений этого феномена может быть влияние белков, содержащих UBD (Ubiquitin-binding domain), специфичных к K63 связям *in vivo*. Кроме того, возможно, цепи, образованные через K63, на эндогенных субстратах слишком коротки, чтобы быть распознанными субъединицами протеасомы или адаптерными белками.

Линейные цепи убиквитина связываются с протеасомой менее эффективно, чем K48-содержащие цепи [150]. Единственный известный E3-лигазный комплекс, который способен собирать линейные полиубиквитиновые цепи, комплекс LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex), состоящий из трех белков: каталитической субъединицы RNF31 (HOIP) [151], RBCK1 (HOIL-1L) и SIPL1 (SHARPIN) [152–154]. OTULIN (FAM105B или GUMBY) является основным деубиквитинирующим ферментом (DUB) с высокой специфичностью к линейным полиубиквитинированным цепям [155]. Они не способствуют деградации белков протеасомой *in vitro* [140], тем не менее они могут делать это в дрожжевых клетках и клетках млекопитающих [156, 157] при искусственной сборке таких цепей, и в физиологических условиях при деградации протеинкиназы C и белка TRIM25 [158]. Недавно было обнаружено, что белки ATR, BRAP, LGALS7, PLAA, SEPT2, HDAC6, VDAC1 и TRAF6 также модифицируются линейными убиквитиновыми цепями. При этом данная модификация TRAF6 необходима для надлежащей работы IL-1 $\beta$ -зависимой сигнальной системы NF $\kappa$ B [159].

Интересно, что необходимый тип убиквитинирования при протеасомной деградации коррелирует с размерами и структурными особенностями самих субстратов. Так, в лизатах ретикулоцитов моноубиквитинирование является достаточным для индукции протеасомной деградации структурно неупорядоченных белков, содержащих менее 150 аминокислот [132, 160]. Недавнее протеомное исследование с использованием дрожжей и клеток млекопитающих, в которых весь убиквитин был заменен модифицированным убиквитином, не содержащим остатки лизина и неспособным к образованию полиубиквитиновых цепей [161], показало, что множество белков (~25% у дрожжей и ~50% в клетках человека, соответственно) подвергаются деградации благодаря моно- или множественному моноубиквитинированию, кроме того, данные субстраты имеют определенные особенности: в частности, большинство из них небольшого размера по сравнению с белками, подвергающимися полиубиквитинированию. Моноубиквитинированные субстраты чаще встречаются среди белков, участвующих в транспорте углеводов и окислительном стрессе, что, возможно, указывает на то, что за их моноубиквитинирование ответственны специфические E3-лигазы. В другой работе [162] было идентифицировано 1392 сайта убиквитинирования в 794 белках клеток HEK293T. Было обнаружено, что сайты убиквитинирования равномерно распределены по длине всех идентифицированных белков без значимого предпочтения к N- или C-концу, также не было выявлено очевидной корреляции между числом сайтов убиквитинирования и длиной белка. Кроме того, 506 из 794 идентифицированных белков содержали только один остаток лизина, конъюгированный с убиквитином, тогда как остальные 288 белков содержали несколько остатков лизина, модифицированных убиквитином. Шапероны HSP70-1 и HSC71 содержали 22 и 15 убиквитинированных остатков лизина, соответственно, тем не менее биологическая значимость такого обширного убиквитинирования остается загадкой.

В то время как физиологические функции были охарактеризованы для многих гомотипических убиквитиновых цепей, гетеротипические цепи остаются недостаточно изученными [163]. Помимо цепей K11/K48, были описаны четыре других типа гетеротипических цепей: K29/K48, K11/K63, K48/K63 и M1/K63. Существование и физиологическая роль других гетеротипических комбинаций является до сих пор открытым вопросом. Предыдущие исследования показывают, что наличие обоих типов связей в разветвленных цепях K11/K48 облегчает распознавание данных цепей протеасомными Ub-связывающими доменами и тем самым гарантирует приоритетный

доступ к протеасоме. Тем не менее, усиление сигнала за счет удлинения полиубиквитиновой цепи скорее маловероятно, так как скорее всего происходит обратное – связывание длинной цепи на большой площади приводит к тому, что рецептор, несущий Ub-связывающий домен, воспринимает это как уменьшение общего уровня сигнала.

#### *Система деубиквитинирования*

Убиквитиновые цепи на белках могут удлиняться и укорачиваться, даже когда субстраты уже связаны с протеасомой, благодаря действиям убиквитин-лигаз E3 и E4, и деубиквитинирующих ферментов DUBs. Все на настоящий момент известные деубиквитинирующие ферменты являются цистеиновыми либо металлопротеазами, которые специфично гидролизуют изопептидную связь сразу после С-концевого остатка Ub (Gly-76). В клетках млекопитающих было найдено около ста деубиквитинирующих ферментов и как минимум четыре из них ассоциированы с протеасомой (Rpn11, Ubr6, UCH37, Doa4). Ассоциированные с протеасомой DUBs в свободном виде обладают довольно слабой изопептидазной активностью, которая увеличивается при присоединении фермента к протеасоме. Присоединяясь к протеасоме, деубиквитиназы способны аллостерически воздействовать на некоторые функции протеасомы, например, на АТФазную активность, открытие входа в протеолитическую полость, а также на деградацию субстратов. Эти ферменты удаляют или постепенно укорачивают убиквитиновые цепи на субстрате, тем самым ограничивая время его связывания с протеасомой. Следовательно, белки, которые с трудом подвергаются гидролизу из-за жесткого фолдинга или ограниченно доступных сайтов инициации, будут разобщены с протеасомой после попыток разрушить его в течение определенного промежутка времени, тем самым освобождая место для следующего субстрата. В этой связи ингибиторы протеасом-ассоциированных DUBs, например Ubr6/Usp14, весьма перспективны в качестве лекарственных средств для терапии нейродегенеративных заболеваний, так как улучшают способность протеасомы к разрушению устойчивых субстратов предположительно за счет увеличения времени их взаимодействия с протеасомой [164]. Интересно, что ингибирование Ubr6/Usp14 также ускоряло протеолиз окисленных белков и в целом усиливало устойчивость клеток к окислительному стрессу. Ингибиторы других деубиквитинирующих ферментов, наоборот, могут приводить к накоплению убиквитинированных белков [165], что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных препаратов

для лечения злокачественных новообразований. В этом случае биологический эффект их воздействия в целом схож с действиями ингибиторов протеасомы, которые уже успешно используются в лечении множественной миеломы [166].

Детализация структуры 19S регуляторной субчастицы с помощью криоэлектронной микроскопии позволяет предположить, каким именно образом происходит активация DUBs при присоединении их к протеасоме, как эти ферменты способны влиять на конформацию 19S, и какую роль они могут играть в деградации субстрата.

**Rpn11.** Наиболее значимой DUB является субъединица «крышки» 19S регуляторного комплекса Rpn11, Zn<sup>2+</sup>-металлопротеиназа JАММ [61]. Rpn11 содержит каталитический JАММ мотив, который также был обнаружен еще в 7 белках человека, таких как субъединица Csn5 сигнаlosомы COP9, AMSH, AMSH-LP, BRCC36 субъединице BRISC, MPND и MYSM1 [167–169]. Консервативный JАММ домен содержит последовательность EX<sub>n</sub>HS/THX<sub>7</sub>SXXD, в которой остатки His и Asp фиксируют путем координации ион Zn<sup>2+</sup>, в то время как четвертая координационная связь занята молекулой воды, которая образует водородную связь с консервативным остатком Glu. Ион Zn<sup>2+</sup> действует как кислота Льюиса и усиливает нуклеофильность связанной воды, позволяя провести атаку изопептидной связи [168, 170]. Известно, что субъединица Rpn11 абсолютно необходима для активности протеасомы и жизнеспособности клеток [171]. Мутации в каталитическом сайте His109Ala и His111Ala не нарушают сборку протеасомы или её конформацию, но в значительной степени ингибируют функционал протеасомы и летальны в дрожжах [61]. Rpn11 располагается прямо над входом АТФазное кольцо [65], поэтому деубиквитинирование субстрата происходит до того, как убиквитин потеряет свою конформацию. Из-за такого расположения деубиквитиназы, считается что она не может расщеплять связи между внутренними убиквитидами в цепи, так как такая реакция стерически затруднена [172]. Способностью расщеплять убиквитиновые цепи по Ub–Ub связям обладает другая деубиквитиназа Ubr6, нестехиометрически связанная с протеасомой [173]. Rpn11 образует гетеродимерный комплекс с субъединицей Rpn8, благодаря его MPN-домену (Mpr1/Pad1 N-terminal) [174, 175]. Кристаллические структуры гетеродимера Rpn11-Rpn8 показали, что петля Rpn11 Insert-1 способна блокировать доступ в активный центр деубиквитиназы, однако эта же петля участвует в реакции расщепления изопептидной связи. Субъединица Rpn5 стабилизирует данное неактивное состояние Rpn11, тем самым предотвращая деубиквитинирующую активность Rpn11 до включения ее в протеасому [176]. Связывание убиквитина

индуцирует конформационную перестройку в Rpn11 и петля Insert-1 переходит из закрытого неактивного состояния в  $\beta$ -шпильку, тем самым открывая доступ в активный центр. Это переключение является скоростью-лимитирующим для деубиквитинирования и сильно ускоряет механическую транслокацию субстрата в АТФазное кольцо, тем самым ускоряет удаление убиквитина с захваченных субстратов снижает вероятность гидролиза убиквитина вместе с субстратом [177].

**Ubr6/Usp14.** У дрожжей деубиквитирующий фермент Ubr6 и его высококонсервативный гомолог в клетках млекопитающих Usp14, также как и Rpn11, связан с «крышкой» 19S регуляторного комплекса [178]. Ubr6 сначала идентифицировали как протеасомный DUB с использованием ингибитора убиквитинвинилсульфон (UbVS, производное убиквитина с модификацией на С-конце), который связывается с каталитическим остатком цистеина этой деубиквитиназы [179]. Удаление Ubr6 из протеасомы ускоряет деградацию модельных субстратов *in vitro* [180] и не является летальным у *S. cerevisiae* [181]. Однако это приводит к замедлению клеточного роста вследствие увеличения объемов деградации протеасомных субстратов и истощения свободного убиквитина [182]. В эмбриональных фибробластах, нокаутных по Ubr6, наблюдается повышенная деубиквитирующая активность Rpn11, а также увеличенное количество субъединиц Rpn13 и деубиквитиназы Uch37 в составе протеасомы, кроме того протеасомы, лишённые Ubr6, более активно гидролизуют неубиквитинированные белки [183]. Также при отсутствии убиквитинированного субстрата Ubr6 подавляет базальный гидролиз АТФ и неубиквитинированных субстратов. Таким образом, неактивные протеасомы практически не гидролизуют АТФ, кроме того снижается вероятность неспецифического протеолиза и повышается специфичность для убиквитинированных субстратов. Взаимодействие с протеасомой активирует Ubr6 примерно в 300 раз [182] и в присутствии негидролизуемого аналога АТФ $\gamma$ S смещает конформацию 19S регуляторной субчастицы в конформацию, аналогичную субстрат-связанному состоянию (s3), что приводит к двукратному увеличению эффективности расщепления субстрата убиквитин-АМС [184]. Перед захватом субстрата протеасомой N-концевой UBL домен Ubr6 связывается с Rpn1, а его каталитический USP домен может позиционироваться различно, но при взаимодействии с АТФазным кольцом происходит стимуляция деубиквитирующей активности фермента, вероятно, путем изменения конформации двух блокирующих поверхностных петель BL1 и BL223, активность еще больше увеличивается при захвате убиквитинированного субстрата

[184, 185]. Ubr6, связанный с убиквитином, поддерживает в коаксиально выровненном состоянии N-кольцо, кольцо AAA+ и 20S частицу [184]. Таким образом, убиквитин-связанный Ubr6 стимулирует АТФазную активность, открытие входа в 20S протеасому и ингибирование захвата субстрата путем дестабилизации состояния s1 (субстрат-акцептирующее) или предотвращения возврата протеасомы в это конформационное состояние [182, 184, 185]. В совокупности Ubr6 играет одну из ключевых ролей в аллостерической регуляции протеасомы, частично в зависимости от его собственного связывания с убиквитином. Кроме того, было показано, что протеасомы, содержащие Ubr6, способны распознавать субстраты с множественным убиквитинированием, в то время как протеасомы без данной убиквитиназы лишены такого функционала. Ubr6 и Rpn11 с одинаковой эффективностью расщепляют K11 и K63 цепи, причем эффективность возрастает с увеличением длины. В случае K48 наблюдалась обратная зависимость, при этом Ubr6 отщепляет K48 цепи эффективнее Rpn11 [186], а расщепление происходит только в том случае, когда более одной цепи прикреплено к субстрату [173]. Ближний к субстрату убиквитин не может быть отщеплен Ubr6, поскольку, вероятно, данный сайт стерически недоступен для данной деубиквитиназы, независимо от позиционирования субстрата. Если цепь, которую обошла Ubr6 коротка, то гидролиз субстрата будет остановлен, если же длины будет достаточно, то взаимодействие субстрат-протеасома сохранится и гидролиз продолжится, а данная цепь будет удалена Rpn11 после инициации транслокации субстрата [173]. Таким образом, Ubr6 скорее всего участвует в удалении избыточных остатков убиквитина с субстрата [173].

**Uch37.** Цистеин-зависимая DUB Uch37 была обнаружена как субъединица 19S регуляторного комплекса у *H.sapiens* и *Drosophila melanogaster*. Данную деубиквитиназу обнаружили в *Schizosaccharomyces pombe* (Uch2), но не в *S. cerevisiae*. Аналогично Ubr6, Uch37 активируется при связывании с протеасомой. Поперечная петля активного сайта Uch37 блокирует каталитический цистеин [187], но при взаимодействии с N-концевым деубиквитиназным адаптором (DEUBAD, C-terminal deubiquitinase adaptor domain) домена Rpn13, стабилизируется в одном состоянии, что приводит к увеличению сродства к убиквитину [188, 189]. В экзопротеасомной Rpn13 домен DEUBAD взаимодействует внутримолекулярно с доменом Pgu и уменьшает аффинность к убиквитину этой рецепторной субъединицы. При связывании Rpn13 с протеасомой данное взаимодействие нарушается, что делает вышеуказанные домены доступными для связывания убиквитина и активации Uch37 [190]. Подобные

наблюдения позволяют утверждать, что Rpn13 активирует Uch37 только в протеасомном комплексе [188, 189]. В протеасоме Uch37 способна расщеплять дистальные K48-, K6- и K11 убиквитиновые цепи, предполагается, что она может редактировать убиквитинированные субстраты и позволяет высвобождать недостаточно убиквитинированные и слишком медленно гидролизующиеся убиквитинированные белки из протеасомы [191]. Кроме того, Uch37 может удалять с субъединиц протеасомы убиквитин, имеющий регуляторную функцию [86], а также расщеплять убиквитиновые цепи и освобождать от них протеасомные рецепторы для непрерывной загрузки субстратов [192]. Несмотря на удаленность данной деубиквитиназы от АТФазного кольца [193], Uch37 также стимулирует открывание ворот и активность АТФаз протеасомы, что позволяет предположить о способности Uch37, подобно Ubr6, влиять на конформационное состояние протеасомы [194]. Эти данные демонстрируют тесную аллостерическую взаимосвязь между всеми протеасомными субъединицами. Дрожжевой белок Doa4 также является деубиквитиназой, ассоциированной с 19S регулятором, но связана она менее прочно по сравнению с Ubr6 и Uch37 [195].

Показано, что E3 убиквитин-лигазы также могут связываться с протеасомой [196]. В частности, E3 убиквитин-лигаза Hul5 ассоциирована с Ubr6 в составе 19S регуляторного комплекса и противодействует функциональной активности Ubr6 путем увеличения длины полиубиквитиновой цепи [197], что позволяет регулировать скорость разрушения белка. Важно отметить, что присоединение убиквитина к субстрату непосредственно на протеасоме делает его деградацию более процессивной, так как позволяет избежать образования частично деградированных фрагментов белка [198] путем их повторного убиквитинирования по мере того как протеасома «проходит» вдоль полипептидной цепи протяженных белков [199].

#### *Убиквитин-подобные белки*

Некоторые убиквитин-подобные белки (ubiquitin-like, UBL), называемые убиквитин-подобными модификаторами (ULM, Ubiquitin-like modifiers), структурно схожи с убиквитином и также подвергаются конъюгации с другими белками в реакциях, катализируемых ферментами, которые являются сходными (но не идентичными) с E1–E3 ферментами системы убиквитинирования. Функции ULM включают в себя большое разнообразие процессов, включая аутофагию, ядерный перенос белков, сцепление/сегрегация реплицированных хромосом, репарацию ДНК и множество других путей передачи сигналов. Каждый член данного семейства имеет β-«зажим» (grasp fold), сос-

тоящий из пятицепочечного  $\beta$ -листа, который частично обернут вокруг центральной  $\alpha$ -спирали [200]. UBL белки подразделяют на два типа: белки I типа модифицируют субстрат (SUMO, NEDD8, ATG8, ATG12, URM1, UFM1, FAT10, и семейство белков ISG15) [201], в то время как Ubl типа II обычно входят в состав многодоменных белков – многие из них были обнаружены в некоторых активирующих E1 ферментах, E3-лигазах и Ub/Ubl протеазах. Так, белки Hub1 и Esc2, в которых присутствует автономный домен Ubl, также можно рассматривать как Ubl типа II, поскольку не наблюдалась их конъюгация с субстратами [202, 203].

**SUMO.** Модификация белков посредством присоединения белка SUMO (Small ubiquitin-like modifier), называемая сумоилированием, играет существенную роль в регуляции различных клеточных процессов, таких как ядерный транспорт, транскрипция, репарация и репликация ДНК, апоптоз и стабилизация белковых молекул, кроме того она играет критическую роль в продвижении клетки по клеточному циклу [204]. Так же как и убиквитинирование, присоединение SUMO к субстрату происходит через образование изопептидной связи между C-концевым остатком глицина в молекуле SUMO и  $\epsilon$ -аминогруппой остатка лизина в молекуле субстрата. Патогены и стресс (например, тепло, окислительный стресс, недостаточное кровоснабжение) приводят к глобальным изменениям паттерна сумоилирования. Нарушение сумоилирования конкретных субстратов, а также глобальный сбой регуляции сумоилирования способствует развитию таких серьезных нарушений, как злокачественные новообразования и сердечная недостаточность [205].

**FAT10.** Ковалентная модификация убиквитин-подобным белком FAT10 (F-adjacent transcript-10) способствует убиквитин-независимой протеасомной деградации белков [206]. Как и другие ULM, FAT10 конъюгируется с субстратами посредством изопептидной связи, образованной каскадом ферментов E1 и E2, где UBA6 (также называемый UBE1L2, E1-L2 или MOR-4) и USE1 (UBA6-специфический E2) активируют и конъюгируют FAT10 с субстратами, соответственно [207, 208]. FAT10 участвует в нескольких важных клеточных процессах, таких как апоптоз и активация NF- $\kappa$ B. Базальная экспрессия FAT10 наиболее значима в органах иммунной системы, таких как тимус, печень, лимфатические узлы и селезенка. Кроме того, экспрессия FAT10 может индуцироваться провоспалительными цитокинами IFN $\gamma$  и TNF, и его экспрессия увеличивается в дендритных клетках во время их созревания [206]. Мыши с недостатком FAT10 являются жизнеспособными и фертильными, что указывает на слабую зависимость конститутивных функций от FAT10 [209].

Тем не менее, лимфоциты нокаутных по FAT10 мышей более склонны к спонтанной апоптотической смерти, кроме того данные мыши продемонстрировали высокий уровень чувствительности к введению эндотоксина [210]. По некоторым данным FAT10 сам может подвергаться гидролизу протеасомой убиквитин-независимо благодаря его способности взаимодействовать с VWA-доменом убиквитин-связывающей субъединицы протеасомы Rpn10 [206], однако также существует альтернативное мнение, что данный белок разрушается протеасомой с участием убиквитина [211].

#### *Рецепторы убиквитина*

Убиквитинированные субстраты распознаются рецепторами убиквитина и далее подвергаются протеасомой деградации. Рецепторы можно классифицировать в соответствии с их ассоциацией с протеасомой: протеасомные рецепторы, которые на постоянной основе входят в состав 19S регуляторного комплекса, и внепротеасомные белки, которые связывают убиквитиновые субстраты и доставляют их к протеасоме.

#### *Протеасомные рецепторы убиквитина*

Было показано, что три субъединицы 19S регуляторного комплекса способны связывать убиквитинированные субстраты: Rpn13 [59], Rpn1 [60] и Rpn10 [212]. Субъединицы Rpt5 [213] и Rpn15 [214] также рассматриваются в качестве возможных рецепторов убиквитина, поскольку было показано, что они обладают способностью связывать убиквитин, но действительно ли они распознают убиквитинированные субстраты, направленные на гидролиз в протеасому, не до конца ясно.

Каждый убиквитиновый рецептор размещается на расстоянии 70-80 Å от входа в N-кольцо АТФаз, что приблизительно соответствует 4 молекулам убиквитина в составе полиубиквитиновой цепи. Через N-кольцо и начинается протягивание субстрата в протеолитическую полость. Размещение рецепторов на периферии протеасомного комплекса обеспечивает протеасоме возможность захватывать субстраты с разнообразной геометрией убиквитиновых цепей и свернутых доменов для более эффективного связывания, разворачивания и деубиквитинирования.

**Rpn10.** Рецептор Rpn10 (S5a/PSMD4 у млекопитающих) был первым обнаруженным рецептором убиквитина. Он способен связывать убиквитиновые цепи, а также убиквитин-подобные (UBL, ubiquitin-like) домены субстратов благодаря своим убиквитин-связывающим мотивам (UIMs, ubiquitin-interacting motif) [215, 216], в то время как свободный Ub связывается значительно слабее. Rpn10

является уникальным убиквитиновым рецептором, так как он способен функционировать как в связанной с протеасомой форме, так и в свободном состоянии, что было показано для *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* и *A. thaliana* [217]. Rsp5-зависимое моноубиквитинирование опосредует отделение Rpn10 от протеасомы и приводит к его накоплению в цитоплазме [74]. Существует предположение, что свободный Rpn10 работает как адапторный (шаттл) белок, связывая убиквитинированные субстраты, тем самым увеличивая процессивность протеасомы, возможно компенсируя низкую способность к диффузии такого большого протеолитического комплекса [218]. Кроме того, Rpn10, связанный с протеасомой, захватывает полиубиквитинированные субстраты, тогда как его свободная форма демонстрирует высокое сродство к UBL доменам белков Dsk2 [217] и Rad23/hHR23 [219]. Моноубиквитинирование Rpn10 регулирует его способность связывать субстраты, поскольку данная модификация способствует внутримолекулярным взаимодействиям, которые уменьшают способность UIM Rpn10 связывать убиквитинированные белки [220]. Rpn10 содержит N-концевой домен Ville Willebrand A (VWA), который способствует связыванию Rpn10 с протеасомой и деградации некоторых убиквитинированных субстратов [221], также Rpn10 имеет два UIM (UIM1 и UIM2), домена, благодаря которым Rpn10 связывает K48 и K63-разветвленные цепи убиквитина [222]. Дрожжевой ортолог Rpn10 обладает только одним UIM, который распознает K48 полиубиквитиновые цепи [223]. Нарушение связывания убиквитина с убиквитиновыми рецепторами не приводит к гибели клеток *S. cerevisiae*, но при этом происходит накопление полиубиквитинированных белков [59, 60]. У высших эукариот делеция UIM Rpn10 летальна для *Mus musculus*, тогда как при делеции Rpn13 мыши жизнеспособны, но имеют тканеспецифичные отклонения протеасомных функций [224, 225], что вероятно говорит о существовании специфических субстратов для некоторых рецепторов.

**Rpn13.** Rpn13 первоначально идентифицировали как субъединицу 19S регуляторного комплекса у дрожжей, у млекопитающих он был впервые обнаружен как 46-кДа мембранный гликопротеин (называемый ADRM1/GP110), экспрессия которого индуцируется IFN $\gamma$  во время адгезии клеток [226]. ADRM1/GP110 был позже идентифицирован как субъединица 19S регуляторной субчастицы, гомологичная Rpn13 дрожжевой протеасомы [227]. Рецептор Rpn13 связывает убиквитинированные субстраты своим N-концевым плекстрин-подобным доменом [58]. Другим важным регионом Rpn13 является мотив KEKE C-терминального деубиквитинового

адапторного домена (DEUBAD), который связывает и активирует деубиквитиназу DUB Uch37. Вместе они функционируют как «редактирующий» комплекс, который посредством удаления лишних мономеров позволяет избежать убиквитинированных субстратов со слишком большим количеством молекул убиквитина [228] вплоть до длины, которая является оптимальной для ассоциации субстрата с протеасомой и способствует его эффективной деградации. Rpn13 и Uch37 могут оказывать синергетическое воздействие на деградацию убиквитинированных субстратов, таких как ингибитор NF- $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) [229]. Мыши, дефицитные по Rpn13 жизнеспособны, но они являются бесплодными и у них наблюдается снижение протеасомной активности в семенниках и головном мозге. Кроме того, нокаут Rpn13 приводит к увеличению количества жира в организме и аномальным уровням гормона роста и фолликулярно-стимулирующего гормона [225]. Субъединица Rpn13 связана с деградацией печеночной киназы B1 (LKB1) – ключевого регулятора аутофагии [230], что может объяснить, каким образом Rpn13 участвует в регуляции жировых отложений, деградируемых при помощи аутофагии [231]. Нехватка Rpn13 уменьшает захват Паркина 26S протеасомой и вызывает задержку аутофагосомного клиренса митохондриальных белков [232], так как Rpn13 предположительно способна участвовать в регуляции митофагии. Сверхэкспрессия Rpn13 увеличивает рост раковых клеток и их миграцию, тогда как ингибирование Rpn13 индуцирует апоптоз и подавляет прогрессию новообразований [233]. Повышение уровня Rpn13 связано с множественной миеломой [234] и другими видами злокачественных образований, включая рак яичников [235], толстой кишки [236] и желудка [237]. Два низкомолекулярных ингибитора Rpn13, RA190 [238] и KDT-11 [239], были разработаны для терапии злокачественных новообразований. В отличие от протеасомных ингибиторов, которые нацелены на каталитические субъединицы протеасомы, бис-бензилиденпиперидон RA190 ингибирует Rpn13-зависимые функции. Он ковалентно связывается с цистеином 88 Pru домена Rpn13 и разрушает междоменные взаимодействия в Rpn13 [238]. RA190 может вызвать апоптоз клеток множественной миеломы, связанный со стрессом эндоплазматического ретикулаума. Важно отметить, что использование данного ингибитора может помочь избежать серьезных клинических осложнений, сопровождающих использование бортезомиба и карфилзомиба [240]. KDT-11 структурно различается с RA190 и взаимодействует с определенным участком Rpn13 со средней аффинностью ( $K_D \approx 2$  мкМ). Этот ингибитор

проявляет синергетический эффект с бортезомибом при сочетанной терапии множественной миеломы [239].

**Rpn1.** Субъединица Rpn1 только недавно была идентифицирована как убиквитиновый рецептор [60]. Она содержит два сайта связывания белков T1 и T2. Белки UBL-UBA и убиквитиновые цепи связываются с T1, тогда как UBL домен Ubr6 связывается с T2 сайтом [60, 241]. Такое связывание облегчает ассоциацию Rpn1 с ее субстратами, адапторными белками и деубиквитирующими ферментами с последующим присоединением субстрата. Rpn1 входит в состав RP и взаимодействует с 20S частицей [65]. Rpn1 и Rpn2 формируют  $\alpha$ -спиральные соленоиды с тороидальной формой, служащие в качестве сайтов субстрат-рекрутирующих факторов. Rpn1 содержит девять сегментов с лейцин-богатыми повторами (LRR) [242]. Rpn1, как и другие убиквитиновые рецепторы, способен взаимодействовать с адапторными белками, в том числе с Ddi1 и Ubr6. Так, связывание Ddi1 с протеасомой зависит непосредственно от модификации остатка D517 в LRR1 домене Rpn1 [243].

#### *Внепротеасомные рецепторы убиквитина*

В дополнение к стехиометрическим протеасомным рецепторам убиквитина, внепротеасомные адаптерные UBL-UBA белки также могут служить в качестве убиквитиновых рецепторов. На настоящий момент известно три семейства белков-посредников в дрожжах, имеющих гомологи у высших эукариот, работающих по схожему механизму: Rad23, Dsk2 и Ddi1. Каждый из них содержит убиквитин-подобный домен (UBL), взаимодействующий с протеасомой, и один или два убиквитин-ассоциированных домена (UBA), связывающих полиубиквитиновые цепи. Это UBL-опосредованное взаимодействие происходит путем связывания с субъединицами Rpn1, Rpn13 или Rpn10. Роль шаттл-белков в протеасомной деградации дискуссионна: в зависимости от концентрации они могут как ускорять, так и ингибировать гидролиз субстратов. Известно, что повышенная экспрессия Dsk2 ингибирует протеолиз и оказывает цитотоксическое действие [217]. Было показано, что данный эффект ослабляется связыванием UIM домена внепротеасомной Rpn10 с UBL доменом Dsk2.

Убиквитилены, эукариотические ортологи дрожжевого Dsk2, представляют собой семейство из четырех убиквитин-подобных белков, которые функционируют в качестве адаптерных белков. Было показано, что убиквитилены способствуют деградации поврежденных белков после окислительного стресса. Мутации убиквитилина, которые приводят к нарушению способности связываться с Rpn10, способствуют повышению количества убиквитинированных белков в

клетке, что в свою очередь приводит к образованию агрегатов, которые могут быть связаны с патогенезом некоторых нейродегенеративных заболеваний (например, амиотрофического бокового склероза, болезни Хантингтона и Альцгеймера [244]).

Rad23 содержит два UBA домена: центрально расположенный UBA1 и С-концевой UBA2, которые связывают моно- и полиубиквитинированные субстраты с различной аффинностью. UBA1 связывает K63-содержащие полиубиквитиновые цепи с более высокой аффинностью, чем K48-содержащие цепи, тогда как домен UBA2 предпочтительно связывает цепи K48 [245]. Кроме того, убиквитинированные белки, связанные с Rad23, защищены от последующих модификаций их убиквитиновых цепей, таких как удлинение цепи, а также от деубиквитинирования. Предполагается, что этот стабилизирующий эффект обеспечивает эффективную доставку субстрата к протеасоме [246]. Rad23 также участвует в деградации, ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом (ERAD), путем ассоциации его Rad4-связывающего домена с дегликозилазой Png1 с образованием комплекса, который опосредует протеасомную деградацию определенного набора белков эндоплазматического ретикулума [247].

Несмотря на то, что UBL–UBA белки непосредственно взаимодействуют с протеасомой, сами они не подвергаются гидролизу протеасомой. Стабильность Dsk2 и Rad23 объясняется наличием С-концевого UBA-домена, защищающего неструктурированный участок, способный инициировать деградацию [248, 249]. Существуют данные, согласно которым неупорядоченный участок Rad23 не может инициировать гидролиз независимо от наличия UBA-домена, что может свидетельствовать о существовании у протеасомы определенных предпочтений к аминокислотному составу неструктурированных участков [142].

Белок p62 (секвестосома 1) представляет собой адаптерный белок [250], который связывает убиквитинированные субстраты своим С-концевым UBA доменом, и также связывается с субъединицами протеасомы Rpt1 и Rpn10 N-концевым доменом RB1136, тем самым способствуя доставке белков (например, tau) на протеасомную деградацию [251]. p62 действует и как рецептор убиквитина при аутофагии, непосредственно связываясь с белком LC3 – известным медиатором образования аутофагосом [252]. Роль p62 в качестве рецептора убиквитина как в протеасомной, так и в опосредованной аутофагией деградации убиквитинированных белков также подтверждается тем фактом, что уменьшение количества эндогенного p62 приводит к накоплению убиквитинированных белков.

*p97/VCP/Cdc48p*

В дополнение к убиквитиновым рецепторам протеасомы и адаптерным белкам UBA–UBL, существуют и другие белки, способные связывать убиквитинированные субстраты и направлять их на гидролиз в протеасому. p97 (также известный как валозин-содержащий белок (VCP) у млекопитающих или Cdc48p в *Saccharomyces cerevisiae*) является эволюционно консервативной АТФазой, присутствующей во всех эукариотах и археобактериях. p97/VCP/Cdc48p относится к большому семейству АТФаз, называемому AAA+. Ферменты этого семейства часто выступают в качестве важных шаперонов, которые способствуют сворачиванию или разворачиванию белков, кроме того p97 участвует в синтезе и репарации ДНК, слиянии мембран, разборке митотического веретена, аутофагии и протеасомной деградации. В соответствии с важной ролью данного фермента в контроле качества белков, мутации в p97 могут вызывать некоторые нейродегенеративные заболевания [253].

Белок p97/Cdc48p имеет два АТФазных домена AAA (D1 и D2, соответственно). Короткий полипептидный линкер (линкер D1-D2) соединяет два АТФазных домена, а другой линкер (N-D1-линкер) соединяет D1 с большим N-концевым доменом. К карбоксильному концу домена D2 присоединен короткий участок, содержащий ~ 40 аминокислотных остатков. Взаимодействие p97/Cdc48p с белками-партнерами в основном опосредовано N-концевым доменом, хотя некоторые белки связываются с p97/Cdc48p через C-конец. Шесть мономеров Cdc48 образуют двухкольцевую структуру, окружающую центральную пору. Домены D1 и D2 гомологичны как по последовательности, так и по структуре, тем не менее они имеют разные функции. Например, для сборки гексамера p97 требуется только домен D1, но не D2.

В клетках млекопитающих p97 локализуется главным образом в цитоплазме во фракциях, связанных с мембранами субклеточных органелл, таких как эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, митохондрии и эндосомы. По-видимому, примембранная локализация опосредуется некими мембранными рецепторами, идентифицировать которые на настоящий момент не удалось. p97/Cdc48p также присутствует в ядре и участвует в контроле качества ядерных белков [254]. p97 является одним из наиболее распространенных белков в эукариотических клетках. У людей экспрессия мРНК p97 умеренно увеличивается при определенных типах онкологических заболеваний, а уровень экспрессии в некоторой степени коррелирует с чувствительностью раковых клеток к ингибитору p97, который в

настоящее время считается потенциальным препаратом для лечения злокачественной трансформации [255].

Механизм действия Cdc48/p97 довольно плохо изучен, несмотря на его важнейшую роль во многих клеточных системах. Наиболее известные субстраты p97/Cdc48 конъюгированы с полиубиквитиновыми цепями и подвергаются деградации с помощью 26S протеасомы. Соответственно, многие кофакторы, а также адаптеры p97/Cdc48 способны распознавать убиквитиновые конъюгаты [256]. Считается, что ассоциация Cdc48 с убиквитинированными белками достигается с помощью посредников, способных распознавать как p97, так и убиквитин, в роли которых могут выступать убиквитин-лигазы. p97 может связываться с убиквитин-лигазами и деубиквитиназами, которые редактируют убиквитиновую цепь субстрата, делая ее пригодной для узнавания протеасомой или же, наоборот, помогая субстрату избежать гидролиза. В конечном счете ассоциированная с p97 убиквитин-лигаза привлекает адапторный белок, осуществляющий доставку субстрата в протеасому. Таким образом, p97 определяет судьбу белков, играя ключевую роль в убиквитин-зависимой деградации [257].

#### *Инициация деградации*

Протеасома распознает и связывает субстраты благодаря убиквитиновой метке, но инициация деградации происходит с неупорядоченного участка субстрата [122]. После того, как субстрат связывается с протеасомой, она начинает разворачивать полипептидную цепь с инициаторного участка и далее перемещать ее в протеолитическую полость, где непосредственно происходит деградация белка. Бактериальные протеазы семейства AAA+ распознают дегроны своих субстратов благодаря петлям, которые располагаются в центре кольца АТФазных субъединиц, и вполне вероятно, что протеасома может распознавать инициаторные сайты своих субстратов аналогичным образом [258]. В протеасоме эквивалентные петли окружают канал деградации, находясь на расстоянии 30-60Å от входа в протеолитический канал. Вход в канал является слишком узким, чтобы позволить фолдированным белкам проходить через него, поэтому неструктурированный полипептидный участок должен быть длиной по крайней мере 20-30 аминокислотных остатков, чтобы быть в досягаемости АТФазных петель. Подобная длина неструктурированного участка согласуется с результатами деградации *in vitro* в экспериментах с модельными протеасомными субстратами, в которых белки подвергаются гидролизу очищенной дрожжевой протеасомой быстрее, когда они содержат неструктурированный хвост длиной приблизительно в 30 аминокислот [259]. Таким образом, петли

AAA+ доменов АТФ-азного кольца, скорее всего функционируют как «лопасти», инициируя разворачивание субстрата и проталкивая его в протеолитическую полость.

Необходимость в неструктурированных инициаторных участках также находит свое отражение в глобальном профиле стабильности белков. По крайней мере 30% эукариотических белков содержат в своей структуре неупорядоченные области, которые необходимы данным белкам для выполнения их функций в клетках [260]. Существует ряд биоинформатических доказательств, что белки, которые содержат неупорядоченные области, имеют в среднем более короткий период полужизни, чем белки, в которых отсутствуют такие регионы [261, 262], но более достоверные доказательства такой взаимосвязи пока отсутствуют. Ряд других исследований свидетельствует об отсутствии таких корреляций [263–265], кроме того, существуют данные о том, что участки убиквитинирования протеасомных субстратов преимущественно располагаются в неструктурированных областях белка [266, 267]. Таким образом, даже в том случае, когда у белка отсутствует неструктурированная область, само по себе убиквитинирование может вызвать локальное разворачивание белка вблизи убиквитинированного остатка, которое в свою очередь, может стать инициаторным сайтом для протеасомы [268].

Убиквитиновый тег и сайт инициации не обязательно должны быть расположены на одной полипептидной цепи, они могут функционировать симбатно, находясь на разных полипептидных цепях белкового комплекса, так что убиквитинированная субъединица этого комплекса может способствовать деградации своего неубиквитинированного партнера [269]. Таким образом, убиквитинированная субъединица служит адаптером, который связывается с протеасомой и направляет связанный с ним белок на протеолиз. Предположительно, UBL–UBA белки функционируют схожим образом, действуя в качестве нестехиометрических убиквитиновых рецепторов для протеасомы [178].

С другой стороны, протеасома способна перестраивать белковые комплексы, гидролизуя только убиквитинируемую субъединицу и оставляя другие белки в комплексе интактными [270, 271]. Такое реструктурирование имеет важное значение для многих регуляторных процессов. Например, во время регуляции клеточного цикла у дрожжей, протеасома извлекает ингибитор циклин-зависимой киназы Sic1 из комплекса с циклином и циклин-зависимой киназой, гидролизуя исключительно Sic1 [272]. Вскоре после этого, циклин убиквитинируется, а затем подвергается гидролизу, оставляя интактную,

но при этом неактивную киназу [273]. Наиболее вероятным местом инициации деградации для протеасомы является, скорее всего, неструктурированная область субстрата, расположенная ближе ко входу в протеолитическую камеру. Действительно, эксперименты показывают, что инициаторный регион должен быть расположен на некотором расстоянии от убиквитинового тега для того, чтобы белок мог подвергаться гидролизу протеасомой. Данная структурная особенность обусловлена необходимостью одновременного связывания убиквитинового тега и захвата неструктурированного участка АТФазным кольцом протеасомы [259].

#### *Процессинг*

Хотя большая часть субстратов расщепляется протеасомой целиком, некоторые из них претерпевают ограниченный протеолиз. Протеасома способна распознавать так называемые «стоп-сигналы», закодированные в аминокислотной последовательности белка, например, ~60÷300-аминокислотные фрагменты, богатые остатками аланина и глицина (glycine-alanine repeat, GAR), найденные в белке EBNA1 вируса Эпштейна-Барр (EBV). Было показано, что EBNA1 способен распознаваться протеасомой с последующей инициацией деградации, однако продвижение субстрата по протеолитическому каналу останавливается по достижении участком GAR АТФ-азного кольца. Предполагается, что ароматические гидрофобные петли АТФ-азных субъединиц не могут должным образом удерживать остатки глицина и аланина вследствие их небольшого размера, из-за чего происходит «проскальзывание» полипептидной цепи, что влечет остановку транслокации субстрата и образование частично процессированных продуктов [274]. Блокирование протеолиза помогает вирусу Эпштейна-Барр избежать презентации антигенных пептидов EBNA1 на МНС I класса и, следовательно, иммунного ответа.

Другим хорошо изученным примером ограниченного протеолиза служит процессинг субъединицы p50 фактора транскрипции NF-κB из предшественника p105. NF-κB представляет собой гомо- или гетеродимер, причем наиболее представленной его формой является комплекс p50-p65. Сам предшественник p105 способен ингибировать активность NF-κB: образуя димеры с белками семейства NF-κB, он блокирует свой N-концевой сигнал ядерной локализации, тем самым удерживая транскрипционный фактор в цитоплазме. Активация сигнального пути NF-κB запускает процесс убиквитин-зависимого процессинга p105 протеасомой, что приводит к гидролизу его C-конца и высвобождению сигнала ядерной локализации. После этого p50 димеризуется с p65, образуя активный комплекс NF-κB, и

перемещается в ядро, где осуществляет регуляцию транскрипции. Было показано, что остановка протеасомы при процессинге p105 в p50 осуществляется за счет «стоп-сигнала», состоящего из двух компонент: участка с большим количеством остатков глицина и следующего за ним плотно уложенного домена (Rel-гомологичный домен) [198]. Похожие механизмы ограниченной деградации были описаны и для других факторов транскрипции, таких как Spt23 и Mga2 у дрожжей и Cubitus interruptus (Ci) у *Drosophila melanogaster*. Тем не менее наряду с частичным процессингом, p105 способен претерпевать и полный гидролиз, что сложно объяснить в рамках одной лишь вышеизложенной концепции. Недавно было показано, что p105 подвергается модификации не только ранее известной убиквитин-лигазой  $\beta$ TgCP, но и альтернативной КРС [275]. Оказалось, что судьба белка полностью определяется типом убиквитин-лигазы, участвующей в его модификации, что предполагает осуществление этими ферментами различных типов убиквитинирования, и, как следствие, образование различных специфических сигналов.

#### *Убиквитин-независимый протеолиз*

подавляющее большинство клеточных белков подвергается разрушению протеасомой с участием убиквитина, однако ряд белков может разрушаться без убиквитинирования [276]. В этих случаях субстрат должен иметь альтернативные возможности ассоциации с протеасомой, в качестве которых могут выступать как вспомогательные молекулы, так и участки внутри самого белка (дегроны). Дегроны (в общем случае) – это минимальные элементы, которые опосредуют взаимодействие белков с протеасомой, опосредуя их протеолиз. Несмотря на важность таких элементов в протеостазе, количество известных убиквитин-независимых дегронов, является очень небольшим.

Первым открытым и наиболее хорошо изученным примером убиквитин-независимого гидролиза протеасомой является орнитиндекарбоксилаза (ODC) – белок, участвующий в биогенезе полиаминов. Регуляция количества полиаминов важна для правильной пролиферации клеток, а повышение их концентрации сопряжено с различными паталогическими процессами, включая канцерогенез. Таким образом, количество внутриклеточной ODC должно строго контролироваться. Оптимальный уровень полиаминов в клетках эукариот поддерживается за счет обратной-отрицательной связи. Большая концентрация спермина и спермидина влечет увеличение экспрессии антизима AZ, который замещает одну ODC в каталитически активном гомодимерном комплексе, тем самым ингибируя ферментативную активность ODC. Кроме того, присоединение AZ

изменяет конформацию ODC, экспонируя ее С-концевой фрагмент, являющийся неструктурированным, что приводит к значительному ускорению ее гидролиза [277, 278]. Было установлено, что деградация ODC осуществляется 26S протеасомой, но не требует участия убиквитина, а 37-аминокислотный С-концевой участок ODC совмещает в себе два компонента: участок связывания с протеасомой и неструктурированный участок, инициирующий гидролиз [277, 278]. Присоединение данного фрагмента ODC к белкам, не являющимся субстратами протеасомы, также способствует их деградации по убиквитин-независимому пути.

Одно из возможных объяснений убиквитин-независимой деградации состоит в том, что неструктурированные участки белков связываются достаточно близко к петлям АТФазного кольца, так что для ассоциации белка с протеасомой убиквитин не требуется. Таким образом, этот механизм можно рассматривать как вариант обычного протеасомного дегрона, в котором отсутствует один из компонентов, а именно убиквитиновый тег, и напоминает дегроны, наблюдаемые в археях и бактериях [281].

Механизмы убиквитин-независимого гидролиза недостаточно хорошо изучены и вполне возможно, что белки, которые *in vitro* расщепляются изолированными 20S частицами в отсутствие АТФ [282], в естественных условиях подвергаются гидролизу 20S протеасомой, активированной альтернативными регуляторными комплексами [100], или даже 26S протеасомой [283]. Белки в этой группе убиквитин-независимых протеасомных субстратов имеют длинные неструктурированные участки. Кроме того, два альтернативных механизма протеасомной деградации, убиквитин-зависимый и убиквитин-независимый, не являются взаимоисключающими, и разные фракции одного и того же белка могут быть отправлены на деградацию по одному из двух путей.

подавляющее большинство субстратов 20S протеасомы состоят из белков, которые имеют частично или полностью неупорядоченную структуру из-за старения, мутаций или окисления [284]. Нативные белки, содержащие большие неструктурированные области (> 30 аминокислот в длину), называемые природно неупорядоченными областями (IDR, intrinsically disordered regions), или белки с полностью неупорядоченной последовательностью (природно неупорядоченные белки, IDP, intrinsically disordered proteins) [285], также подвержены деградации 20S протеасомой. В последней группе субстратов преобладают ключевые регуляторные и сигнальные белки, способствующие продвижению клетки по клеточному циклу, участвующие в контроле клеточного роста и канцерогенезе. Очевидно, что

уровень таких белков в клетке должен строго контролироваться, так как существенные изменения в их концентрации могут привести к развитию различных заболеваний [286].

На настоящий момент известно несколько белков, подвергающихся гидролизу 20S протеасомой, вследствие связывания субстратов непосредственно с данным протеасомным комплексом. Было показано, что белок IкВ $\alpha$  способен напрямую взаимодействовать с субъединицей PSMA2/ $\alpha$ 2 20S протеасомного комплекса благодаря определенным повторяющимся фрагментам в его последовательности [287], возможно тем самым опосредуя убиквитин-независимый гидролиз белка. Не так давно было показано, что кальциневрин также взаимодействует с PSMA2/ $\alpha$ 2 и способствует деградации IкВ $\alpha$  по убиквитин-зависимому пути [288]. Субъединица PSMA4/ $\alpha$ 3 способна взаимодействовать с белком F вируса гепатита С и тем самым способствует его убиквитин-независимому гидролизу [289]. Есть данные о том, что субъединица PSMA7/ $\alpha$ 4 является одной из  $\alpha$ -субъединиц, которая взаимодействует с регуляторными субчастицами REG $\alpha$ / $\beta$  (PA28  $\alpha$ / $\beta$ ). Данный факт продемонстрирован с использованием двугибридной дрожжевой системы, а также ингибированием активации протеасомы полипептидом X белка вируса гепатита В, который связывается непосредственно с субъединицей PSMA7/ $\alpha$ 4 [290]. С-концевая часть PSMA7/ $\alpha$ 4 также специфически взаимодействует с N-концевой областью Rab7 и участвует в транспорте грузовых белков на позднем этапе эндоцитоза, но данное взаимодействие не способствует деградации Rab7 [291]. Белок паркин – E3-лигаза, участвующая в патогенезе болезни Паркинсона – взаимодействует своим С-концевым доменом IBR–RING с С-концевой областью PSMA7/ $\alpha$ 4 и может функционировать как вспомогательный белок при гидролизе субстратов протеасомой [292]. Наконец, PSMA7/ $\alpha$ 4 также взаимодействует с нуклеотид-связывающим олигомеризационным доменом белка 1 (NOD1), способствуя его деградации протеасомой [293]. PSMA3/ $\alpha$ 7 также является одной из субъединиц, которая взаимодействует с субчастицами REG $\alpha$ / $\beta$  (PA28 $\alpha$ / $\beta$ ), опосредуя протеасомную активацию вместе с PSMA1/ $\alpha$ 1 и PSMA7/ $\alpha$ 4. С-конец p21WAF1/CIP1 взаимодействует с PSMA3/ $\alpha$ 7, что способствует его деградации по убиквитин-независимому механизму [294]. Помимо этого, также было показано, что несколько белков выступают в качестве посредников и способствуют гидролизу p21 протеасомой. Так MDM2, E3 убиквитин-лигаза, не убиквитинирует p21, но связывается с данным белком, тем самым усиливая связывание p21 с субъединицей PSMA3/ $\alpha$ 7 протеасомы [295]. Наконец, связывание p21 с регуляторной субчас-

тицей REG $\gamma$  (PA28 $\gamma$ ) также опосредует деградацию p21 протеасомой [94]. Белок SRC-3/AIB1 является коактиватором стероидных рецепторов, который может взаимодействовать непосредственно с субъединицей PSMA3/ $\alpha$ 7 [296] или связываться с REG $\gamma$  (PA28 $\gamma$ ) для деградации протеасомой [98]. MDM2 также связывается с PSMA3/ $\alpha$ 7 и способствует взаимодействию белка ретинобластомы Rb с данной субъединицей, что аналогично приводит к убиквитин-независимой деградации Rb [297]. Наконец, N-концевая область (аминокислоты 1–60)  $\alpha$ -синуклеина, белка, участвующего в болезни Паркинсона, взаимодействует с C-концевой областью PSMA3/ $\alpha$ 7, что также обеспечивает его деградацию [298]. Было показано, что PSMB6/ $\beta$ 1 напрямую связывается с белком p27Kip1, способствуя его деградации протеасомой [299]. Белок Smad1 подвергается гидролизу протеасомой как по убиквитин-зависимому механизму, так и без предварительной модификации убиквитином [300] путем связывания с PSMB4/ $\beta$ 7 и антизимоном AZ.

Список клеточных белков, деградация которых не требует предварительного убиквитинирования, постоянно расширяется. Белки, которые уже были подробно описаны [283, 301], включают: орнитин-декарбоксилазу (ODC), p21, p53, деградация которого ингибируется NAD(P)H – хинон-оксидоредуктазой 1 (NQO1), гидролиз белка c-Fos также ингибируется NQO1 [302], Fra-1, который напрямую взаимодействует с протеасомной регуляторной субчастицей 19S, TBP-1, имеющий убиквитин-независимый C-концевой дегрон [303], белок ретинобластомы Rb, альфа-синуклеин, HIF-1 $\alpha$ , SRC-3/AIB1 транскрипционный коактиватор, I $\kappa$ B $\alpha$ , Y- связывающий белок 1 (YB-1), тимидилатсинтазу (TS) и белок Tau, который участвует в патогенезе болезни Альцгеймера.

Недавно было обнаружено, что основной белок MBR, являющийся одним из основных аутоантигенов при рассеянном склерозе, подвергается гидролизу протеасомой без предварительной модификации убиквитином [304, 305]. Более того было показано, что количество иммуносубъединиц протеасомы увеличивается в центральной нервной системе мышей, развивающих экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ). При этом субъединица  $\beta$ 1 локализована преимущественно в олигодендроцитах – клетках, экспрессирующих MBR, а  $\beta$ 5i в основном в цитотоксических лимфоцитах, проникающих в центральную нервную систему через поврежденный гематоэнцефалический барьер [306] (рис. 7). В свете известных фактов о механизме работы протеасомы можно предложить, что MBR, вероятно, способен связываться либо с 19S регуляторной частицей, либо с одним из альтернативных регуляторов благодаря своему

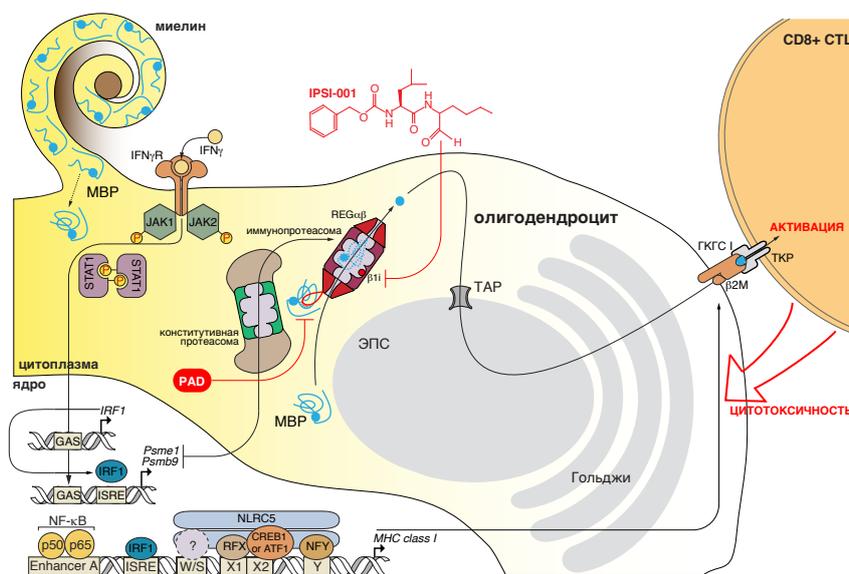


Рис. 7. Роль иммунопротеасомы в развитии аутоиммунной нейродегенерации, а также перспективные способы направленной терапии данного заболевания.

Протеасома является главным протеолитическим комплексом, генерирующим пептиды, презентуемые на поверхности клетки в контексте комплексов гистосовместимости I класса. Отсутствие контроля за гидролизом основного белка миелина (МВР) со стороны системы убиквитинирования означает, что качественный и количественный спектр пептидов МВР, презентуемых на поверхности олигодендроцитов, практически полностью определяется каталитическими субъединицами протеасомы. Было установлено, что при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита (ЕАЕ) – животной модели рассеянного склероза – в головном мозге иммунизированных животных под действием интерферона-гамма конститутивная протеасома в значительной степени замещается  $\text{PA}28\alpha\beta$ -иммунопротеасомой, при этом иммуноубъединица  $\beta 1i$  локализуется преимущественно в олигодендроцитах. Показано, что увеличенное содержание иммунопротеасомы в головном мозге мышей с ЕАЕ приводит к образованию повышенного количества ряда патогенных пептидов МВР, включая пептид ENPVVHFF, являющийся частью энцефалитогенного региона МВР. Активированные  $\text{CD}8^+$  Т-клетки, специфичные к данному пептиду, эффективно лизировали олигодендроциты, обработанные интерфероном-гамма. Специфический ингибитор иммуноубъединицы  $\beta 1i$  (IPSI-001) селективно воздействовал на иммунопротеасому *in vitro*, а также эффективно подавлял развитие ЕАЕ *in vivo* у экспериментальных животных. Полученные факты указывают на возможную связь между убиквитин-независимой протеолитической активностью иммунопротеасомы в отношении основного белка миелина и развитием рассеянного склероза, а также на перспективность специфических ингибиторов иммунопротеасомы как потенциальных лекарственных средств.

высокому положительному заряду [307], так как субъединицы 19S комплекса в большинстве своем заряжены либо нейтрально, либо отрицательно. Кроме того, недавние исследования показали, что иммунопротеасома, гидролизует основные неупорядоченные белки, такие как МВР и гистоны [308], быстрее, чем конститутивная протеасома.

В список убиквитин-независимых протеасомных субстратов входят белки, которые подвергаются гидролизу протеасомой убиквитин-независимо благодаря взаимодействию с альтернативными протеасомными активаторами, в основном REG $\gamma$  (PA28 $\gamma$ ) и PA200/BIm10. Кроме p21, субчастица REG $\gamma$  (PA28 $\gamma$ ) также участвует в протеасомной деградации других регуляторов клеточного цикла, таких как p16 (INK4A) и p19 (Arf) [94]. Цитидин-деаминаза, индуцированная активацией (AID, activation-induced cytidine deaminase), ответственная за инициацию диверсификации генов иммуноглобулинов в активированных В-лимфоцитах, подвергается убиквитин-независимому протеолизу также благодаря взаимодействию с REG $\gamma$  (PA28 $\gamma$ ). Активатор PA200/BIm10 связывается с 20S протеасомой своим С-концевым YUX-мотивом и активирует деградацию белка тау *in vitro* [309]. Совсем недавно было показано, что PA200/BIm10 способствует убиквитин-независимой деградации ацетилированных гистонов [110].

Были предприняты некоторые попытки определить минимальные требования к белковому субстрату, способному подвергаться гидролизу по убиквитин-независимому механизму [310–312], но обобщенного механизма данного процесса на настоящий момент не существует. Необходимо определить специфические и неспецифические взаимодействия с протеасомальными субъединицами, которые опосредуют этот процесс. Одной из критически важных проблем является идентификация протеасомных субъединиц в составе 20S, 19S или альтернативных регуляторных субчастиц, специфически взаимодействующих с теми белками, которые, как сообщается, подвергаются гидролизу по убиквитин-независимому механизму. В то же время существует гипотеза, что субстраты могут попадать в протеолитическую полость через боковую поверхность 20S субчастицы, используя свободное пространство между  $\alpha$  и  $\beta$  субъединицами, таким образом минуя торцевые каналы, которые блокированы N-концевыми пептидами  $\alpha$ -субъединиц [27].

Было обнаружено несколько защитных механизмов, которые избавляют частично или полностью неструктурированные белки от деградации, например, взаимодействие с так называемыми panny proteins, которые маскируют неструктурированные области [313], или

опосредованная окислением структурная стабилизация [298]. Однако на сегодняшний момент очевидно, что масштабы распространения данных механизмов еще предстоит изучить.

#### **IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Известно, что ингибирование или большая нагрузка на протеасому приводит к активации аутофагии у большинства типов клеток, что явно указывает на функциональную связь между двумя системами деградации. До настоящего момента хорошо изучено перераспределение деградации в направлении от протеасомы к аутофагии. В данном случае происходит компенсация сниженной протеолитической способности протеасомы, что ликвидирует опасность накопления потенциально токсичных белковых агрегатов. Достоверных доказательств существования противоположного сдвига – от аутофагии к протеасоме, активирующегося после нарушения аутофагии, на настоящий момент не существует. Известно, что в злокачественно трансформированных клетках толстой кишки ингибирование аутофагии при недостатке питательных веществ приводит к увеличению протеолитической активности протеасомы и повышению экспрессии ее субъединиц [314]. Тем не менее, в других работах не было выявлено повышения активности протеасомы при нарушении лизосомного механизма деградации [315]. Было показано, что при ингибировании аутофагии в клетках HeLa скорее всего ухудшается и деградация путем УПС из-за стабилизации белка p62, который в базовом состоянии подвергается гидролизу вместе с аутофагосомным грузом. Накопленный p62 секвестрирует убиквитинированные белки и тем самым задерживает их миграцию к протеасоме, однако на саму протеасомную активность данный белок не влияет [316]. Кроме того, компенсаторная функция протеасомы в случае нарушения аутофагии находится под большим сомнением вследствие значительного размера большинства аутофагосомных субстратов [317].

Помимо компенсаторной функции аутофагии при нарушениях работы протеасомы, обе системы пересекаются в нескольких аспектах для сбалансированной координации своих действий в протеостазе и гомеостазе органелл. УПС и аутофагия способны влиять друг на друга благодаря мощному механизму взаимного контроля уровня экспрессии их ключевых компонентов. Так, например, при окислительном стрессе рецептор аутофагии p62 опосредует аутофагосомную деградацию E3-лигазы Keap1 или деградацию целых протеасом в результате

протеофагии. LC3 также может подвергаться протеасомной деградации посредством 20S протеасомы, но может избежать протеолиза с помощью рецептора аутофагии p62 [318]. Наконец, в зависимости от клеточных условий аутофагия и протеасома имеют общие субстраты, а также общие регуляторные факторы. Было показано, что несколько основных регуляторов обоих путей физически взаимодействуют друг с другом, тем самым обеспечивая взаимный контроль и согласованность действий [14].

Наиболее значимой общностью обеих протеолитических систем является использование убиквитинирования в качестве сигнала деградации. Интересно, что даже лигазы E3, обладающие ярко выраженной субстратной специфичностью, не всегда модифицируют субстраты исключительно для одной системы деградации. Например, E3 лигаза Parkin, которая играет центральную роль в митофагии, опосредует протеасомную деградацию подмножества митохондриальных субстратов, тогда как другое подмножество её субстратов подвергается аутофагосомной деградации.

Таким образом, УПС и АЛС совместно формируют машинерию, способную отслеживать критические состояния в клетке и предотвращать токсичность, возникающую из-за неправильного сворачивания белков, а также очищать клетку от отслуживших белков и органелл. Две этих системы синергетически поддерживают клеточный протеостаз, при этом АЛС способна проявлять компенсаторный эффект, когда УПС дисфункциональна. В течение последних десятилетий были предприняты значительные усилия для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе УПС и АЛС. Изучение биохимических путей, соединяющих две эти системы, может помочь в разработке новых лекарственных средств, направленных на повышение клеточной чувствительности к ингибиторам внутриклеточной деградации с целью терапии онкологических заболеваний, а также для увеличения эффективности деградации неправильно свернутых белков для лечения нейродегенеративных заболеваний. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов УПС и АЛС, а также связей между ними, однозначно будет способствовать существенному прогрессу не только фундаментальной науки, но и активному развитию трансляционной медицины.

## ЛИТЕРАТУРА

- Schubert, U., Antón, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., Bennink, J.R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, **404**, 770–774.
- Joazeiro, C.A.P. (2017) Ribosomal Stalling During Translation: Providing Substrates for Ribosome-Associated Protein Quality Control. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **33**, 343–368.
- Brandman, O., Hegde, R.S. (2016) Ribosome-associated protein quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 7–15.
- Chiti, F., Dobson, C.M. (2017) Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 1–42.
- Lamark, T., Svenning, S., Johansen, T. (2017) Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem.*, **61**, 609–624.
- Kaganovich, D., Kopito, R., Frydman, J. (2008) Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature*, **454**, 1088–1095.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U. (2016) In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*, **353**, 6294, aac4354.
- McClellan, A.J., Tam, S., Kaganovich, D., Frydman, J. (2005) Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat. Cell Biol.*, **7**, 736–741.
- Labbadia, J., Morimoto, R.I. (2015) The Biology of Proteostasis in Aging and Disease. *Annu. Rev. Biochem.*, **84**, 1–30.
- Bard, J.A.M., Goodall, E.A., Greene, E.R., Jonsson, E., Dong, K.C., Martin, A. (2018) Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 697–724.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., Tooze, S.A. (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 759–774.
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425–479.
- Kwon, Y.T., Ciechanover, A. (2017) The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 873–886.
- Dikic, I. (2017) Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 193–224.
- Scott, D., Oldham, N.J., Strachan, J., Searle, M.S., Layfield, R. (2015) Ubiquitin-binding domains: Mechanisms of ubiquitin recognition and use as tools to investigate ubiquitin-modified proteomes. *Proteomics*, **15**, 844–861.
- Grice, G.L., Nathan, J.A. (2016) The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell. Mol. Life Sci.*, **73**, 3497–3506.
- Hartl, F.U. (2017) Protein Misfolding Diseases. *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 1–6.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L. (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, **78**, 761–771.
- Maupin-Furrow, J., Gil, M., Karadzic, I. (2004) Proteasomes: perspectives from the Archaea. *Front Biosci.*, **1**, 1743–1758.
- Dahlmann, B. (2016) Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function. *Arch. Biochem. Biophys.*, **591**, 132–140.
- DeMartino, G.N., Slaughter, C.A. (1999) The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **274**, 22123–22126.
- Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K.B., Tanaka, K. (2000) Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14336–14345.
- Fabre, B., Lambour, T., Delobel, J., Amalric, F., Monsarrat, B., Burlet-Schiltz, O., Bousquet-Dubouch, M.-P. (2013) Subcellular distribution and dynamics of active proteasome complexes unraveled by a workflow combining in vivo complex cross-linking and quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 687–699.
- Asano, S., Fukuda, Y., Beck, F., Aufderheide, A., Forster, F., Danev, R., Baumeister, W. (2015) A molecular

- census of 26S proteasomes in intact neurons. *Science*, **347**, 439–442.
25. Rechsteiner, M., Hill, C.P. (2005) Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol.*, **15**, 27–33.
  26. Ramachandran, K.V, and Margolis, S.S. (2017) A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 419–430.
  27. Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, **386**, 463–471.
  28. Groll, M., Huber, R. (2004) Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim. Biophys. Acta*, **1695**, 33–44.
  29. Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T., Huber, R. (2005) Molecular machines for protein degradation. *ChemBiochem*, **6**, 222–256.
  30. Zühl, F., Tamura, T., Dolenc, I., Cejka, Z., Nagy, I., De Mot, R., Baumeister, W. (1997) Subunit topology of the *Rhodococcus* proteasome. *FEBS Lett.*, **400**, 83–90.
  31. Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., Seemüller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, **92**, 367–380.
  32. Kunjappu, M.J., Hochstrasser, M. (2014) Assembly of the 20S proteasome. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 2–12.
  33. Osmulski, P.A., Hochstrasser, M., Gaczynska, M. (2009) A tetrahedral transition state at the active sites of the 20S proteasome is coupled to opening of the alpha-ring channel. *Structure*, **17**, 1137–1147.
  34. Rabl, J., Smith, D.M., Yu, Y., Chang, S.-C., Goldberg, A.L., Cheng, Y. (2008) Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol. Cell*, **30**, 360–368.
  35. Jones, C.L., Njomen, E., Sjögren, B., Dexheimer, T.S., Tepe, J.J. (2017) Small Molecule Enhancement of 20S Proteasome Activity Targets Intrinsically Disordered Proteins. *ACS Chem. Biol.*, **12**, 2240–2247.
  36. Goldberg, A.L. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, **426**, 895–899.
  37. Keck, S., Nitsch, R., Grune, T., Ullrich, O. (2003) Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, **85**, 115–122.
  38. Choi, W.H., de Poot, S.A. H., Lee, J.H., Kim, J.H., Han, D.H., Kim, Y.K., Finley, D., Lee, M.J. (2016) Open-gate mutants of the mammalian proteasome show enhanced ubiquitin-conjugate degradation. *Nat. Commun.*, **7**, 10963.
  39. Kulichkova, V.A., Fedorova, O.A., Tsimokha, A.S., Moiseeva, T.N., Botril, A., Lezina, L., Gauze, L.N., Konstantinova, I.M., Mittenberg, A.G., Barlev, N. (2010) 26S proteasome exhibits endoribonuclease activity controlled by extra-cellular stimuli. *Cell Cycle*, **9**, 840–849.
  40. Mittenberg, A.G., Moiseeva, T.N., Kuzzyk, V.O., Barlev, N.A. (2016) Regulation of Endoribonuclease Activity of Alpha-Type Proteasome Subunits in Proerythroleukemia K562 Upon Hemin-Induced Differentiation. *Protein J.*, **35**, 17–23.
  41. Kloetzel, P.M. (2004) Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TAP. *Nat. Immunol.*, **5**, 661–669.
  42. Sijts, E.J.A.M., Kloetzel, P.-M.M. (2011) The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell Mol. Life Sci.*, **68**, 1491–1502.
  43. Chatterjee-Kishore, M., Wright, K. L., Ting, J. P., Stark, G. R. (2000) How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J.*, **19**, 4111–4122.
  44. Chapiro, J., Claverol, S., Piette, F., Ma, W., Stroobant, V., Guillaume, B., Gairin, J.-E., Morel, S., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B., Boon, T., Van den Eynde, B. J. (2006) Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J. Immunol.*, **176**, 1053–1061.

45. Chen, W., Norbury, C., Cho, Y. (2001) Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8+ T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.*, **193**, 1319–1326.
46. Ebstein, F., Textoris-Taube, K., Keller, C., Golnik, R., Vigneron, N., Van Den Eynde, B. J., Schuler-Thurner, B., Schandendorf, D., Lorenz, F.K.M., Uckert, W., Urban, S., Lehmann, A., Albrecht-Koepke, N., Janek, K., Henklein, P., Niewianda, A., Kloetzel, P. M., Mishto, M. (2016) Proteasomes generate spliced epitopes by two different mechanisms and as efficiently as non-spliced epitopes. *Sci. Rep.* **6**, 24032.
47. Berkers, C.R., de Jong, A., Schuurman, K.G., Linnemann, C., Geenevasen, J.A.J., Schumacher, T.N.M., Rodenko, B., Ovaa, H. (2015) Peptide Splicing in the Proteasome Creates a Novel Type of Antigen with an Isopeptide Linkage. *J. Immunol.*, **195**, 4075–4084.
48. Berkers, C.R., de Jong, A., Schuurman, K.G., Linnemann, C., Meiring, H.D., Janssen, L., Neeffjes, J.J., Schumacher, T.N.M., Rodenko, B., Ovaa, H. (2015) Definition of Proteasomal Peptide Splicing Rules for High-Efficiency Spliced Peptide Presentation by MHC Class I Molecules. *J. Immunol.*, **195**, 4085–4095.
49. Liepe, J., Marino, F., Sidney, J., Jeko, A., Bunting, D.E., Sette, A., Kloetzel, P.M., Stumpf, M.P.H., Heck, A.J.R., Mishto, M. (2016) A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides. *Science*, **354**, 354–358.
50. Qureshi, N., Morrison, D.C., Reis, J. (2012) Proteasome protease mediated regulation of cytokine induction and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.*, **1823**, 2087–2093.
51. Uechi, H., Hamazaki, J., Murata, S. (2014) Characterization of the testis-specific proteasome subunit  $\alpha 4s$  in mammals. *J. Biol. Chem.*, **289**, 12365–12374.
52. Tomaru, U., Ishizu, A., Murata, S., Miyatake, Y., Suzuki, S., Takahashi, S., Kazamaki, T., Ohara, J., Baba, T., Iwasaki, S., Fugo, K., Otsuka, N., Tanaka, K., Kasahara, M. (2009) Exclusive expression of proteasome subunit 5t in the human thymic cortex. *Blood*, **113**, 5186–5191.
53. Murata, S., Takahama, Y., Tanaka, K. (2008) Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr. Opin. Immunol.*, **20**, 192–196.
54. Florea, B.I., Verdoes, M., Li, N., van der Linden, W.A., Geurink, P.P., van den Elst, H., Hofmann, T., de Ru, A., van Veelen, P.A., Tanaka, K., Sasaki, K., Murata, S., den Dulk, H., Brouwer, J., Ossendorp, F.A., Kisselev, A.F., Overkleeft, H.S. (2010) Activity-Based Profiling Reveals Reactivity of the Murine Thymoproteasome-Specific Subunit  $\beta 5t$ . *Chem. Biol.*, **17**, 795–801.
55. Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S.-i., Hayashi, H., Takahama, Y., Tanaka, K. (2007) Regulation of CD8+ T Cell Development by Thymus-Specific Proteasomes. *Science*, **316**, 1349–1353.
56. Sauer, R.T., Baker, T.A. (2011) AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 587–612.
57. Tomko, R.J., Funakoshi, M., Schneider, K., Wang, J., Hochstrasser, M. (2010) Heterohexameric Ring Arrangement of the Eukaryotic Proteasomal ATPases: Implications for Proteasome Structure and Assembly. *Mol. Cell*, **38**, 393–403.
58. Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N., Elsasser, S., Finley, D., Dikic, I., Walters, K.J., Groll, M. (2008) Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature*, **453**, 548–552.
59. Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K. J., Finley, D., Dikic, I. (2008) Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*, **453**, 481–488.
60. Shi, Y., Chen, X., Elsasser, S., Stocks, B.B., Tian, G., Lee, B.-H., Shi, Y., Zhang, N., de Poot, S.A.H., Tuebing, F., Sun, S., Vannoy, J., Tarasov, S.G., Engen, J.R., Finley, D., Walters, K.J. (2016) Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome. *Science*, **351**, 6275, aad9421.

61. Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., Koonin, E. V, and Deshaies, R. J. (2002) Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome. *Science*, **298**, 611–615.
62. Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., Finley, D. (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, **94**, 615–623.
63. Matyskiela, M.E., Lander, G.C., Martin, A. (2013) Conformational switching of the 26S proteasome enables substrate degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 781–788.
64. Sledz, P., Unverdorben, P., Beck, F., Pfeifer, G., Schweitzer, A., Forster, F., Baumeister, W. (2013) Structure of the 26S proteasome with ATP- S bound provides insights into the mechanism of nucleotide-dependent substrate translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 7264–7269.
65. Lander, G. C., Estrin, E., Matyskiela, M. E., Bashore, C., Nogales, E., Martin, A. (2012) Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature*, **482**, 186–191.
66. Schweitzer, A., Aufderheide, A., Rudack, T., Beck, F., Pfeifer, G., Plitzko, J. M., Sakata, E., Schulten, K., Förster, F., Baumeister, W. (2016) Structure of the human 26S proteasome at a resolution of 3.9 Å. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **113**, 7816–7821.
67. Djuranovic, S., Hartmann, M.D., Habbeck, M., Ursinus, A., Zwickl, P., Martin, J., Lupas, A.N., Zeth, K. (2009) Structure and Activity of the N-Terminal Substrate Recognition Domains in Proteasomal ATPases. *Mol. Cell*, **34**, 580–590.
68. Pathare, G.R., Nagy, I., Bohn, S., Unverdorben, P., Hubert, A., Korner, R., Nickell, S., Lasker, K., Sali, A., Tamura, T., Nishioka, T., Forster, F., Baumeister, W., Bracher, A. (2012) The proteasomal subunit Rpn6 is a molecular clamp holding the core and regulatory subcomplexes together. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 149–154.
69. Bech-Otschir, D., Helfrich, A., Enenkel, C., Consiglieri, G., Seeger, M., Holzhütter, H.-G., Dahlmann, B., Klotzel, P.-M. (2009) Polyubiquitin substrates allosterically activate their own degradation by the 26S proteasome. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 219–225.
70. Wang, X., Yen, J., Kaiser, P., Huang, L. (2010) Regulation of the 26S Proteasome Complex During Oxidative Stress. *Sci. Signal.*, **3**, 151, ra88.
71. Grune, T., Catalgol, B., Licht, A., Ermak, G., Pickering, A.M., Ngo, J.K., Davies, K.J.A. (2011) HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, **51**, 1355–1364.
72. Tsvetkov, P., Myers, N., Eliav, R., Adamovich, Y., Hagai, T., Adler, J., Navon, A., Shaul, Y. (2014) NADH binds and stabilizes the 26S proteasomes independent of ATP. *J. Biol. Chem.*, **289**, 11272–11281.
73. Huang, Q., Wang, H., Perry, S.W., Figueiredo-Pereira, M.E. (2013) Negative Regulation of 26S Proteasome Stability via Calpain-mediated Cleavage of Rpn10 Subunit upon Mitochondrial Dysfunction in Neurons. *J. Biol. Chem.*, **288**, 12161–12174.
74. Isasa, M., Katz, E.J., Kim, W., Yugo, V., González, S., Kirkpatrick, D.S., Thomson, T.M., Finley, D., Gygi, S.P., Crosas, B. (2010) Monoubiquitination of Rpn10 regulates substrate recruitment to the proteasome. *Mol. Cell*, **38**, 733–45.
75. Kikuchi, J., Iwafune, Y., Akiyama, T., Okayama, A., Nakamura, H., Arakawa, N., Kimura, Y., Hirano, H. (2010) Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast. *Proteomics*, **10**, 2769–2779.
76. Hirano, H., Kimura, Y., Kimura, A. (2016) Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. *J. Proteomics*, **134**, 37–46.
77. Cho-Park, P.F., Steller, H. (2013) Proteasome regulation by ADP-ribosylation. *Cell*, **153**, 614–627.
78. Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J., Kudlow, J.E. (2003) O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell*, **115**, 715–725.

79. Kimura, A., Kato, Y., Hirano, H. (2012) N-Myristoylation of the Rpt2 Subunit Regulates Intracellular Localization of the Yeast 26S Proteasome. *Biochemistry*, **51**, 8856–8866.
80. Bose, S., Stratford, F.L.L., Broadfoot, K.I., Mason, G.G.F., Rivett, A.J. (2004) Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem. J.*, **378**, 177–184.
81. Schmidtke, G., Schregle, R., Alvarez, G., Huber, E. M., Groettrup, M. (2017) The 20S immunoproteasome and constitutive proteasome bind with the same affinity to PA28 $\alpha\beta$  and equally degrade FAT10. *Mol. Immunol.*, 10.1016/j.molimm.2017.11.030.
82. Djakovic, S.N., Marquez-Lona, E.M., Jakawich, S.K., Wright, R., Chu, C., Sutton, M.A., Patrick, G.N. (2012) Phosphorylation of Rpt6 regulates synaptic strength in hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, **32**, 5126–5131.
83. Djakovic, S.N., Schwarz, L.A., Barylko, B., DeMartino, G.N., Patrick, G.N. (2009) Regulation of the Proteasome by Neuronal Activity and Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II. *J. Biol. Chem.*, **284**, 26655–26665.
84. Jarome, T., Kwapis, J.L., Ruenzel, W.L., Helmstetter, F.J. (2013) CaMKII, but not protein kinase A, regulates Rpt6 phosphorylation and proteasome activity during the formation of long-term memories. *Front. Behav. Neurosci.*, **7**, 115.
85. Lokireddy, S., Kukushkin, N.V., Goldberg, A.L. (2015) cAMP-induced phosphorylation of 26S proteasomes on Rpn6/PSMD11 enhances their activity and the degradation of misfolded proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**, 7176–7185.
86. Jacobson, A.D., MacFadden, A., Wu, Z., Peng, J., Liu, C.-W. (2014) Autoregulation of the 26S proteasome by in situ ubiquitination. *Mol. Biol. Cell*, **25**, 1824–35.
87. Besche, H.C., Sha, Z., Kukushkin, N.V., Peth, A., Hock, E.-M., Kim, W., Gygi, S., Gutierrez, J.A., Liao, H., Dick, L., Goldberg, A.L. (2014) Autoubiquitination of the 26S Proteasome on Rpn13 Regulates Breakdown of Ubiquitin Conjugates. *EMBO J.*, **33**, 1159–1176.
88. Hoeller, D., Crosetto, N., Blagoev, B., Raiborg, C., Tikkanen, R., Wagner, S., Kowanz, K., Breitling, R., Mann, M., Stenmark, H., Dikic, I. (2006) Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nat. Cell Biol.*, **8**, 163–169.
89. Cascio, P., Call, M., Petre, B.M., Walz, T., Goldberg, A.L. (2002) Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *EMBO J.*, **21**, 2636–2645.
90. Tanahashi, N., Yokota, K., Ahn, J. Y., Chung, C. H., Fujiwara, T., Takahashi, E., DeMartino, G. N., Slaughter, C. A., Toyonaga, T., Yamamura, K., Shimbara, N., Tanaka, K. (1997) Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and gamma-interferon regulation. *Genes Cells*, **2**, 195–211.
91. Ossendorp, F., Fu, N., Camps, M., Granucci, F., Gobin, S.J.P., van den Elsen, P.J., Schuurhuis, D., Adema, G.J., Lipford, G.B., Chiba, T., Sijts, A., Kloetzel, P.-M., Ricciardi-Castagnoli, P., Melief, C.J.M. (2005) Differential expression regulation of the alpha and beta subunits of the PA28 proteasome activator in mature dendritic cells. *J. Immunol.*, **174**, 7815–7822.
92. Li, J., Powell, S.R., Wang, X. (2011) Enhancement of proteasome function by PA28 $\alpha$  overexpression protects against oxidative stress. *FASEB J.*, **25**, 883–893.
93. Raule, M., Cerruti, F., Benaroudj, N., Migotti, R., Kikuchi, J., Bachi, A., Navon, A., Dittmar, G., Cascio, P. (2014) PA28 $\alpha\beta$  Reduces Size and Increases Hydrophilicity of 20S Immunoproteasome Peptide Products. *Chem. Biol.*, **21**, 470–480.
94. Li, X., Amazit, L., Long, W., Lonard, D.M., Monaco, J.J., O'Malley, B.W. (2007) Ubiquitin- and ATP-Independent Proteolytic Turnover of p21 by the REG Gamma-Proteasome Pathway. *Mol. Cell*, **26**, 831–842.
95. Pickering, A.M., Davies, K.J.A. (2012) Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28 $\alpha\beta$ , Pa28 $\gamma$  and Pa200 in the degradation

- of oxidized proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **523**, 181–190.
96. Pickering, A.M., Koop, A.L., Teoh, C.Y., Ermak, G., Grune, T., Davies, K.J.A. (2010) The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$  proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem. J.*, **432**, 585–595.
  97. Masson, P., Andersson, O., Petersen, U. M., Young, P. (2001) Identification and characterization of a Drosophila nuclear proteasome regulator. A homolog of human 11 S REGgamma (PA28gamma). *J. Biol. Chem.*, **276**, 1383–1390.
  98. Li, X., Lonard, D.M., Jung, S.Y., Malovannaya, A., Feng, Q., Qin, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J., O'Malley, B.W. (2006) The SRC-3/AIB1 Coactivator Is Degraded in a Ubiquitin- and ATP-Independent Manner by the REG $\gamma$  Proteasome. *Cell*, **124**, 381–392.
  99. Moriishi, K., Okabayashi, T., Nakai, K., Moriya, K., Koike, K., Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., Matsuura, Y. (2003) Proteasome activator PA28gamma-dependent nuclear retention and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, **77**, 10237–10249.
  100. Chen, X., Barton, L. F., Chi, Y., Clurman, B.E., Roberts, J.M. (2007) Ubiquitin-Independent Degradation of Cell-Cycle Inhibitors by the REG $\gamma$  Proteasome. *Mol. Cell*, **26**, 843–852.
  101. Murata, S., Kawahara, H., Tohma, S., Yamamoto, K., Kasahara, M., Nabeshima, Y., Tanaka, K., Chiba, T. (1999) Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma. *J. Biol. Chem.*, **274**, 38211–38215.
  102. Barton, L.F., Runnels, H.A., Schell, T.D., Cho, Y., Gibbons, R., Tevethia, S.S., Deepe, G.S., Monaco, J.J. (2004) Immune defects in 28-kDa proteasome activator gamma-deficient mice. *J. Immunol.*, **172**, 3948–3954.
  103. Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt, G., Rechsteiner, M. (2002) PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J.*, **21**, 3516–3525.
  104. Doherty, K., Pramanik, A., Pride, L., Lukose, J., Wood Moore, C. (2004) Expression of the expanded YFL007w ORF and assignment of the gene name BLM10. *Yeast*, **21**, 1021–1023.
  105. Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., Koonin, E.V., Deshaies, R.J. (2002) Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome. *Science*, **298**, 611–615.
  106. Blickwedehl, J., McEvoy, S., Wong, I., Kousis, P., Clements, J., Elliott, R., Cresswell, P., Liang, P., Bangia, N. (2007) Proteasomes and Proteasome Activator 200 kDa (PA200) Accumulate on Chromatin in Response to Ionizing Radiation. *Radiat. Res.*, **167**, 663–674.
  107. Sadre-Bazzaz, K., Whitby, F.G., Robinson, H., Formosa, T., Hill, C.P. (2010) Structure of a Blm10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate opening. *Mol. Cell*, **37**, 728–735.
  108. Khor, B., Bredemeyer, A.L., Huang, C.-Y., Turnbull, I.R., Evans, R., Maggi, L.B., White, J.M., Walker, L.M., Carnes, K., Hess, R.A., Sleckman, B.P. (2006) Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 2999–3007.
  109. Blickwedehl, J., Agarwal, M., Seong, C., Pandita, R. K., Melendy, T., Sung, P., Pandita, T. K., Bangia, N. (2008) Role for proteasome activator PA200 and postglutamyl proteasome activity in genomic stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 16165–16170.
  110. Qian, M.-X., Pang, Y., Liu, C. H., Haratake, K., Du, B.-Y., Ji, D.-Y., Wang, G.-F., Zhu, Q.-Q., Song, W., Yu, Y., Zhang, X.-X., Huang, H.-T., Miao, S., Chen, L.-B., Zhang, Z.-H., Liang, Y.-N., Liu, S., Cha, H., Yang, D., Zhai, Y., Komatsu, T., Tsuruta, F., Li, H., Cao, C., Li, W., Li, G.-H., Cheng, Y., Chiba, T., Wang, L., Goldberg, A. L., Shen, Y., Qiu, X.-B. (2013) Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell*, **153**, 1012–1024.
  111. Huang, L., Haratake, K., Miyahara, H., Chiba, T. (2016) Proteasome activators, PA28 $\gamma$  and PA200, play indispensable roles in male fertility. *Sci. Rep.*, **6**, 23171.

112. Tar, K., Dange, T., Yang, C., Yao, Y., Bulteau, A.-L., Salcedo, E. F., Braigen, S., Bouillaud, F., Finley, D., Schmidt, M. (2014) Proteasomes Associated with the Blm10 Activator Protein Antagonize Mitochondrial Fission through Degradation of the Fission Protein Dnm1. *J. Biol. Chem.*, **289**, 12145–12156.
113. Lopez, A.D., Tar, K., Krügel, U., Dange, T., Ros, I.G., Schmidt, M. (2011) Proteasomal degradation of Sfp1 contributes to the repression of ribosome biogenesis during starvation and is mediated by the proteasome activator Blm10. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 528–540.
114. Zaiss, D. M., Standera, S., Holzhütter, H., Kloetzel, P., Sijts, A. J. (1999) The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes. *FEBS Lett.*, **457**, 333–338.
115. Zaiss, D.M.W., Standera, S., Kloetzel, P.-M., Sijts, A.J.A.M. (2002) PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 14344–14349.
116. De La Mota-Peynado, A., Lee, S.Y.-C., Pierce, B.M., Wani, P., Singh, C.R., Roelofs, J. (2013) The proteasome-associated protein Ecm29 inhibits proteasomal ATPase activity and in vivo protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.*, **288**, 29467–29481.
117. Lehmann, A., Niewianda, A., Jechow, K., Janek, K., Enenkel, C. (2010) Ecm29 Fulfills Quality Control Functions in Proteasome Assembly. *Mol. Cell*, **38**, 879–888.
118. Park, S., Kim, W., Tian, G., Gygi, S. P., Finley, D. (2011) Structural Defects in the Regulatory Particle-Core Particle Interface of the Proteasome Induce a Novel Proteasome Stress Response. *J. Biol. Chem.*, **286**, 36652–36666.
119. Marshall, R.S., Li, F., Gemperline, D.C., Book, A.J., Vierstra, R.D. (2015) Autophagic Degradation of the 26S Proteasome Is Mediated by the Dual ATG8/Ubiquitin Receptor RPN10 in Arabidopsis. *Mol. Cell*, **58**, 1053–1066.
120. Marshall, R.S., McLoughlin, F., Vierstra, R.D. (2016) Autophagic Turnover of Inactive 26S Proteasomes in Yeast Is Directed by the Ubiquitin Receptor Cue5 and the Hsp42 Chaperone. *Cell Rep.*, **16**, 1717–1732.
121. Waite, K.A., Mota-Peynado, A.D.-L., Vontz, G., Roelofs, J. (2016) Starvation Induces Proteasome Autophagy with Different Pathways for Core and Regulatory Particles. *J. Biol. Chem.*, **291**, 3239–3253.
122. Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K.S., Lehotzky, R.E., Matouschek, A. (2004) An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 830–837.
123. Schulman, B.A., Wade Harper, J. (2009) Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 319–331.
124. Pierce, N.W., Kleiger, G., Shan, S., Deshaies, R.J. (2009) Detection of sequential polyubiquitylation on a millisecond timescale. *Nature*, **462**, 615–619.
125. Ciechanover, A., Stanhill, A. (2014) The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 86–96.
126. Herhaus, L., Dikic, I. (2015) Expanding the ubiquitin code through post-translational modification. *EMBO Rep.*, **16**, 1071–1083.
127. Komander, D., Clague, M.J., Urbé, S. (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 550–563.
128. Deshaies, R.J., Joazeiro, C.A.P. (2009) RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 399–434.
129. Rape, M., Reddy, S.K., Kirschner, M.W. (2006) The Processivity of Multi-ubiquitination by the APC Determines the Order of Substrate Degradation. *Cell*, **124**, 89–103.
130. Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., Harper, J.W., Gygi, S.P. (2011) Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome. *Mol. Cell*, **44**, 325–340.

131. Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., Tanaka, K. (2009) Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J.*, **28**, 359–371.
132. Shabek, N., Herman-Bachinsky, Y., Buchsbaum, S., Lewinson, O., Haj-Yahya, M., Hejjaoui, M., Lashuel, H. A., Sommer, T., Brik, A., Ciechanover, A. (2012) The size of the proteasomal substrate determines whether its degradation will be mediated by mono- or polyubiquitylation. *Mol. Cell*, **48**, 87–97.
133. Nathan, J.A., Kim, H.T., Ting, L., Gygi, S.P., Goldberg, A.L. (2013) Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes? *EMBO J.*, **32**, 552–565.
134. Ordureau, A., Münch, C., Harper, J.W. (2015) Quantifying Ubiquitin Signaling. *Mol. Cell*, **58**, 660–676.
135. Kaiser, S.E., Riley, B.E., Shaler, T.A., Trevino, R.S., Becker, C.H., Schulman, H., Kopito, R.R. (2011) Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools. *Nat. Methods*, **8**, 691–696.
136. Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., Peng, J. (2009) Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. *Cell*, **137**, 133–145.
137. Lu, Y., Lee, B.-h., King, R.W., Finley, D., Kirschner, M.W. (2015) Substrate degradation by the proteasome: A single-molecule kinetic analysis. *Science*, **348**, 6231, 1250834.
138. Lu, Y., Wang, W., Kirschner, M.W. (2015) Specificity of the anaphase-promoting complex: A single-molecule study. *Science*, **348**, 6231, 1248737.
139. Kirkpatrick, D.S., Hathaway, N.A., Hanna, J., Elsassner, S., Rush, J., Finley, D., King, R.W., Gygi, S.P. (2006) Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology. *Nat. Cell Biol.*, **8**, 700–710.
140. Martinez-Fonts, K., Matouschek, A. (2016) A Rapid and Versatile Method for Generating Proteins with Defined Ubiquitin Chains. *Biochemistry*, **55**, 1898–1908.
141. Flick, K., Ouni, I., Wohlschlegel, J.A., Capati, C., McDonald, W.H., Yates, J.R., Kaiser, P. (2004) Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nat. Cell Biol.*, **6**, 634–641.
142. Fishbain, S., Inobe, T., Israeli, E., Chavali, S., Yu, H., Kago, G., Babu, M.M., Matouschek, A. (2015) Sequence composition of disordered regions fine-tunes protein half-life. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 214–221.
143. Meyer, H.-J., Rape, M. (2014) Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell*, **157**, 910–921.
144. Grice, G.L., Lobb, I.T., Weekes, M.P., Gygi, S.P., Antrobus, R., Nathan, J.A. (2015) The Proteasome Distinguishes between Heterotypic and Homotypic Lysine-11-Linked Polyubiquitin Chains. *Cell Rep.*, **12**, 545–553.
145. Boname, J.M., Thomas, M., Stagg, H.R., Xu, P., Peng, J., Lehner, P.J. (2010) Efficient Internalization of MHC I Requires Lysine-11 and Lysine-63 Mixed Linkage Polyubiquitin Chains. *Traffic*, **11**, 210–220.
146. Dammer, E.B., Na, C.H., Xu, P., Seyfried, N.T., Duong, D.M., Cheng, D., Gearing, M., Rees, H., Lah, J.J., Levey, A.I., Rush, J., Peng, J. (2011) Polyubiquitin Linkage Profiles in Three Models of Proteolytic Stress Suggest the Etiology of Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.*, **286**, 10457–10465.
147. Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., Tanaka, K. (2016) The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- $\kappa$ B Signaling. *Mol. Cell*, **64**, 251–266.
148. Yau, R.G., Doerner, K., Castellanos, E.R., Haakonsen, D.L., Werner, A., Wang, N., Yang, X.W., Martinez-Martin, N., Matsumoto, M.L., Dixit, V.M., Rape, M. (2017) Assembly and Function of Heterotypic Ubiquitin Chains in Cell-Cycle and Protein Quality Control. *Cell*, **171**, 4, 1–16.
149. Saeki, Y., Isono, E., Toh-E, A. (2005) Preparation of Ubiquitinated Substrates by the PY Motif-Insertion Method

- for Monitoring 26S Proteasome Activity. *Methods in enzymology*, **399**, 215–227.
150. Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C.M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.*, **19**, 94–102.
151. Stieglitz, B., Rana, R.R., Koliopoulos, M.G., Morris-Davies, A.C., Schaeffer, V., Christodoulou, E., Howell, S., Brown, N.R., Dikic, I., Rittinger, K. (2013) Structural basis for ligase-specific conjugation of linear ubiquitin chains by HOIP. *Nature*, **503**, 422–426.
152. Ikeda, F., Deribe, Y.L., Skånland, S.S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S.J.L., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., Tokunaga, F., Androulidaki, A., Nakagawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J.P., Schaefer, L., Rittinger, K., Macek, B., Dikic, I. (2011) SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- $\kappa$ B activity and apoptosis. *Nature*, **471**, 637–641.
153. Gerlach, B., Cordier, S.M., Schmukle, A.C., Emmerich, C.H., Rieser, E., Haas, T.L., Webb, A.I., Rickard, J.A., Anderton, H., Wong, W.W.-L., Nachbur, U., Gangoda, L., Warnken, U., Purcell, A.W., Silke, J., Walczak, H. (2011) Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature*, **471**, 591–596.
154. Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., Iwai, K. (2011) SHARPIN is a component of the NF- $\kappa$ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature*, **471**, 633–636.
155. Rivkin, E., Almeida, S.M., Ceccarelli, D.F., Juang, Y.-C., MacLean, T.A., Srikumar, T., Huang, H., Dunham, W.H., Fukumura, R., Xie, G., Gondo, Y., Raught, B., Gingras, A.-C., Sicheri, F., Cordes, S.P. (2013) The linear ubiquitin-specific deubiquitinase gumbby regulates angiogenesis. *Nature*, **498**, 318–324.
156. Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., Iwai, K. (2006) A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J.*, **25**, 4877–4887.
157. Zhao, S., Ulrich, H.D. (2010) Distinct consequences of posttranslational modification by linear versus K63-linked polyubiquitin chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 7704–7709.
158. Inn, K.-S., Gack, M.U., Tokunaga, F., Shi, M., Wong, L.-Y., Iwai, K., Jung, J.U. (2011) Linear Ubiquitin Assembly Complex Negatively Regulates RIG-I- and TRIM25-Mediated Type I Interferon Induction. *Mol. Cell*, **41**, 354–365.
159. Kliza, K., Taumer, C., Pinzuti, I., Franz-Wachtel, M., Kunzelmann, S., Stieglitz, B., Macek, B., Husnjak, K. (2017) Internally tagged ubiquitin: a tool to identify linear polyubiquitin-modified proteins by mass spectrometry. *Nat. Methods*, **14**, 504–512.
160. Kravtsova-Ivantsiv, Y., Cohen, S., Ciechanover, A. (2009) Modification by single ubiquitin moieties rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal processing of the p105 NF- $\kappa$ B precursor. *Mol. Cell*, **33**, 496–504.
161. Braten, O., Livneh, I., Ziv, T., Admon, A., Kehat, I., Caspi, L.H., Gonen, H., Bercovich, B., Godzik, A., Jahandideh, S., Jaroszewski, L., Sommer, T., Kwon, Y.T., Guharoy, M., Tompa, P., Ciechanover, A. (2016) Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **113**, 4639–4647.
162. Oshikawa, K., Matsumoto, M., Oyama, K., Nakayama, K. I. (2012) Proteome-wide Identification of Ubiquitylation Sites by Conjugation of Engineered Lysine-less Ubiquitin. *J. Proteome Res.*, **11**, 796–807.
163. Swatek, K.N., Komander, D. (2016) Ubiquitin modifications. *Nat. Publ. Gr.*, **26**, 399–422.
164. Lee, B.-H., Lee, M.J., Park, S., Oh, D.-C., Elsasser, S., Chen, P.-C., Gartner, C., Dimova, N., Hanna, J., Gygi, S.P., Wilson, S.M., King, R.W., Finley, D. (2010) Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*, **467**, 179–184.
165. D'Arcy, P., Brnjic, S., Olofsson, M.H., Fryknäs, M., Lindsten, K., De Cesare, M., Perego, P., Sadeghi, B., Hassan,

- M., Larsson, R., Linder, S. (2011) Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nat. Med.*, **17**, 1636–1640.
166. Kisselev, A.F., van der Linden, W.A., Overkleeft, H.S. (2012) Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem. Biol.*, **19**, 99–115.
167. McCullough, J., Clague, M.J., Urbé, S. (2004) AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J. Cell Biol.*, **166**, 487–492.
168. Ambroggio, X.I., Rees, D.C., Deshaies, R.J. (2004) JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol.*, **2**, 113–119.
169. Cope, G.A., Suh, G.S.B., Aravind, L., Schwarz, S.E., Zipursky, S.L., Koonin, E.V., Deshaies, R.J. (2002) Role of Predicted Metalloprotease Motif of Jab1/Csn5 in Cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*, **298**, 608–611.
170. Shrestha, R.K., Ronau, J.A., Davies, C.W., Guenette, R.G., Strieter, E.R., Paul, L.N., Das, C. (2014) Insights into the Mechanism of Deubiquitination by JAMM Deubiquitinases from Co-crystal Structures of the Enzyme with the Substrate and Product. *Biochemistry*, **53**, 3199–3217.
171. Rinaldi, T., Pick, E., Gambadoro, A., Zilli, S., Maytal-Kivity, V., Frontali, L., Glickman, M.H. (2004) Participation of the proteasomal lid subunit Rpn11 in mitochondrial morphology and function is mapped to a distinct C-terminal domain. *Biochem. J.*, **381**, 275–285.
172. Worden, E.J., Padovani, C., Martin, A. (2014) Structure of the Rpn11-Rpn8 dimer reveals mechanisms of substrate deubiquitination during proteasomal degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 220–227.
173. Lee, B.-H., Lu, Y., Prado, M.A., Shi, Y., Tian, G., Sun, S., Elsasser, S., Gygi, S.P., King, R.W., Finley, D. (2016) USP14 deubiquitinates proteasome-bound substrates that are ubiquitinated at multiple sites. *Nature*, **532**, 398–401.
174. Worden, E.J., Padovani, C., Martin, A. (2014) Structure of the Rpn11–Rpn8 dimer reveals mechanisms of substrate deubiquitination during proteasomal degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 220–227.
175. Pathare, G.R., Nagy, I., Sledz, P., Anderson, D.J., Zhou, H.-J., Pardon, E., Steyaert, J., Forster, F., Bracher, A., Baumeister, W. (2014) Crystal structure of the proteasomal deubiquitylation module Rpn8-Rpn11. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111**, 2984–2989.
176. Dambacher, C.M., Worden, E.J., Herzik, M.A., Martin, A., Lander, G.C. (2016) Atomic structure of the 26S proteasome lid reveals the mechanism of deubiquitinase inhibition. *Elife*, **5**, e13027.
177. Worden, E.J., Dong, K.C., Martin, A. (2017) An AAA Motor-Driven Mechanical Switch in Rpn11 Controls Deubiquitination at the 26S Proteasome. *Mol. Cell*, **67**, 799–811.
178. Finley, D. (2009) Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 477–513.
179. Borodovsky, A., Kessler, B.M., Casagrande, R., Overkleeft, H.S., Wilkinson, K.D., Ploegh, H.L. (2001) A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *EMBO J.*, **20**, 5187–5196.
180. Hanna, J., Hathaway, N.A., Tone, Y., Crosas, B., Elsasser, S., Kirkpatrick, D.S., Leggett, D.S., Gygi, S.P., King, R.W., Finley, D. (2006) Deubiquitinating Enzyme Ubp6 Functions Non-catalytically to Delay Proteasomal Degradation. *Cell*, **127**, 99–111.
181. Guterman, A., Glickman, M.H. (2004) Complementary Roles for Rpn11 and Ubp6 in Deubiquitination and Proteolysis by the Proteasome. *J. Biol. Chem.*, **279**, 1729–1738.
182. Leggett, D.S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R.T., Walz, T., Ploegh, H., Finley, D. (2002) Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol. Cell*, **10**, 495–507.
183. Kim, H.T., Goldberg, A.L. (2017) The deubiquitinating enzyme Usp14 allosterically inhibits multiple pro-

- teasomal activities and ubiquitin-independent proteolysis. *J. Biol. Chem.*, **292**, 9830–9839.
184. Bashore, C., Dambacher, C.M., Goodall, E.A., Matyskiela, M.E., Lander, G.C., Martin, A. (2015) Ubp6 deubiquitinase controls conformational dynamics and substrate degradation of the 26S proteasome. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 712–719.
185. Aufderheide, A., Beck, F., Stengel, F., Hartwig, M., Schweitzer, A., Pfeifer, G., Goldberg, A.L., Sakata, E., Baumeister, W., Förster, F. (2015) Structural characterization of the interaction of Ubp6 with the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**, 8626–8631.
186. Mansour, W., Nakasone, M.A., von Delbrück, M., Yu, Z., Krutauz, D., Reis, N., Kleifeld, O., Sommer, T., Fushman, D., Glickman, M.H. (2015) Disassembly of Lys<sup>11</sup> and Mixed Linkage Polyubiquitin Conjugates Provides Insights into Function of Proteasomal Deubiquitinases Rpn11 and Ubp6. *J. Biol. Chem.*, **290**, 4688–4704.
187. Burgie, S.E., Bingman, C.A., Soni, A.B., Phillips, G.N., Jr. (2012) Structural characterization of human Uch37. *Proteins*, **80**, 649–654.
188. VanderLinden, R.T., Hemmis, C.W., Schmitt, B., Ndoja, A., Whitby, F.G., Robison, H., Cohen, R.E., Yao, T., Hill, C.P. (2015) Structural Basis for the Activation and Inhibition of the UCH37 Deubiquitylase. *Mol. Cell*, **57**, 901–911.
189. Sahtoe, D.D., van Dijk, W.J., El Oualid, F., Ekkebus, R., Ovaas, H., Sixma, T.K. (2015) Mechanism of UCH-L5 Activation and Inhibition by DEUBAD Domains in RPN13 and INO80G. *Mol. Cell*, **57**, 887–900.
190. Chen, X., Lee, B.-H., Finley, D., Walters, K.J. (2010) Structure of proteasome ubiquitin receptor hRpn13 and its activation by the scaffolding protein hRpn2. *Mol. Cell*, **38**, 404–415.
191. Lam, Y.A., Xu, W., DeMartino, G.N., Cohen, R.E. (1997) Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature*, **385**, 737–740.
192. Zhang, N.-Y., Jacobson, A.D., MacFadden, A., Liu, C.-W. (2011) Ubiquitin Chain Trimming Recycles the Substrate Binding Sites of the 26 S Proteasome and Promotes Degradation of Lysine 48-linked Polyubiquitin Conjugates. *J. Biol. Chem.*, **286**, 25540–25546.
193. Chen, S., Wu, J., Lu, Y., Ma, Y.-B., Lee, B.-H., Yu, Z., Ouyang, Q., Finley, D.J., Kirschner, M.W., Mao, Y. (2016) Structural basis for dynamic regulation of the human 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **113**, 12991–12996.
194. Peth, A., Kukushkin, N., Bossé, M., Goldberg, A.L. (2013) Ubiquitinated Proteins Activate the Proteasomal ATPases by Binding to Usp14 or Uch37 Homologs. *J. Biol. Chem.*, **288**, 7781–7790.
195. Swaminathan, S., Amerik, A.Y., Hochstrasser, M. (1999) The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 2583–2594.
196. Varshavsky, A. (2012) The Ubiquitin System, an Immense Realm. *Annu. Rev. Biochem.*, **81**, 167–176.
197. Crosas, B., Hanna, J., Kirkpatrick, D.S., Zhang, D.P., Tone, Y., Hathaway, N.A., Buecker, C., Leggett, D.S., Schmidt, M., King, R.W., Gygi, S.P.P., Finley, D. (2006) Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities. *Cell*, **127**, 1401–1413.
198. Tian, L., Holmgren, R.A., Matouschek, A. (2005) A conserved processing mechanism regulates the activity of transcription factors Cubitus interruptus and NF- $\kappa$ B. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 1045–1053.
199. Aviram, S., Kornitzer, D. (2010) The ubiquitin ligase Hul5 promotes proteasomal processivity. *Mol. Cell Biol.*, **30**, 985–994.
200. Cappadocia, L., Lima, C.D. (2018) Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chem. Rev.*, **118**, 889–918.
201. Jentsch, S., Pyrowolakis, G. (2000) Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol.*, **10**, 335–342.

202. Lüders, J., Pyrowolakis, G., Jentsch, S. (2003) The ubiquitin-like protein HUB1 forms SDS-resistant complexes with cellular proteins in the absence of ATP. *EMBO Rep.*, **4**, 1169–1174.
203. Novatchkova, M., Bachmair, A., Eisenhaber, B., Eisenhaber, F. (2005) Proteins with two SUMO-like domains in chromatin-associated complexes: the RENi (Rad60-Esc2-NIP45) family. *BMC Bioinformatics*, **6**, 22.
204. Eifler, K., Vertegaal, A.C.O. (2015) SUMOylation-Mediated Regulation of Cell Cycle Progression and Cancer. *Trends Biochem. Sci.*, **40**, 779–793.
205. Flotho, A., Melchior, F. (2013) Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease. *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 357–385.
206. Schmidtke, G., Aichele, A., Groettrup, M. (2014) FAT10ylation as a signal for proteasomal degradation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 97–102.
207. Aichele, A., Pelzer, C., Lukasiak, S., Kalveram, B., Sheppard, P.W., Rani, N., Schmidtke, G., Groettrup, M. (2010) USE1 is a bispecific conjugating enzyme for ubiquitin and FAT10, which FAT10ylates itself in cis. *Nat. Commun.*, **1**, 1–10.
208. Pelzer, C., Groettrup, M. (2010) FAT10: Activated by UBA6 and Functioning in Protein Degradation. *Subcell Biochem.*, **54**, 238–246.
209. Cnaan, A., DeFuria, J., Perelman, E., Schultz, V., Seay, M., Tuck, D., Flavell, R.A., Snyder, M.P., Obin, M.S., Weissman, S.M. (2014) Extended lifespan and reduced adiposity in mice lacking the FAT10 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111**, 5313–5318.
210. Cnaan, A., Yu, X., Booth, C.J., Lian, J., Lazar, I., Gamfi, S.L., Castille, K., Kohya, N., Nakayama, Y., Liu, Y.-C., Eynon, E., Flavell, R., Weissman, S.M. (2006) FAT10/Diubiquitin-Like Protein-Deficient Mice Exhibit Minimal Phenotypic Differences. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 5180–5189.
211. Buchsbaum, S., Bercovich, B., Ciechanover, A. (2012) FAT10 is a proteasomal degradation signal that is itself regulated by ubiquitination. *Mol. Biol. Cell*, **23**, 225–232.
212. Fu, H., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D., Vierstra, R.D. (1998) Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1970–1981.
213. Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L., Pickart, C.M. (2002) A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature*, **416**, 763–767.
214. Paraskevopoulos, K., Kriegenburg, F., Tatham, M.H., Rösner, H.I., Medina, B., Larsen, I.B., Brandstrup, R., Hardwick, K.G., Hay, R.T., Krage-lund, B.B., Hartmann-Petersen, R., Gordon, C. (2014) Dss1 Is a 26S Proteasome Ubiquitin Receptor. *Mol. Cell*, **56**, 453–461.
215. Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., Rechsteiner, M. (1994) A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7059–7061.
216. Hamazaki, J., Hirayama, S., Murata, S. (2015) Redundant Roles of Rpn10 and Rpn13 in Recognition of Ubiquitinated Proteins and Cellular Homeostasis. *PLoS Genet.* **11**, e1005401.
217. Matiuhin, Y., Kirkpatrick, D. S., Ziv, I., Kim, W., Dakshinamurthy, A., Kleifeld, O., Gygi, S.P., Reis, N., Glickman, M.H. (2008) Extra-proteasomal Rpn10 restricts access of the polyubiquitin-binding protein Dsk2 to proteasome. *Mol. Cell*, **32**, 415–25.
218. Keren-Kaplan, T., Zeev Peters, L., Levin-Kravets, O., Attali, I., Kleifeld, O., Shohat, N., Artzi, S., Zucker, O., Pilzer, I., Reis, N., Glickman, M.H., Ben-Aroya, S., Prag, G. (2016) Structure of ubiquitylated-Rpn10 provides insight into its autoregulation mechanism. *Nat. Commun.*, **7**, 12960.
219. Kang, Y., Vossler, R.A., Diaz-Martinez, L.A., Winter, N.S., Clarke, D.J., Walters, K.J. (2006) UBL/UBA Ubiquitin Receptor Proteins Bind a Common Tetraubiquitin Chain. *J. Mol. Biol.*, **356**, 1027–1035.
220. Woelk, T., Oldrini, B., Maspero, E., Confalonieri, S., Cavallaro, E., Di Fiore, P.P., Polo, S. (2006) Mole-

- cular mechanisms of coupled monoubiquitination. *Nat. Cell Biol.*, **8**, 1246–1254.
221. Verma, R., Oania, R., Graumann, J., Deshaies, R.J. (2004) Multiubiquitin Chain Receptors Define a Layer of Substrate Selectivity in the Ubiquitin-Proteasome System. *Cell*, **118**, 99–110.
222. Wang, Q., Young, P., Walters, K.J. (2005) Structure of S5a Bound to Monoubiquitin Provides a Model for Polyubiquitin Recognition. *J. Mol. Biol.*, **348**, 727–739.
223. van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D., Vierstra, R.D. (1996) The multiubiquitin-chain-binding protein Mcb1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a non-essential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 6020–6028.
224. Hamazaki, J., Sasaki, K., Kawahara, H., Hisanaga, S.-I., Tanaka, K., Murata, S. (2007) Rpn10-mediated degradation of ubiquitinated proteins is essential for mouse development. *Mol. Cell Biol.* **27**, 6629–6638.
225. Al-Shami, A., Jhaver, K.G., Vogel, P., Wilkins, C., Humphries, J., Davis, J.J., Xu, N., Potter, D.G., Gerhardt, B., Mullinax, R., Shirley, C.R., Anderson, S.J., Oravec, T. (2010) Regulators of the Proteasome Pathway, Uch37 and Rpn13, Play Distinct Roles in Mouse Development. *PLoS One*, **5**, e13654.
226. Simins, A.B., Weighardt, H., Weidner, K.M., Weidle, U.H., Holzmann, B. (1999) Functional cloning of ARM-1, an adhesion-regulating molecule upregulated in metastatic tumor cells. *Clin. Exp. Metastasis*, **17**, 641–648.
227. Hamazaki, J., Iemura, S., Natsume, T., Yashiroda, H., Tanaka, K., Murata, S. (2006) A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes. *EMBO J.*, **25**, 4524–4536.
228. Yao, T., Song, L., Xu, W., DeMartino, G.N., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Cohen, R.E. (2006) Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Ardm1. *Nat. Cell Biol.* **8**, 994–1002.
229. Mazumdar, T., Gorgun, F.M., Sha, Y., Tyryshkin, A., Zeng, S., Hartmann-Petersen, R., Jørgensen, J.P., Hendil, K.B., Eissa, N.T. (2010) Regulation of NF-kappaB activity and inducible nitric oxide synthase by regulatory particle non-ATPase subunit 13 (Rpn13). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 13854–13859.
230. Huang, Y., Ratovitski, E.A. (2010) Phospho- $\Delta$ Np63 $\alpha$ /Rpn13-dependent regulation of LKB1 degradation modulates autophagy in cancer cells. *Aging (Albany, NY)*, **2**, 959–968.
231. Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J.Y., Ko, H.J., Barrett, T., Kim, J.K., Davis, R.J. (2008) A Stress Signaling Pathway in Adipose Tissue Regulates Hepatic Insulin Resistance. *Science*, **322**, 1539–1543.
232. Aguilera, M.A., Korac, J., Durcan, T.M., Trempe, J.-F., Haber, M., Gehring, K., Elsasser, S., Waidmann, O., Fon, E.A., Husnjak, K. (2015) The E3 Ubiquitin Ligase Parkin Is Recruited to the 26 S Proteasome via the Proteasomal Ubiquitin Receptor Rpn13. *J. Biol. Chem.*, **290**, 7492–7505.
233. Miao, X., Miao, X., Wen, Y., Hu, J., Dai, W., Yin, B. (2012) A possible connection between adhesion regulating molecule 1 overexpression and nuclear factor kappa B activity in hepatocarcinogenesis. *Oncol. Rep.*, **28**, 283–290.
234. Song, Y., Ray, A., Li, S., Das, D.S., Tai, Y.T., Carrasco, R.D., Chauhan, D., Anderson, K.C. (2016) Targeting proteasome ubiquitin receptor Rpn13 in multiple myeloma. *Leukemia*, **30**, 1877–1886.
235. Fejzo, M., Anderson, L., von Euw, E., Kalous, O., Avliyakov, N., Haykinson, M., Konecny, G., Finn, R., Slamon, D. (2013) Amplification Target ADRM1: Role as an Oncogene and Therapeutic Target for Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 3094–3109.
236. Carvalho, B., Postma, C., Mongera, S., Hopmans, E., Diskin, S., van de Wiel, M.A., van Criekinge, W., Thas, O., Matthai, A., Cuesta, M.A., Droste, J.S.T.S., Craanen, M., Schrock, E., Ylstra, B., Meijer, G.A. (2009) Multiple putative oncogenes at the chromosome 20q amplicon contribute

- to colorectal adenoma to carcinoma progression. *Gut*, **58**, 79–89.
237. Jang, S.H., Park, J.W., Kim, H.R., Seong, J.K., Kim, H.K. (2014) ADRM1 gene amplification is a candidate driver for metastatic gastric cancers. *Clin. Exp. Metastasis*, **31**, 727–733.
238. Anchoori, R.K., Karanam, B., Peng, S., Wang, J.W., Jiang, R., Tanno, T., Orłowski, R.Z., Matsui, W., Zhao, M., Rudek, M.A., Hung, C., Chen, X., Walters, K.J., Roden, R.B.S. (2013) A bis-Benzylidene Piperidone Targeting Proteasome Ubiquitin Receptor RPN13/ADRM1 as a Therapy for Cancer. *Cancer Cell*, **24**, 791–805.
239. Trader, D. J., Simanski, S., Kodadek, T. (2015) A Reversible and Highly Selective Inhibitor of the Proteasomal Ubiquitin Receptor Rpn13 Is Toxic to Multiple Myeloma Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 6312–6319.
240. Khan, M.L., Stewart, A.K. (2011) Carfilzomib: a novel second-generation proteasome inhibitor. *Futur. Oncol.*, **7**, 607–612.
241. Chen, X., Randles, L., Shi, K., Tarasov, S.G., Aihara, H., Walters, K.J. (2016) Structures of Rpn1 T1:Rad23 and hRpn13:hPLIC2 Reveal Distinct Binding Mechanisms between Substrate Receptors and Shuttle Factors of the Proteasome. *Structure*, **24**, 1257–1270.
242. Saeki, Y., Sone, T., Toh-e, A., Yokosawa, H. (2002) Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 813–819.
243. Gomez, T.A., Kolawa, N., Gee, M., Sweredoski, M.J., Deshaies, R.J. (2011) Identification of a functional docking site in the Rpn1 LRR domain for the UBA-UBL domain protein Ddi1. *BMC Biol.*, **9**, 33.
244. Haapasalo, A., Viswanathan, J., Kurkinen, K. M., Bertram, L., Soininen, H., Dantuma, N.P., Tanzi, R.E., Hiltunen, M. (2011) Involvement of ubiquitin-1 transcript variants in protein degradation and accumulation. *Commun. Integr. Biol.*, **4**, 428–432.
245. Raasi, S., Varadan, R., Fushman, D., Pickart, C.M. (2005) Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 708–714.
246. Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoege, C., Jentsch, S. (2005) A Series of Ubiquitin Binding Factors Connects CDC48/p97 to Substrate Multiubiquitylation and Proteasomal Targeting. *Cell*, **120**, 73–84.
247. Kim, I., Ahn, J., Liu, C., Tanabe, K., Apodaca, J., Suzuki, T., Rao, H. (2006) The Png1-Rad23 complex regulates glycoprotein turnover. *J. Cell Biol.*, **172**, 211–219.
248. Heessen, S., Masucci, M.G., Dantuma, N.P. (2005) The UBA2 Domain Functions as an Intrinsic Stabilization Signal that Protects Rad23 from Proteasomal Degradation. *Mol. Cell*, **18**, 225–235.
249. Heinen, C., Ács, K., Hoogstraten, D., Dantuma, N.P. (2011) C-terminal UBA domains protect ubiquitin receptors by preventing initiation of protein degradation. *Nat. Commun.* **2**, 191.
250. Vadlamudi, R.K., Joung, I., Strominger, J.L., Shin, J. (1996) p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, **271**, 20235–20237.
251. Seibenhener, M.L., Babu, J.R., Geetha, T., Wong, H.C., Krishna, N.R., Wooten, M.W. (2004) Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 8055–8068.
252. Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., Johansen, T. (2007) p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J. Biol. Chem.*, **282**, 24131–24145.
253. Johnson, J.O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Gibbs, J.R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., Ding, J., McCluskey, L., Martinez-Lage, M., Falcone, D., Hernandez, D.G., Arepalli, S., Chong, S., Schymick, J.C., Rothstein, J., Landi, F., Wang, Y.-D., Calvo, A., Mora, G., Sabatelli, M., Monsurro, M.R., Battistini, S., Salvi,

- F., Spataro, R., Sola, P., Borghero, G., Galassi, G., Scholz, S.W., Taylor, J.P., Restagno, G., Chiò, A., Traynor, B.J., Traynor, B.J. (2010) Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS. *Neuron*, **68**, 857–864.
254. Madeo, F., Schlauer, J., Zischka, H., Mecke, D., Fröhlich, K. U. (1998) Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 131–141.
255. Anderson, D.J., Le Moigne, R., Djakovic, S., Kumar, B., Rice, J., Wong, S., Wang, J., Yao, B., Valle, E., Kiss von Soly, S., Madriaga, A., Soriano, F., Menon, M.-K., Wu, Z.Y., Kampmann, M., Chen, Y., Weissman, J.S., Aftab, B.T., Yakes, F.M., Shawver, L., Zhou, H.-J., Wustrow, D., Rolfe, M. (2015) Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis. *Cancer Cell*, **28**, 653–665.
256. Ye, Y. (2006) Diverse functions with a common regulator: Ubiquitin takes command of an AAAATPase. *J. Struct. Biol.*, **156**, 29–40.
257. Meyer, H., Bug, M., Bremer, S. (2012) Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat. Cell Biol.*, **14**, 117–123.
258. Beckwith, R., Estrin, E., Worden, E. J., Martin, A. (2013) Reconstitution of the 26S proteasome reveals functional asymmetries in its AAA+ unfoldase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1164–1172.
259. Inobe, T., Fishbain, S., Prakash, S., Matouschek, A. (2011) Defining the geometry of the two-component proteasome degnon. *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 161–167.
260. Babu, M.M., van der Lee, R., de Groot, N.S., Gsponer, J. (2011) Intrinsically disordered proteins: regulation and disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **21**, 432–440.
261. Gsponer, J., Futschik, M.E., Teichmann, S.A., Babu, M.M. (2008) Tight Regulation of Unstructured Proteins: From Transcript Synthesis to Protein Degradation. *Science*, **322**, 1365–1368.
262. Tompa, P., Prilusky, J., Silman, I., Sussman, J.L. (2008) Structural disorder serves as a weak signal for intracellular protein degradation. *Proteins Struct. Funct. Bioinformatics*, **71**, 903–909.
263. Yen, H.-C. S., Xu, Q., Chou, D. M., Zhao, Z., Elledge, S.J. (2008) Global Protein Stability Profiling in Mammalian Cells. *Science*, **322**, 918–923.
264. Yen, H.-C. S., Elledge, S.J. (2008) Identification of SCF Ubiquitin Ligase Substrates by Global Protein Stability Profiling. *Science*, **322**, 923–929.
265. Suskiewicz, M.J., Sussman, J.L., Silman, I., Shaul, Y. (2011) Context-dependent resistance to proteolysis of intrinsically disordered proteins. *Protein Sci.*, **20**, 1285–1297.
266. Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R.R., Mohan, A., Heyen, J.W., Goebel, M.G., Iakoucheva, L.M. (2010) Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins Struct. Funct. Bioinformatics*, **78**, 365–380.
267. Hagai, T., Azia, A., Tóth-Petróczy, Á., Levy, Y. (2011) Intrinsic disorder in ubiquitination substrates. *J. Mol. Biol.*, **412**, 319–324.
268. Hagai, T., Levy, Y. (2010) Ubiquitin not only serves as a tag but also assists degradation by inducing protein unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 2001–2006.
269. Prakash, S., Inobe, T., Hatch, A.J., Matouschek, A. (2009) Substrate selection by the proteasome during degradation of protein complexes. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 29–36.
270. Johnson, E.S., Gonda, D.K., Varshavsky, A. (1990) Cis-trans recognition and subunit-specific degradation of short-lived proteins. *Nature*, **346**, 287–291.
271. Hochstrasser, M., Varshavsky, A. (1990) In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast alpha 2 repressor. *Cell*, **61**, 697–708.
272. Verma, R., McDonald, H., Yates, J.R., Deshaies, R.J. (2001) Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk. *Mol. Cell*, **8**, 439–448.
273. Nasmyth, K., Shirayama, M., Tóth, A., Gálová, M. (1999) APC(Cdc20) pro-

- motes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature*, **402**, 203–207.
274. Hoyt, M.A., Zich, J., Takeuchi, J., Zhang, M., Govaerts, C., Coffino, P. (2006) Glycine–alanine repeats impair proper substrate unfolding by the proteasome. *EMBO J.*, **25**, 1720–1729.
275. Kravtsova-Ivantsiv, Y., Shomer, I., Cohen-Kaplan, V., Snijder, B., Superti-Furga, G., Gonen, H., Sommer, T., Ziv, T., Admon, A., Naroditsky, I., Jbara, M., Brik, A., Pikarsky, E., Kwon, Y.T., Doweck, I., Ciechanover, A. (2015) KPC1-Mediated Ubiquitination and Proteasomal Processing of NF- $\kappa$ B1 p105 to p50 Restricts Tumor Growth. *Cell*, **161**, 333–347.
276. Baugh, J.M., Viktorova, E.G., Piliipenko, E.V. (2009) Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J. Mol. Biol.*, **386**, 814–827.
277. Li, X., Coffino, P. (1993) Degradation of ornithine decarboxylase: exposure of the C-terminal target by a polyamine-inducible inhibitory protein. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 2377–2383.
278. Wu, D., Kaan, H.Y.K., Zheng, X., Tang, X., He, Y., Vanessa Tan, Q., Zhang, N., Song, H. (2015) Structural basis of Ornithine Decarboxylase inactivation and accelerated degradation by polyamine sensor Antizyme1. *Sci. Rep.*, **5**, 14738.
279. Bercovich, Z., Rosenberg-Hasson, Y., Ciechanover, A., Kahana, C. (1989) Degradation of ornithine decarboxylase in reticulocyte lysate is ATP-dependent but ubiquitin-independent. *J. Biol. Chem.*, **264**, 15949–15952.
280. Takeuchi, J., Chen, H., Coffino, P. (2007) Proteasome substrate degradation requires association plus extended peptide. *EMBO J.*, **26**, 123–131.
281. Bertolaet, B.L., Clarke, D.J., Wolff, M., Watson, M.H., Henze, M., Divita, G., Reed, S.I. (2001) UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 417–422.
282. Orłowski, M., Wilk, S. (2000) Catalytic Activities of the 20 S Proteasome, a Multicatalytic Proteinase Complex. *Arch. Biochem. Biophys.*, **383**, 1–16.
283. Erales, J., Coffino, P. (2014) Ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 216–221.
284. Pickering, A.M., Davies, K.J.A. (2012) Degradation of Damaged Proteins - The Main Function of the 20S Proteasome. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, **109**, 227–248.
285. van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R.J., Daughdrill, G.W., Dunker, A.K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D. T., Kim, P. M., Kriwacki, R. W., Oldfield, C.J., Pappu, R.V., Tompa, P., Uversky, V.N., Wright, P.E., Babu, M.M. (2014) Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chem. Rev.*, **114**, 6589–6631.
286. Aiken, C.T., Kaake, R.M., Wang, X., Huang, L. (2011) Oxidative Stress-Mediated Regulation of Proteasome Complexes. *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, R110.006924.
287. Alvarez-Castelao, B., Castaño, J.G. (2005) Mechanism of direct degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  by 20S proteasome. *FEBS Lett.*, **579**, 4797–4802.
288. Zhang, W., Wei, Q. (2011) Calcineurin stimulates the expression of inflammatory factors in RAW 264.7 cells by interacting with proteasome subunit alpha type 6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **407**, 668–673.
289. Yuksek, K., Chen, W.-l., Chien, D., Ou, J.-h. J. (2009) Ubiquitin-Independent Degradation of Hepatitis C Virus F Protein. *J. Virol.*, **83**, 612–621.
290. Stohwasser, R., Holzhütter, H.-G., Lehmann, U., Henklein, P., Kloetzel, P.-M. (2003) Hepatitis B Virus HBx Peptide 116–138 and Proteasome Activator PA28 Compete for Binding to the Proteasome  $\alpha$ 4/MC6 Subunit. *Biol. Chem.*, **384**, 39–49.
291. Dong, J., Chen, W., Welford, A., Wandinger-Ness, A. (2004) The Proteasome  $\alpha$ -Subunit XAPC7 Interacts Specifically with Rab7 and Late Endosomes. *J. Biol. Chem.*, **279**, 21334–21342.
292. Dächsel, J.C., Lücking, C.B., Deeg, S., Schultz, E., Lalowski, M., Casa-

- demunt, E., Corti, O., Hampe, C., Patenge, N., Vaupel, K., Yamamoto, A., Dichgans, M., Brice, A., Wanker, E.E., Kahle, P.J., Gasser, T. (2005) Parkin interacts with the proteasome subunit  $\alpha 4$ . *FEBS Lett.*, **579**, 3913–3919.
293. Yang, L., Tang, Z., Zhang, H., Kou, W., Lu, Z., Li, X., Li, Q., Miao, Z. (2013) PSMA7 Directly Interacts with NOD1 and Regulates its Function. *Cell. Physiol. Biochem.*, **31**, 952–959.
294. Touitou, R., Richardson, J., Bose, S., Nakanishi, M., Rivett, J., Allday, M.J. (2001) A degradation signal located in the C-terminus of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> is a binding site for the C8  $\alpha$ -subunit of the 20S proteasome. *EMBO J.*, **20**, 2367–2375.
295. Zhang, Z., Wang, H., Li, M., Agrawal, S., Chen, X., Zhang, R. (2004) MDM2 Is a Negative Regulator of p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, Independent of p53. *J. Biol. Chem.*, **279**, 16000–16006.
296. Yi, P., Feng, Q., Amazit, L., Lonard, D.M., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J., O'Malley, B.W. (2008) Atypical Protein Kinase C Regulates Dual Pathways for Degradation of the Oncogenic Coactivator SRC-3/AIB1. *Mol. Cell*, **29**, 465–476.
297. Sdek, P., Ying, H., Chang, D.L.F., Qiu, W., Zheng, H., Touitou, R., Allday, M.J., Jim Xiao, Z.-X. (2005) MDM2 Promotes Proteasome-Dependent Ubiquitin-Independent Degradation of Retinoblastoma Protein. *Mol. Cell*, **20**, 699–708.
298. Alvarez-Castelao, B., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Castaño, J.G. (2014) Mechanism of cleavage of alpha-synuclein by the 20S proteasome and modulation of its degradation by the RedOx state of the N-terminal methionines. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 352–365.
299. Yuan, F., Ma, Y., You, P., Lin, W., Lu, H., Yu, Y., Wang, X., Jiang, J., Yang, P., Ma, Q., Tao, T. (2013) A novel role of proteasomal  $\beta 1$  subunit in tumorigenesis. *Biosci. Rep.*, **33**, 555–565.
300. Gruendler, C., Lin, Y., Farley, J., Wang, T. (2001) Proteasomal degradation of Smad1 induced by bone morphogenetic proteins. *J. Biol. Chem.*, **276**, 46533–46543.
301. Jariel-Encontre, I., Bossis, G., Piechaczyk, M. (2008) Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim. Biophys. Acta*, **1786**, 153–177.
302. Adler, J., Reuven, N., Kahana, C., Shaul, Y. (2010) c-Fos Proteasomal Degradation Is Activated by a Default Mechanism, and Its Regulation by NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 Determines c-Fos Serum Response Kinetics. *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 3767–3778.
303. Pakay, J.L., Diesch, J., Gilan, O., Yip, Y.-Y., Sayan, E., Kolch, W., Mariadason, J.M., Hannan, R.D., Turchinsky, E., Dhillon, A.S. (2012) A 19S proteasomal subunit cooperates with an ERK MAPK-regulated degnon to regulate accumulation of Fra-1 in tumour cells. *Oncogene*, **31**, 1817–1824.
304. Kuzina, E.S., Chernolovskaya, E.L., Kudriaeva, A.A., Zenkova, M.A., Knorre, V.D., Surina, E.A., Ponomarenko, N.A., Bobik, T.V., Smirnov, I.V., Bacheva, A.V., Belogurov, A.A., Gabibov, A.G., Vlasov, V.V. (2013) Immunoproteasome enhances intracellular proteolysis of myelin basic protein. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **453**, 300–303.
305. Belogurov, A., Kudriaeva, A., Kuzina, E., Smirnov, I., Bobik, T., Ponomarenko, N., Kravtsova-Ivantsiv, Y., Ciechanover, A., Gabibov, A. (2014) Multiple Sclerosis Autoantigen Myelin Basic Protein Escapes Control by Ubiquitination During Proteasomal Degradation. *J. Biol. Chem.*, **289**, 17758–17766.
306. Belogurov, A., Kuzina, E., Kudriaeva, A., Kononikhin, A., Kovalchuk, S., Surina, Y., Smirnov, I., Lomakin, Y., Bacheva, A., Stepanov, A., Karpova, Y., Lyupina, Y., Kharybin, O., Melamed, D., Ponomarenko, N., Sharova, N., Nikolaev, E., Gabibov, A. (2015) Ubiquitin-independent proteasomal degradation of myelin basic protein contributes to development of neurodegenerative autoimmunity. *FASEB J.*, **29**, 1901–1913.
307. Kuzina, E., Kudriaeva, A., Smirnov, I., Dubina, M.V., Gabibov, A., Belogurov, A. (2014) Glatiramer acetate and nanny proteins restrict access of the

- multiple sclerosis autoantigen myelin basic protein to the 26S proteasome. *Biomed Res. Int.*, **2014**, 926394.
308. Raule, M., Cerruti, F., Cascio, P. (2014) Enhanced rate of degradation of basic proteins by 26S immunoproteasomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 1942–1947.
309. Dange, T., Smith, D., Noy, T., Rommel, P.C., Jurzitza, L., Cordero, R.J.B., Legendre, A., Finley, D., Goldberg, A.L., Schmidt, M. (2011) Blm10 Protein Promotes Proteasomal Substrate Turnover by an Active Gating Mechanism. *J. Biol. Chem.*, **286**, 42830–42839.
310. Melo, S.P., Barbour, K.W., Berger, F.G. (2011) Cooperation between an intrinsically disordered region and a helical segment is required for ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.*, **286**, 36559–36567.
311. Singh Gautam, A.K., Balakrishnan, S., Venkatraman, P. (2012) Direct Ubiquitin Independent Recognition and Degradation of a Folded Protein by the Eukaryotic Proteasomes-Origin of Intrinsic Degradation Signals. *PLoS One*, **7**, e34864.
312. Alfassy, O.S., Cohen, I., Reiss, Y., Tirosch, B., Ravid, T. (2013) Placing a disrupted degradation motif at the C terminus of proteasome substrates attenuates degradation without impairing ubiquitylation. *J. Biol. Chem.*, **288**, 12645–12653.
313. Tsvetkov, P., Reuven, N., Shaul, Y. (2009) The nanny model for IDPs. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 778–781.
314. Wang, X.J., Yu, J., Wong, S.H., Cheng, A.S., Chan, F.K., Ng, S.S., Cho, C.H., Sung, J.J., Wu, W.K. (2013) A novel crosstalk between two major protein degradation systems. *Autophagy*, **9**, 1500–1508.
315. Qiao, L., Zhang, J. (2009) Inhibition of lysosomal functions reduces proteasomal activity. *Neurosci., Lett.*, **456**, 15–19.
316. Korolchuk, V.I., Mansilla, A., Menzies, F.M., Rubinsztein, D.C. (2009) Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-Proteasome Pathway Substrates. *Mol. Cell*, **33**, 517–527.
317. Gao, Z., Gammoh, N., Wong, P.-M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jiang, X. (2010) Processing of autophagic protein LC3 by the 20S proteasome. *Autophagy*, **6**, 126–137.
318. Dikic, I. (2017) Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 193–224.