

**ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ПРОТЕОЛИЗ.
СИГНАЛЫ СЕЛЕКТИВНОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ**© 2000 г. Н. Н. Старкова, Е. П. Королева, Т. В. Ротанова[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 03.09.99 г. Принята к печати 15.09.99 г.

Обзор посвящен рассмотрению сведений об основных ферментных системах селективного протеолиза, функционирующих в прокариотических и эукариотических клетках и обеспечивающих поддержание внутриклеточного гомеостаза. Приведены данные о специфических сигналах селективной деградации, обнаруженных в белках-мишенях.

Ключевые слова: протеолиз селективный; протеиназы АТФ-зависимые; протеасома; сигналы деградации.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших механизмов поддержания внутриклеточного гомеостаза является селективный протеолиз, который выполняет две основные функции. Первая из них заключается в деградации дефектных полипептидов, образующихся в результате ошибок транскрипции или трансляции, химического повреждения, неправильного сворачивания (folding) или тепловой денатурации [1–4]. Другая функция внутриклеточного протеолиза – регуляция клеточного метаболизма за счет быстрого расщепления короткоживущих регуляторных белков. Путем регуляции содержания соответствующих полипептидов контролируются активность факторов транскрипции, литический цикл фага λ, презентация антигенов, клеточный цикл, эмбриональное развитие и другие процессы [2–7].

В прокариотах протеолитическую деградацию эффективно осуществляют высокомолекулярные олигомерные АТФ-зависимые протеиназы [3, 8–11]. В эукариотических клетках основная масса белков атакуется мультикаталитическими комплексами – 20S- и 26S-протеасомами [12–17] (часть белков селективно расщепляется в лизосомах [18]). И у прокариот и у эукариот способность соответствующих протеиназ узнавать и деградировать поврежденные белки и специфические подгруппы нативных внутриклеточных белков (не затрагивая большинства функциональных белков) связана с затратой энергии. Полагают, что именно гидролиз АТФ, сопряженный с протеолизом, обеспечивает возможность осуществления стадий, связанных с селекцией и деградацией субстратов [19]. Для ряда случаев установлено, что подвергающиеся селективному протеолизу

белки содержат специфические сигналы деградации, которые распознаются протеиназами. Роль таких сигналов могут играть модифицированные структуры белков, специфические аминокислотные последовательности или конформационные детерминанты [3, 20–22]. В настоящем обзоре представлены данные об основных ферментных системах селективного протеолиза в прокариотических и эукариотических клетках, а также рассмотрены известные на сегодняшний день сигналы деградации белков.

**СЕЛЕКТИВНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ
БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ ПРОКАРИОТ**

Существование специализированной энергозависимой системы деградации аномальных и чужеродных белков в клетках *Escherichia coli* было обнаружено еще в начале 70-х годов [23, 24]. Мутации, приводящие к снижению уровня расщепления дефектных форм β-галактозидазы, были впервые описаны в работе [25]. Последующие исследования показали, что эти мутации локализованы на определенном участке бактериальной хромосомы, совпадающем с *lon* (*capR*)-геном [26, 27], относящимся к семейству генов теплового шока [28]. В это же время при скрининге внутриклеточных протеиназ *E. coli* [29, 30] был обнаружен фермент, названный La-протеиназой, активность которого при гидролизе α-казеина зависела от наличия в реакционной среде АТФ и ионов магния [30]. Сравнение свойств продукта гена *lon* [27] и La-протеиназы показало, что они представляют собой один и тот же белок [26], функционирующий как гомоолигомер. Анализ первичной структуры La(*Lon*)-протеиназы (784 а.о., далее – Lon-протеиназа) с учетом данных о ее ферментативной активности позволил выдвинуть предположение,

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 335-42-22; e-mail: rotanova@enzyme.siohc.ras.ru).

Таблица 1. Протеиназы, участвующие в селективном протеолизе в клетках *E. coli* (по данным работ [11, 19, 47])

Протеиназа	Ген	Мол. масса, Да (число субъединиц)	Тип активного центра	Субстраты в клетках <i>E. coli</i> *
Lon (La)	<i>lon</i>	87300 (4?)	Сериновая протеиназа	RcsA, SulA, λ N, λ cII, λ Xis, σ 32, CcdA, RelBP307, дефектные белки
ClpAP (Ti)	<i>clpA</i> <i>clpP</i>	83000 (12) 21000 (14)	Сериновая протеиназа	ClpA, σ 32, MazE, некоторые гибридные белки, субстраты, расщепляемые по N-концевому правилу, белки с модифицированными C-концевыми последовательностями
ClpXP	<i>clpX</i> <i>clpP</i>	46300 (?) 21000 (14)	Сериновая протеиназа	λ O, Phd, RpoS, σ 32, MuA, MuC
FtsH (HflB)	<i>ftsH</i>	70700 (?)	Zn-Зависимая металлопротеиназа	λ cII, λ cIII, λ Xis, σ 32, SecY, белки с модифицированными C-концевыми последовательностями
HslUV (ClpYQ)	<i>hslU</i> <i>hslV</i>	50000 (14) 19000 (12)	Треониновая протеиназа	Денатурированные и ряд регуляторных белков, σ 32
Tsp	<i>tsp</i> (<i>prc</i>)	74000 (1)	Сериновая протеиназа с каталитической диадой Ser-Lys	Белки с модифицированными C-концевыми последовательностями

* SulA – регулятор клеточного деления [37], RcsA – регулятор транскрипции генов [38], CcdA [39] и RelBP307 [40] – белки “антидоты”, λ N, λ cII, λ cIII [41, 58, 59], λ Xis [57] и λ O [75] – белки фага λ , σ 32 [81, 82] – фактор теплового шока, SecY [60] – компонент белок-секретирующего аппарата, MazE [72] – регулятор программируемой гибели клеток, ClpA [63] – АТФ-азная субъединица ClpAP-протеиназы, Phd – белок фага P1 [76], RpoS [77] – α -фактор, MuA [47] – транспозаза, MuC [47] – репрессор фага Mu, гибридные белки, содержащие β -галактозидазу [63].

что субъединица фермента состоит из трех последовательно соединенных функциональных доменов [31, 32]: N-концевого, роль которого пока до конца не выяснена; центрального АТФ-азного, содержащего консенсусные АТФ-связывающие фрагменты последовательности (так называемые мотивы Уолкера А и В) [31, 33], и C-концевого – протеолитического, включающего каталитически активный остаток серина Ser679 [34]. Интересной особенностью Lon-протеиназы является ее способность к связыванию ДНК [35, 36], однако до сих пор ДНК-связывающий участок фермента не локализован. Наряду с АТФ-зависимой деградацией аномальных белков в клетках *E. coli* Lon-протеиназа осуществляет расщепление ряда своих физиологических субстратов – SulA (регулятор клеточного деления) [37], RcsA (регулятор транскрипции) [38], CcdA [39] и RelBP307 [40] (белки “антидоты”) (табл. 1). Кроме того, Lon-протеиназа участвует в деградации некоторых белков фага λ , например λ N и λ cII [41].

В дальнейших исследованиях гены, кодирующие белки, гомологичные Lon-протеиназе *E. coli*, были обнаружены во многих микроорганизмах [19, 42], а также в хлоропластах растений [43] и в митохондриях эукариот [44–46].

К настоящему времени установлено, что в клетках *E. coli* кроме Lon-протеиназы функционируют по крайней мере еще четыре АТФ-зависимые протеиназы, также участвующие в быстрой селективной деградации белков [3, 11, 47, 48]. Это протеиназы FtsH [49–60], ClpAP [54, 61–72], ClpXP [64, 65, 73–77] и HslUV [78–86] (табл. 1). Zn-Зави-

симая протеиназа FtsH [56], как и сериновая Lon-протеиназа [9], является гомоолигомером; аминокислотные последовательности субъединиц обоих ферментов включают и протеолитический и АТФ-азный центры. ClpAP, ClpXP [4, 73] и HslUV [73, 83] – гетероолигомерные ферменты, состоящие из регуляторных АТФ-азных (ClpA, ClpX или HslU) и протеолитических (ClpP или HslV) субъединиц. ClpP является сериновой пептидгидролазой [65, 71], роль каталитически активного остатка в HslV играет N-концевой остаток треонина [81]. Представители АТФ-зависимых протеиназ подсемейств FtsH, ClpAP и ClpXP обнаружены также в клетках других прокариот и некоторых эукариот [3, 11, 48].

Установлено, что узнавание и селективный отбор белковых субстратов АТФ-зависимыми протеиназами происходит при участии АТФ-азных доменов или АТФ-азных субъединиц ферментов [10, 19]. Последние исследования показали, что связывание субстрата на этом этапе зачастую сопровождается разворачиванием (unfolding) его молекулы или по крайней мере фрагмента молекулы, подвергающегося затем расщеплению в протеолитическом центре [48, 87, 88]. В дальнейшем происходит процессивная деградация субстрата с образованием коротких (6–15 а.о.) пептидов [48]. Вместе с тем до сих пор в большинстве случаев остается неясным, за счет каких взаимодействий и с какими именно областями ферментов происходит селективное связывание субстратов, а также, каким образом субстраты затем “презентируются” протеолитическим активным центрам [48].

АТР-ЗАВИСИМАЯ СЕЛЕКТИВНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ БЕЛКОВ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

В цитозоле эукариот селективная деградация белков осуществляется в основном за счет активности больших мультикаталитических комплексов (протеасом) [12], содержание которых в клетке может достигать 1% общего белка клетки [13]. Протеасомы участвуют в убикитиноопосредованном (см. далее) расщеплении некоторых регуляторных ферментов, транскрипционных регуляторов, белков клеточного цикла, а также дефектных полипептидов (табл. 2) [14]. Недавние исследования показали, что протеасомы играют важную роль в метаболизме мембранных белков [16, 17] и регуляции клеточных процессов [15], они участвуют также в презентации антигенов [89].

Впервые сообщение о существовании высокомолекулярной АТР-зависимой нейтральной протеиназы в клетках печени крысы и в ретикулоцитах было опубликовано в 1979 г. [90]; позже подобные "мультикаталитические протеиназы" были обнаружены независимо разными группами исследователей в различных организмах [12]. В работах [91, 92] было показано, что клетки млекопитающих содержат два типа протеолитических комплексов, различающихся по молекулярной

массе и активности. Меньший комплекс, названный 20S-протеасомой, не проявлял активности по отношению к убикитинилированным белкам, в то время как больший – 26S-протеасома – специфически расщеплял убикитинилированные белки, причем этот процесс осуществлялся по АТР-зависимому механизму. Многочисленные исследования, включающие эксперименты по иммунопреципитации и реконструкции активных 26S-протеасом, генетические исследования на дрожжах и данные электронной микроскопии однозначно показали, что 26S-протеасома образована 20S-протеасомой, играющей роль протеолитического ядра, а также так называемым активатором протеасомы P700 (или 19S-комплексом), который обеспечивает проявление ферментативной активности и определяет субстратную специфичность 26S-комплекса [12].

20S-протеасома. При установлении строения 20S-протеасомы эукариот важную роль сыграли данные, полученные ранее для 20S-протеасомы из археобактерии *Thermoplasma acidophilum*, которая образована двумя типами субъединиц (α и β) и состоит из четырех колец, расположенных друг над другом. Внешние кольца содержат только α -субъединицы, а внутренние – β -субъединицы [93], несущие каталитически активные N-конце-

Таблица 2. Клеточные белки – субстраты 26S-протеасомы [ср. 14]

Белок-субстрат	Функция в клетке
<i>В процессах:</i>	
<i>регуляции метаболизма</i>	
Орнитиндекарбоксилаза	Фермент метаболизма, синтез полиаминов
Фруктозо-1,6-дифосфатаза	Фермент метаболизма, глюконеогенез
Gcn4	Активатор транскрипции, синтез аминокислот и пуринов
<i>дифференцировки клеток</i>	
МАТ α 2	Репрессор транскрипции, репрессия специфических mating-type-генов
G α	G-белок, передача сигнала
<i>контроля клеточного цикла и роста клеток</i>	
Cln2	G1-циклин, контроль cdc28-киназы
Cln3	G1-циклин, контроль cdc28-киназы
Clb5	Циклин S-фазы, контроль cdc28-киназы
Clb2	Митотический циклин, контроль cdc28-киназы
Sic1	Ингибирование Clb5-cdc28-комплекса
c-Mos	Протеинкиназа, "арест" мейоза в ооцитах
c-Jun	Активатор транскрипции, передача сигнала
p53	Супрессия опухоли, образования
<i>ответа на стресс</i>	
NF- κ B	Регулятор транскрипции, иммунные и воспалительные реакции
I- κ B	Ингибитор NF- κ B, иммунные и воспалительные реакции
<i>деградации дефектных белков или условных субстратов</i>	
Канаванилсодержащие белки	Неизвестна
Fas2	α -Субъединица синтетазы жирных кислот
CTFR	Ионный насос, транспорт хлорид-ионов через плазматическую мембрану

вые остатки треонина [94]. Общая структура комплекса $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ [95].

Электронно-микроскопические исследования показали, что 20S-протеасома эукариот представляет собой цилиндрическую частицу диаметром около 12 нм и длиной около 17 нм, которая также состоит из четырех колец. Кольца расположены друг над другом [96] и формируют обширную внутреннюю полость [97, 98]. В отличие от протеасом архебактерий 20S-протеасомы эукариот могут содержать несколько различных типов субъединиц (14 – у дрожжей или еще более – у высших эукариот [12]), которые можно также разделить на два семейства (α и β). Общее строение эукариотического комплекса близко к структуре 20S-протеасомы из *T. acidophilum* [96, 99, 100], однако, у эукариот субъединичный состав 20S-комплекса варьирует в зависимости от вида, типа ткани, стадии развития организма и влияния внешних факторов [101, 102]. α -Субъединицы способны формировать семичленные кольца в отсутствие β -субъединиц, более того, олигомеризация α -субъединиц необходима для образования колец, состоящих из β -субъединиц [103].

20S-протеасома обладает широким спектром пептидгидролазной активности. Она проявляет химотрипсино- и трипсинподобную активности, а также атакует пептидные связи, образованные дикарбоновыми аминокислотами (каспазоподобная активность) [104], аминокислотами с разветвленными боковыми цепями и небольшими нейтральными аминокислотами, что объясняется присутствием в составе 20S-протеасомы субъединиц, проявляющих различную специфичность [12]. Протеасома осуществляет процессивную деградацию белковых субстратов с образованием пептидных продуктов размером от 3 до 22 а.о. [105]. В последнее время обнаружен феномен аллостерической взаиморегуляции активных центров протеасомы, обладающих различной специфичностью [106].

26S-протеасома. Детальные исследования 26S-протеасом из клеток амфибий, млекопитающих, листьев шпината и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [107–109] показали, что эти комплексы имеют сходное строение и представляют собой симметричные частицы, состоящие из 20S-протеасом, заключенных между двумя белковыми 19S-комплексами. Регуляторный 19S-комплекс, включающий около 20 различных субъединиц [110], выполняет разнообразные функции (селективное распознавание субстратов и взаимодействие с ними [111], реализация изопептидазной (см. ниже) и АТФ-азной активностей, активация пептидазной активности 20S-комплекса и обеспечение сборки полного 26S-комплекса [112]). 19S-Комплекс содержит по крайней мере 6 различных АТФ-азных субъединиц, которые принадлежат к белкам ААА-типа [53] (ATPases associated with diverse cellular activities; следует отметить, что к

этому же типу белков относятся Lon- и FtsH-протеиназы прокариот). До сих пор остается невыясненным физиологическое значение такого разнообразия АТФ-азных субъединиц и роль каждой из них, а также неясно, присутствуют ли все они одновременно в 19S-комплексе. Мутации в некоторых из субъединиц могут предотвращать гидролиз определенных белковых субстратов, не влияя при этом на деградацию других [113]. Помимо АТФ-азных субъединиц 19S-комплекс содержит около 15 полипептидов, не обладающих АТФ-связывающей способностью [112, 114]. Роль этих субъединиц может заключаться в обеспечении взаимодействия с 20S-протеасомой и в ее активации, высвобождении полиубикитиновых цепей и их гидролизе, поддержании структуры 26S-комплекса, взаимодействии с субстратами и их презентации 20S-протеасоме [12].

Убикитинзависимая деградация белков. Деградация большинства полипептидов 26S-протеасомой включает их предварительную модификацию убикитином. Убикитиновая система представляет собой сложную ферментную систему, компоненты которой были обнаружены только в эукариотических клетках [7, 115, 116]. Она обеспечивает селективную модификацию белковых субстратов путем ковалентного присоединения небольшого белка (76 а.о.) – убикитина [117].

Схема процесса убикитинилирования белка-мишени представлена на рис. 1 [116]. Иницирующим этапом является активация С-концевого остатка глицина в молекуле убикитина (Ub), катализируемая специфическим убикитинактивирующим ферментом E1. На первой стадии (I) происходит образование прочного комплекса между E1 (в форме E1SH, т.е. содержащей свободную SH-группу цистеина) и убикитинаденилат-интермедиатом (AMP-Ub) [118]. Последующая реакция активного остатка цистеина фермента с убикитинаденилатом приводит к образованию тиоэфирной связи между ферментом и убикитином (E1S ~ Ub), освобождению AMP [119] и формированию комплекса, включающего одновременно E1S ~ Ub и убикитинаденилат (AMP-Ub).

На второй стадии (II) происходит перенос активированного убикитина из этого комплекса на тиоловую группу убикитинпереносящего фермента E2 [120], который затем выступает донором убикитина на стадии (III) – при образовании изопептидной связи между С-концевым остатком глицина убикитина и ϵ -аминогруппой внутреннего остатка лизина белка-мишени (Protein), катализируемой убикитинлигазой E3. Полученные моноубикитинилированные продукты (Protein~Ub) не являются субстратами для протеолитической деградации, а участвуют в регуляции клеточного цикла, репликации ДНК, биогенеза пероксисом и в других процессах [7].

Другая группа E2-ферментов катализирует образование полиубикитиновых цепей (Protein~(Ub)_n)

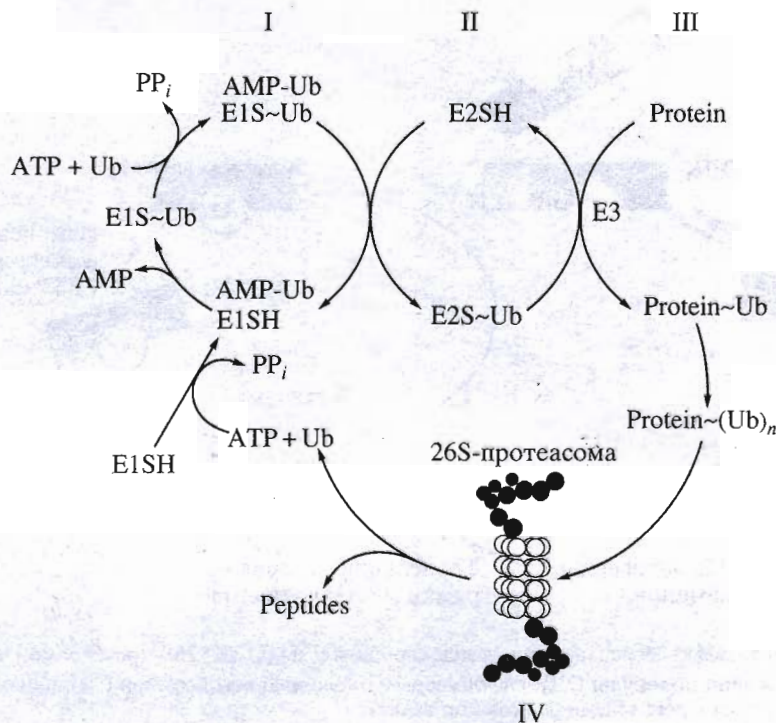


Рис. 1. Убикитинзависимая деградация белков 26S-протеасомой [ср. 116].
Ub – убикитин; I–IV – стадии процесса (см. текст).

за счет связывания каждой последующей молекулы убикитина с ϵ -аминогруппой остатка Lys48 предыдущей [121]. Так как убикитин содержит несколько остатков лизина, в ряде случаев присоединение последующих молекул белка может происходить и по другим остаткам, при этом образуются разветвленные полиубикитиновые цепи [121]. Полиубикитинилированные белки-мишени быстро подвергаются деградации 26S-протеасомой (стадия IV).

Убикитиннезависимый протеолиз 26S-протеасомой: антизимзависимая деградация орнитиндекарбоксилазы. В настоящее время известен только один пример убикитиннезависимого расщепления белков 26S-протеасомой – деградация орнитиндекарбоксилазы, ключевого фермента биосинтеза полиаминов [122]. Накопление полиаминов опосредованно приводит к быстрой инактивации орнитиндекарбоксилазы, которая происходит с участием короткоживущего белка, названного антизимом (26.5 кДа). Антизим был впервые обнаружен в печени крыс и в некоторых культивируемых клетках [123], а затем найден в тканях многих представителей высших животных [122]. Полиамины индуцируют трансляцию мРНК антизима, происходящую со сменой рамок считывания с одновременным сдвигом рамки, что приводит к синтезу физиологически активной молекулы антизима [124].

Антизим стимулирует деградацию орнитиндекарбоксилазы *in vivo* и *in vitro*, причем этот процесс требует присутствия АТФ, но не зависит ни от убикитина, ни от ферментов системы убикитинилирования белков [125]. Показано, что *in vitro* одна молекула орнитиндекарбоксилазы связывает одну молекулу антизима. Однако тот факт, что относительно малые количества антизима в клетке способны активировать деградацию больших количеств фермента, предполагает, что *in vivo* молекула антизима последовательно используется в нескольких циклах деградации [126].

С целью идентификации ферментных систем, участвующих в инактивации орнитиндекарбоксилазы, было изучено влияние различных ингибиторов протеолитических ферментов на этот процесс [127]. Оказалось, что ни один из типичных ингибиторов кальпаинов, лизосомальных катепсинов и сериновых протеиназ не влиял на деградацию фермента. И только ингибитор протеасом – гемин – полностью подавлял инактивацию орнитиндекарбоксилазы. Известно, что ингибирующий эффект гемина сопровождается накоплением в клетке полиубикитинилированных белков (субстратов протеасомы) [128], однако в случае орнитиндекарбоксилазы накопления полиубикитинилированного фермента не происходило. Таким образом, возникло предположение, что орнитиндекарбоксилаза подвергается расщеплению протеасомой, причем этот процесс не зависит от убикитина. Действительно, оказалось, что очищенная 26S-протеасо-

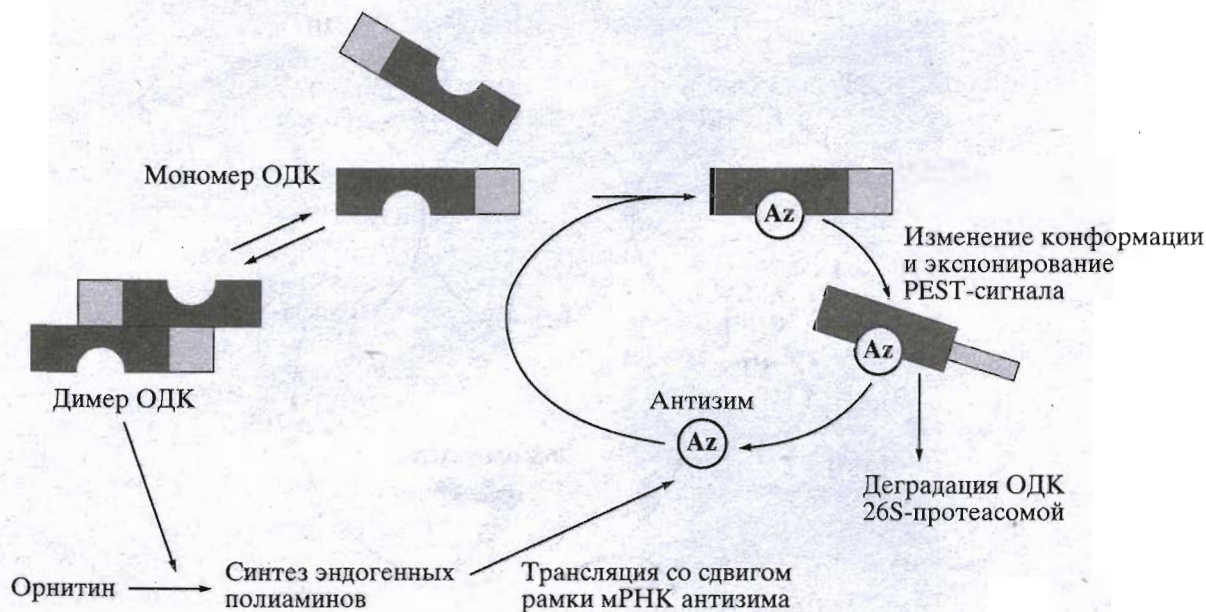


Рис. 2. Схема антизимзависимой деградации орнитиндекарбоксилазы (ОДК) 26S-протеасомой [ср. 129].

Az – антизим; в изображении молекулы ОДК светло-серым окрашиванием выделен C-концевой фрагмент, содержащий PEST-сигнал селективной деградации белков (см. текст).

ма гидролизует орнитиндекарбоксилазу в отсутствие убикитина и ферментов системы убикитинирования белков, но в присутствии АТФ и антизима [127].

На основе полученных данных был предложен следующий механизм регуляции деградации орнитиндекарбоксилазы (рис. 2) [129]. В клетке орнитиндекарбоксилаза существует в виде гомодимера, причем скорость его диссоциации–реассоциации очень высока. Антизим предпочтительно связывается с мономером и тем самым стабилизирует неактивное мономерное состояние фермента и вызывает структурные изменения молекулы орнитиндекарбоксилазы. Происходит экспонирование C-концевого фрагмента фермента, содержащего специфический сигнал деградации (PEST-мотив, см. далее) [130]. Орнитиндекарбоксилаза подвергается расщеплению 26S-протеасомой, молекула антизима при этом освобождается из комплекса и участвует в последующих циклах деградации.

СИГНАЛЫ СЕЛЕКТИВНОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ

Мишенями для селективного внутриклеточного протеолиза служат либо белки, генетически запрограммированные на быструю деградацию в физиологических условиях (обычно регуляторные короткоживущие белки), либо “аномальные” белки (“abnormal proteins”), отличающиеся от природных белков измененными элементами структуры или последовательности [8]. К последним относятся белки с “missense”- или “nonsense”-

мутациями, некорректно синтезированные белки, белки, содержащие аналоги аминокислот, белки, утратившие третичную структуру, белки, поврежденные в результате физического или химического воздействия, белки – продукты чужеродных генов, избыточные субъединицы, появляющиеся в результате клонирования или генетических манипуляций. Как же протеолитические системы осуществляют выбор между белками-мишенями протеолиза и остальными внутриклеточными белками, которые не должны повреждаться в процессе функционирования внутриклеточных протеиназ?

Известно, что ряд белков-мишеней специфически расщепляется строго определенными протеиназами, другие белки могут расщепляться различными внутриклеточными протеиназами. Таким образом, все подвергающиеся гидролизу белки должны содержать сигналы деградации, которые либо недоступны в нативных белках, либо формируются или складываются из отдельных элементов в процессе повреждения или денатурации белка-мишени [8]. Белки могут иметь один или более сигналов деградации, и в ряде случаев для узнавания и вовлечения белка в систему деградации необходимы два или несколько сигналов.

Известные в настоящее время сведения о сигналах деградации белков относятся в основном к протеолитическим системам, функционирующим в клетках эукариот. Аналогичные данные о клетках прокариот весьма ограничены.

N-Концевое правило. Зависимость скорости деградации белка от природы его N-концевого остатка была впервые продемонстрирована в

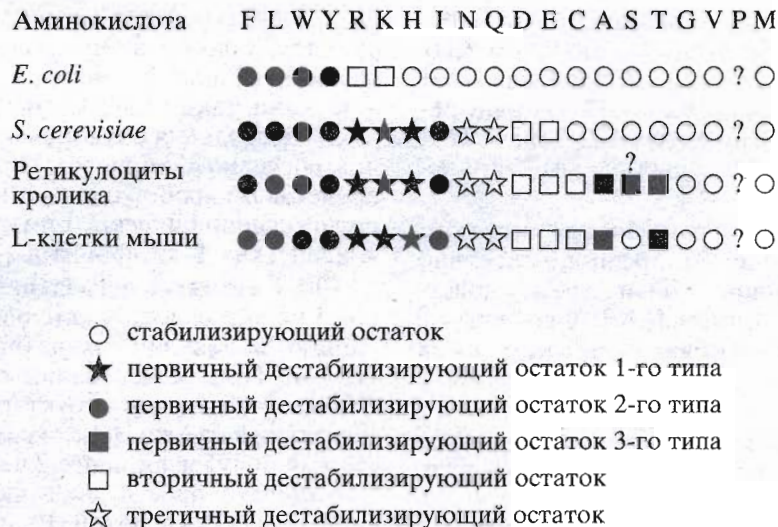


Рис. 3. Аминокислотные остатки, определяющие деградацию белков по N-концевому правилу [21, 136].

1986 г. в экспериментах по экспрессии в клетках дрожжей *S. cerevisiae* гибридных белков, состоящих из убикитина и β -галактозидазы *E. coli* (Ub-X- β -gal, где X – любой из 20 а.о.) [131]. Биосинтез таких белков сопровождался котрансляционным отщеплением убикитина, происходящим независимо от природы N-концевого остатка (X) β -галактозидазы (кроме Pro). Оказалось, что время полужизни белков с N-концевыми остатками Met, Ser, Ala, Thr, Val, Gly и Cys (стабилизирующими) было сопоставимо с временем полужизни неубикитинилированной β -галактозидазы (более 20 ч), а время полужизни белков с N-концевыми остатками Ile, Glu, Tyr, Gln, His, Phe, Leu, Asp, Lys, Arg, Asn и Trp (дестабилизирующими) – резко сокращалось (до 2–30 мин), причем их деградация происходила по убикитинзависимому пути. В дополнение к этим данным были приведены следующие наблюдения: N-концевые аминокислотные остатки метаболически стабильных белков прокариот и эукариот обычно представлены стабилизирующими аминокислотами, в то время как N-концевые остатки нестабильных белков – дестабилизирующие. Так, белок CII фага λ (время полужизни менее 3 мин) имеет N-концевой Arg [132]. Многие секретруемые белки, например эукариотические токсины, имеют строго дестабилизирующие N-концевые аминокислотные остатки – Arg, Lys, Leu, Phe, Asp [131]. В некоторых дифференцирующихся и регенерирующих тканях долгоживущие белки подвергаются расщеплению после посттрансляционного N-концевого присоединения дестабилизирующих аминокислот специфическими аминоацил-tРНК-протеинтрансферазами [133]. Таким образом, возникло предположение, что скорость деградации белка определяется природой его N-концевого остатка

(N-end rule) [134], и этот механизм универсален для различных типов клеток.

Дополнительным условием деградации по N-концевому правилу для эукариот служит требование наличия остатка Lys в положении 15–17 аминокислотной последовательности белка-мишени – центра убикитинилирования мишени [135]. Вследствии деградация белков, происходящая в соответствии с N-концевым правилом, была также показана для ретикулоцитов млекопитающих *in vitro* [136] и клеток *E. coli* [137].

Дальнейшие исследования обнаружили иерархическую организацию N-концевого правила [136] (рис. 3). Было установлено, что распознавание N-концевого остатка белка в клетках *S. cerevisiae* осуществляется продуктом гена *UBR1* – N-рекогнином (убикитинлигазой E3) [138]. N-Рекогнин обладает двумя субстратсвязывающими сайтами: для основных аминокислот Arg, Lys, His (первичные дестабилизирующие остатки первого типа) и для объемных гидрофобных аминокислот Phe, Leu, Trp, Tyr, Ile (первичные дестабилизирующие остатки второго типа) (рис. 3). Комплекс N-рекогнина с Ubc2p, одним из ферментов E2-семейства, катализирует присоединение остатка убикитина к белку, который затем подвергается полиубикитинилированию и быстрой деградации. Позже был обнаружен N-рекогнин млекопитающих E3 β , который взаимодействует с субстратами, несущими N-концевые остатки Ala, Thr и, возможно, Ser (первичные дестабилизирующие остатки третьего типа) [139].

Белки со вторичными дестабилизирующими остатками Glu, Asp и Cys (рис. 3) также эффективно деградируют в системе ретикулоцитов млекопитающих. Однако для их распознавания N-рекогнином необходима посттрансляционная N-концевая

модификация аминоксил-тРНК-протеинтрансферазами, приводящая к присоединению первичных дестабилизирующих остатков. В дрожжах этот процесс осуществляется аргинил-тРНК-трансферазой (R-трансферазой), продуктом гена *ATE1*, которая присоединяет Arg к свободным N-концевым остаткам Glu и Asp [140].

К третичным дестабилизирующим остаткам относятся Gln и Asp (рис. 3), предположительно переводимые во вторичные (Glu и Asp) под действием специфических амидаз [136]. Ферменты с такой активностью были обнаружены в дрожжах (N-терминальная амидаза, специфичная для Asp и Gln) [141] и тканях мышей [142].

В целом последовательность стадий в деградации белков, согласно N-концевому правилу, представляется следующим образом: третичные дестабилизирующие остатки переводятся под действием амидаз во вторичные; вторичные модифицируются путем присоединения первичных остатков аминоксил-тРНК-протеинтрансферазами; первичные остатки узнаются N-рекогнином, находящимся в комплексе с убикитинпереносящим ферментом E2, после чего белок-мишень подвергается полиубикитинированию и расщеплению 26S-протеасомой.

Несмотря на то что у прокариот отсутствует механизм убикитинзависимой деградации белков, ряд белков прокариотических клеток подвергается деградации по N-концевому правилу [137]. Было показано, что нарушения в этом механизме деградации в клетках *E. coli* связаны с мутациями в гене *aat*, кодирующем Leu/Phe-тРНК-протеинтрансферазу, и в генах *clpA* и *clpP*, кодирующих протеиназу ClpAP [137, 143]. Таким образом, гидролиз белков в соответствии с N-концевым правилом в прокариотических клетках осуществляется, вероятнее всего, ClpAP-протеиназой. Однако не установлено, сама ли ClpAP распознает дестабилизирующий N-концевой остаток белка-мишени или существует взаимодействующий с ClpAP белок-посредник, который и узнает мишень для гидролиза. Роль первичных дестабилизирующих остатков в клетках *E. coli* выполняющих остаток гидрофобных аминокислот Leu, Phe, Trp и Tug, а вторичных – остатки Lys и Arg, которые надстраиваются первичными дестабилизирующими остатками под действием Leu/Phe-тРНК-протеинтрансферазы (рис. 3).

В последнее время было обнаружено, что регуляция ряда физиологических процессов осуществляется путем селективной деградации соответствующих белков-мишеней по N-концевому правилу. Например, одной из таких мишеней является белок Csr9p – репрессор *PTR2*-гена *S. cerevisiae*, ответственного за синтез трансмембранного переносчика пептидов и, кроме того, обеспечивающего устойчивость клеток дрожжей к токсическому действию ионов меди [144]. Показано также, что большинство белков мышечных

клеток подвергается протеолизу по N-концевому правилу, причем этот процесс усиливается при различных патологических изменениях мышечной ткани, таких, например, как атрофия и сепсис [145]. Деградация опухолевых и вирусных антигенов, согласно N-концевому правилу, также может представлять собой один из механизмов индукции антигенспецифического иммунного ответа цитотоксических Т-лимфоцитов [146].

PEST-сигналы деградации белков. В работе [147] был предложен еще один подход к обнаружению молекулярных детерминант деградации белков. При исследовании скорости деградации белков с известной структурой после их микроинъекции в клетки HeLa оказалось, что белки с периодом полужизни менее 2 ч содержат фрагмент последовательности, обогащенные пролином (P), глутаминовой кислотой (E), серином (S) и треонином (T). Такие последовательности были названы PEST-сигналами, и в настоящее время считается, что они определяют быструю деградацию белков внутриклеточными протеиназами [148].

Делеция содержащего PEST-сигнал фрагмента последовательности орнитиндекарбоксилазы мышцы значительно увеличивает время полужизни фермента *in vitro*, а перенос этого фрагмента на протеолитически стабильную орнитиндекарбоксилазу трипаносомы приводит к быстрому гидролизу последней [129, 149]. Делеции PEST-последовательностей циклинов дрожжей и млекопитающих также снижают скорость протеолитической деградации этих белков [150, 151]. Даже единичные аминокислотные замены в PEST-мотиве белка GCN4 значительно увеличивают его стабильность [152].

Некоторые PEST-последовательности представляют собой “условные” сигналы деградации, которые активируются в определенных условиях, например, при фосфорилировании [153], взаимодействии с лигандами [154] и др. Так, каталитическая (C) и регуляторная (R) субъединицы cAMP-зависимой протеинкиназы содержат PEST-сигналы, при этом время полужизни комплекса C₂R₂ составляет около 10 ч, а время полужизни отдельных субъединиц – около часа. Представляется вероятным, что PEST-сигналы замаскированы в C₂R₂-комплексе, в то время как при cAMP-опосредованной диссоциации фермента происходит экспонирование этих сигналов [154].

До сих пор неясно, каким путем происходит узнавание PEST-сигналов и какие протеиназы гидролизуют белки, несущие эти сигналы. В настоящее время наиболее вероятной представляется убикитинзависимая деградация PEST-содержащих субстратов. Известно, что содержащие PEST-фрагменты белки MAT α2, p53, орнитиндекарбоксилаза, c-Jun, G1-циклины расщепляются 26S-протеасомой [14, 148] (табл. 2). Возможно, что вначале белок-мишень подвергается фосфорилированию по остаткам треонина и серина PEST-последова-

тельностью, как это было показано для I-кВ [153]. Некоторые PEST-содержащие белки, например, c-fos, расщепляются кальпаинами, однако, следует отметить, что в этом случае их деградация не зависит от наличия PEST-сигналов [155].

Сигнал деградации циклинов – “destruction box”. В клетке существуют два типа циклинов – стартовые (Cln) и митотические (A и B). Митотические циклины подвергаются быстрому протеолизу во время анафазы, что приводит к выходу клетки из стадии митоза. Сигналами деградации у стартовых циклинов являются PEST-мотивы, а для селективного расщепления митотических циклинов A и B требуется наличие в их структуре сигнала, получившего название “destruction box”.

В 1991 г. было обнаружено, что циклин B, лишенный 90 N-концевых остатков, не подвергается деградации во время митоза. В то же время переносение этого фрагмента на белок A стафилококка вызывало его убикитинирование и быстрый протеолиз [156]. Методом точечного мутагенеза было показано, что за деградацию циклина B ответствен консервативный нонапептид RTALGDIGN [156]. Подобная последовательность характерна для всех митотических циклинов и в более общем виде ее можно представить как RXALGXIXN, где X – любая аминокислота. Точечные мутации или делеции “destruction box”-сигналов циклинов в клетках HeLa, ооцитах лягушки, клетках дрожжей приводят к торможению клеточного деления [157–159].

Сигналы, подобные “destruction box” митотических циклинов, обнаружены и в некоторых других белках. Например, урацилпермеаза дрожжей содержит последовательность RIALGSLTD, сходную с RXALGXIXN циклинов, причем замена Arg на Ala в предполагаемом “destruction box”-фрагменте предотвращает стрессиндуцируемую деградацию фермента [160]. Два “destruction box”-фрагмента были найдены также в белке Cut2, участвующем в сегрегации хроматид; оба фрагмента необходимы для убикитинирования и быстрой деградации Cut2 [161].

Деградация митотических циклинов осуществляется 26S-протеасомой по убикитинзависимому механизму. Для циклинов были открыты специфические убикитинконъюгирующие E2-ферменты [162] и убикитинлигазы (E3), распознающие N-концевые последовательности “destruction box”-фрагментов циклинов [163]. E3-Убикитинлигазы входят в состав 1500-кДа анафазапрототирующего комплекса или циклосомы [163, 164]. Таким образом, для циклинов характерен “классический” путь деградации 26S-протеасомой с участием ферментов, специфически распознающих сигнал “destruction box” [165].

С-Концевые гидрофобные сигналы деградации белков. В самое последнее время было показано, что белки, обладающие короткими неполярными фрагментами в C-концевой части структуры,

нестабильны в клетках *E. coli* и подвергаются гидролизу, участие в котором принимает FtsH-протеиназа [166]. Предполагается, что на первом этапе происходит внутриклеточная модификация белков-мишеней путем присоединения “метки” – сигнальной последовательности, состоящей из 11 а.о. (AANDENYALAA, “destabilizing tail”); и в этом процессе участвует стабильная 10Sa (*ssrA*) РНК [167–169].

Следует отметить, что исследование деградации белков, модифицированных последовательностью AANDENYALAA, позволило обнаружить также единственную известную на настоящее время АТФ-независимую протеиназу, участвующую во внутриклеточной селективной деградации белков – Tsp-протеиназу (tail-specific protease) [170]. Tsp-Протеиназа *E. coli* представляет собой мономерный белок с молекулярной массой 74 кДа; фермент не обнаруживает гомологии ни с одной из известных протеиназ [168]. Исследования с использованием метода сайт-направленного мутагенеза показали, что Tsp-протеиназа предположительно представляет собой сериновую протеиназу, в активном центре которой функционирует каталитическая диада Ser430–Lys455 [171].

Исследование рекомбинантного интерлейкина-6 в клетках *E. coli* [167] позволило выдвинуть предположение о возможной роли Tsp-протеиназы в деградации белков. Было показано, что часть дефектных укороченных молекул интерлейкина содержит на C-конце 11-членный пептид AANDENYALAA (tag), десять аминокислот которого (без N-концевого Ala) кодируются *ssrA*-геном *E. coli*. *ssrA*-Транскрипт (*ssrA*-РНК) представляет собой стабильную мРНК (362 нт), обладающую некоторыми свойствами тРНК, которая может связывать аланин [172]. В работе [173] была высказана гипотеза, согласно которой Tsp-протеиназа участвует в деградации белков, транслирующихся с мРНК, не содержащих стоп-кодонов (потеря стоп-кодона может происходить, например, за счет преждевременной терминации транскрипции или в результате деятельности нуклеаз). В этом случае рибосома не может освободиться от дефектной мРНК, так как ее диссоциация из трансляционного комплекса может происходить только при наличии терминирующего кодона. Было предположено, что освобождение рибосомы происходит с участием *ssrA*-РНК по следующему механизму (рис. 4) [173]: комплекс рибосомы с дефектной мРНК, лишенной стоп-кодона (I), распознается “нагруженной” аланином *ssrA*-РНК, которая связывается в Р-сайте рибосомы (II), аланин с *ssrA*-РНК переносится на C-конец растущей полипептидной цепи с образованием пептидил-*ssrA*-РНК молекулы, и трансляция прекращается с поврежденной мРНК на *ssrA*-РНК (III), к полипептидной цепи котрансляционно присоединяются 10 а.о. (tag), кодируемых *ssrA*-РНК (IV), происходит терминация трансляции на ochre-кодоне

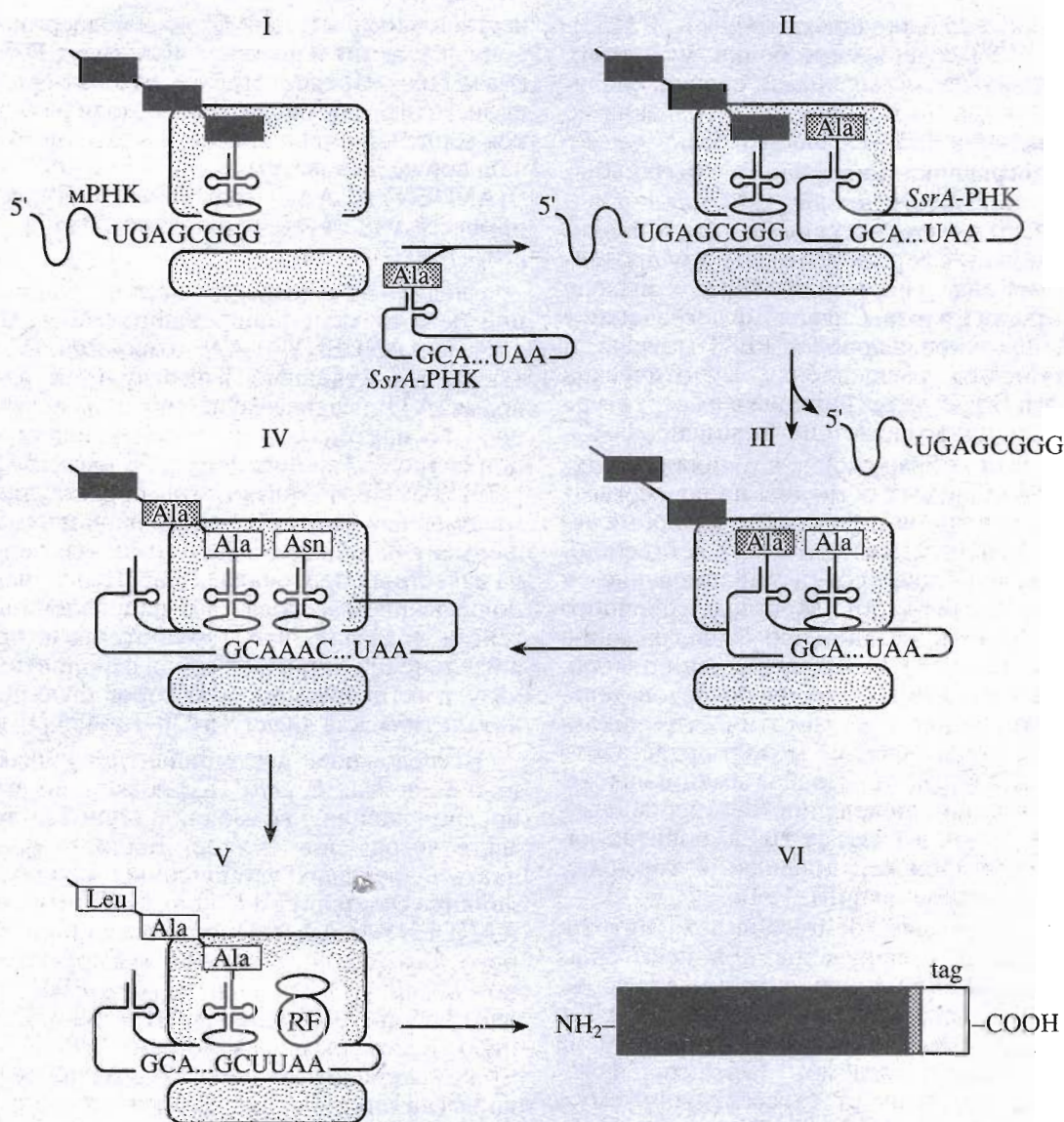


Рис. 4. С-Концевая модификация полипептидов, синтезирующихся с дефектных мРНК, не содержащих терминирующих кодонов [ср. 173]; I–VI – стадии процесса (см. текст).

ssrA-РНК, и рибосома диссоциирует из трансляционного комплекса (V), полученный модифицированный дефектный полипептид (VI) в дальнейшем узнается и подвергается протеолитической деградации Tsp-протеиназой. Можно предположить, что постулированный механизм реализуется и в случае гидролиза, осуществляемого FtsH-протеиназой.

Для проверки этой модели были получены мутантные гены *N*-концевого домена λ -репрессора и цитохрома *b*₅₆₂, содержащие терминатор транскрипции *trpAt* перед стоп-кодонами [22]. Действительно, кодируемые ими белки подвергались быстрому *ssrA*-зависимому протеолизу в клетках *E. coli*.

Недавно обнаружено, что белки, несущие С-концевые короткие неполярные фрагменты

или модифицированные последовательностью AANDENYALAA, подвергаются также расщеплению ClpAP- и ClpXP-протеиназами [174].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Селективный внутриклеточный протеолиз, осуществляемый олигомерными АТФ-зависимыми протеиназами – один из механизмов регуляции содержания белков в клетке. Он особенно важен для тех случаев, когда незначительные вариации содержания активного белка имеют существенное значение для клетки [47]. Поэтому неудивительно, что практически для всех исследованных АТФ-зависимых протеиназ обнаружены специфические эндогенные субстраты-мишени (обычно, белки, выполняющие регуляторные функ-

ции). Несмотря на имеющиеся сведения о специфических сигналах деградации у белков, вопрос о природе селективности действия энергозависимых протеиназ остается открытым. Поскольку в структурах ряда рассмотренных протеиназ наряду с пептидгидролазными и АТФ-азными центрами показано наличие аллостерических центров, лигандами которых и являются эти белки-мишени, можно полагать, что именно аллостерические центры узнают сигналы селективной деградации белков и связываются с соответствующими фрагментами их полипептидной цепи.

На примере функционирования ClpP, пептидгидролазной субъединицы ClpAP-протеиназы, и изолированного протеолитического домена Lon-протеиназы показано, что эти функциональные элементы АТФ-зависимых протеиназ неспособны атаковать белковый субстрат и проявляют только пептидгидролазную активность [175, 176]. Способность полноразмерных ферментов (ClpAP или Lon) гидролизовать белки-мишени может быть следствием либо взаимодействия субстрата с дополнительным центром связывания, локализованным в АТФ-азном фрагменте молекулы фермента (аллостерический или другой центр), либо изменения пространственной структуры молекулы субстрата ("разворачивание"), либо изменения конформации собственно протеолитического центра фермента и перехода его в более активную форму (возможно, одновременно в той или иной мере реализуются все предполагаемые варианты).

В любом случае для гидролиза белковых субстратов АТФ-зависимыми протеиназами необходимо взаимодействие АТФ-азных и протеолитических центров в молекуле фермента. Принимая во внимание олигомерное строение АТФ-зависимых протеиназ, можно предположить, что такое взаимодействие может реализоваться как между активными центрами, принадлежащими одной и той же субъединице, так и при межсубъединичных контактах. Проверка высказанных представлений является одним из дальнейших путей исследований в области выяснения механизмов селективного внутриклеточного протеолиза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldberg A.L., John A.C.S. // *Annu. Rev. Biochem.* 1987. V. 45. P. 747–803.
2. Goldberg A.L. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 203. P. 9–23.
3. Gottesman S. // *Annu. Rev. Genet.* 1996. V. 30. P. 465–506.
4. Maurizi M.R. // *Experientia.* 1992. V. 48. P. 178–201.
5. Ciechanover A., Schwartz A.L. // *FASEB J.* 1994. V. 8. P. 182–191.
6. Pagano M. // *FASEB J.* 1997. V. 11. P. 1067–1075.
7. Tanaka K., Tanahashi N., Tsurumi C., Yokota K.Y., Shimbara N. // *Adv. Immunol.* 1997. V. 64. P. 1–38.

8. Gottesman S., Maurizi M.R. // *Microbiol. Rev.* 1992. V. 56. P. 592–621.
9. Goldberg A.L., Moerschell R.P., Chung C.H., Maurizi M.R. // *Methods Enzymol.* 1994. V. 244. P. 350–375.
10. Gottesman S., Maurizi M.R., Wickner S. // *Cell.* 1997. V. 91. P. 435–438.
11. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. // *Gen. Devel.* 1997. V. 11. P. 815–823.
12. Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L. // *Annu. Rev. Biochem.* 1996. V. 65. P. 801–847.
13. Tanaka K., Ii K., Ichihara A., Waxman L., Goldberg A.L. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 15197–15203.
14. Hilt W., Wolf D.H. // *Trends Biochem. Sci.* 1996. V. 21. P. 96–102.
15. Deshaies R.J. // *Trends Cell. Biol.* 1995. V. 5. P. 428–434.
16. Hicke L. // *FASEB J.* 1997. V. 11. P. 1215–1226.
17. Sommer T., Wolf D.H. // *FASEB J.* 1997. V. 11. P. 1227–1233.
18. Dice F.J. // *FASEB J.* 1987. V. 1. P. 349–357.
19. Gottesman S., Wickner S., Jubete Y., Singh S.K., Kessel M., Maurizi M. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1995. V. 60. P. 533–548.
20. Pickart C.M. // *FASEB J.* 1997. V. 11. P. 1055–1066.
21. Varshavsky A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 12142–12149.
22. Keiler K.C., Waller P.R., Sauer R.T. // *Science.* 1996. V. 271. P. 990–993.
23. Goldberg A.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972. V. 69. P. 422–426.
24. Goldschmidt R. // *Nature.* 1970. V. 228. P. 1151–1154.
25. Bukhari A.I., Zipser D. // *Nat. New. Biol.* 1973. V. 243. P. 238–241.
26. Chung C.H., Goldberg A.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. P. 4931–4935.
27. Charette M.F., Henderson G.W., Markovitz A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. P. 4728–4732.
28. Gayda R.C., Stephens P.E., Hewick R., Schoemaker J.M., Dreyer W.J., Markovitz A. // *J. Bacteriol.* 1985. V. 162. P. 271–275.
29. Murakami K., Voellmy R., Goldberg A.L. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. P. 8194–8200.
30. Goldberg A.L., Swamy K.H.S., Chung C.H., Larimore F. // *Methods Enzymol.* 1982. V. 80. P. 680–702.
31. Америк А.Ю., Антонов В.К., Остроумова Н.И., Ротанова Т.В., Чистякова Л.Г. // *Биоорганическая химия.* 1990. Т. 16. С. 869–881.
32. Ротанова Т.В., Котова С.А., Америк А.Ю., Лыков И.П., Гиномдан Л.М., Антонов В.К. // *Биоорганическая химия.* 1994. Т. 20. С. 114–125.
33. Yoshida M., Amano T. // *FEBS Lett.* 1995. V. 359. P. 1–5.
34. Amerik A.Yu., Antonov V.K., Gorbalenya A.E., Kotova S.A., Rotanova T.V., Schimbarevich E.V. // *FEBS Lett.* 1991. V. 287. P. 211–214.
35. Chung C.H., Goldberg A.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. P. 795–799.
36. Fu G.K., Smith M.J., Markovitz D.M. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 534–538.
37. Mizusawa S., Gottesman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. P. 358–362.

38. Gottesman S., Stout V. // *Mol. Microbiol.* 1991. V. 5. P. 1599–1606.
39. Van Melderen L., Bernard P., Couturier M. // *Mol. Microbiol.* 1994. V. 11. P. 1151–1157.
40. Gronlund H., Gerdes K. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 285. P. 1401–1415.
41. Gottesman S., Gottesman M. // *Cell.* 1981. V. 24. P. 225–233.
42. Ротанова Т.В. // *Биоорганич. химия.* 1999. Т. 25. С. 883–891.
43. Barakat S., Pearce D.A., Sherman F., Rapp W.D. // *Plant Mol. Biol.* 1998. V. 37. P. 141–154.
44. Van Dyck L., Pearce D.A., Sherman F. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 238–242.
45. Wang N., Gottesman S., Willingham M.C., Gottesman M.M., Maurizi M.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 11247–11251.
46. Amerik A.Yu., Petukhova G.V., Grigorenko V.G., Lykov I.P., Yarovoi S.V., Dergousova N.I., Lipkin V.M., Gorbalenya A.E. // *FEBS Lett.* 1994. V. 340. P. 25–28.
47. Gottesman S. // *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli* / Eds E.C.C. Lin, A.S. Lynch. Austin, TX. RG Landers Company, 1996. P. 503–519.
48. Van Melderen L., Gottesman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 6064–6071.
49. Tomoyasu T., Yuki T., Morimura S., Mori H., Yamana-ka K., Niki H., Hiraga S., Ogura T. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. P. 1344–1351.
50. Herman C., Ogura T., Tomoyasu T., Hiraga S., Akiyama Y., Ito K., Thomas R., d'Ari R., Bouloc P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 10851–10865.
51. Akiyama Y., Yoshihisa T., Ito K. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 23485–23490.
52. Tomoyasu T., Yamanaka K., Murata K., Suzaki T., Bouloc P., Kato A., Niki H., Hiraga S., Ogura T. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. P. 1352–1357.
53. Confalonieri F., Duguet M. // *BioEssays.* 1995. V. 17. P. 639–650.
54. Rawlings N.D., Barrett A.J. // *Methods Enzymol.* 1994. V. 244. P. 19–61.
55. Tomoyasu T., Gamer J., Bukau B., Kanemori M., Mori H., Rutman A.J., Oppenheim A.B., Yura T., Yamanaka K., Niki H., Hiraga S., Ogura T. // *EMBO J.* 1995. V. 14. P. 2551–2560.
56. Herman C., Lecat S., d'Ari R., Bouloc P. // *Mol. Microbiol.* 1995. V. 18. P. 247–255.
57. Leffers G.G., Gottesman S. // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 1573–1577.
58. Shotland Y., Koby S., Teff D., Mansur N., Oren D.A., Tatematsu K., Tomoyasu T., Kessel M., Bukau B., Ogura T., Oppenheim A.B. // *Mol. Microbiol.* 1997. V. 24. P. 1303–1310.
59. Herman C., Thevenet D., d'Ari R., Bouloc P. // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. P. 358–363.
60. Akiyama Y., Kihara A., Tokuda H., Ito K. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 31196–31201.
61. Katayama Y., Gottesman S., Pumphrey J., Rudikoff S., Clark W.P., Maurizi M.R. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 15226–15236.
62. Hwang B.J., Park W.J., Chung C.H., Goldberg A.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. P. 5550–5554.
63. Gottesman S., Clark W.P., Maurizi M.R. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 7886–7893.
64. Hwang B.J., Woo K.M., Goldberg A.L., Chung C.H. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 8727–8734.
65. Maurizi M.R., Clark W.P., Katayama Y., Rudikoff S., Pumphrey J., Bowers B., Gottesman S. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 12536–12545.
66. Wang J., Hartling J.A., Flanagan J.M. // *Cell.* 1997. V. 91. P. 447–456.
67. Maurizi M.R. // *Biochem. Soc. Trans.* 1991. V. 19. P. 719–723.
68. Thompson M.W., Maurizi M.R. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 18201–18208.
69. Thompson M.W., Singh S.K., Maurizi M.R. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 18209–18215.
70. Woo K.M., Chung W.J., Ha D.B., Goldberg A.L., Chung C.H. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 2088–2091.
71. Maurizi M.R., Thompson M.W., Singh S.K., Kim S.H. // *Methods Enzymol.* 1994. V. 244. P. 314–331.
72. Aizenman E., Engelberg-Kulka H., Glaser G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 6059–6063.
73. Gottesman S., Clark W.P., de Crecy-Lagard V., Maurizi M.R. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 22618–22626.
74. Schirmer E.C., Glover J.R., Singer M.A., Lindquist S. // *Trends Biochem. Sci.* 1996. V. 21. P. 289–296.
75. Wojtkowiak D., Georgopoulos C., Zylicz M. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 22609–22617.
76. Lehnher H., Yarmolinsky M.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 3274–3277.
77. Schweder T., Lee K.H., Lomovskaya O., Matin A. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 470–476.
78. Rohrwild M., Coux O., Huang H.C., Moerschell R.P., Yoo S.J., Seol J.H., Chung C.H., Goldberg A.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 5808–5813.
79. Chuang S.E., Burland V., Plunkett G. 3d, Daniels D.L., Blattner F.R. // *Gene.* 1993. V. 134. P. 1–6.
80. Lupas A., Zwickl P., Baumeister W. // *Trends Biochem. Sci.* 1994. V. 19. P. 533–534.
81. Yoo S.J., Shim Y.K., Seong I.S., Seol J.H., Kang M.S., Chung C.H. // *FEBS Lett.* 1997. V. 412. P. 57–60.
82. Kanemori M., Nishihara K., Yanagi H., Yura T. // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. P. 7219–7225.
83. Missiakos D., Schwager F., Betton J.M., Georgopoulos C., Raina S. // *EMBO J.* 1996. V. 15. P. 6899–6909.
84. Seol J.H., Yoo S.J., Shin D.H., Shim Y.K., Kang M.S., Goldberg A.L., Chung C.H. // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 247. P. 1143–1150.
85. Huang H., Goldberg A.L. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 21364–21372.
86. Yoo S.J., Seol J.H., Seong I.S., Kang M.S., Chung C.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. V. 238. P. 581–585.
87. Van Melderen L., Thi M.H.D., Lecchi P., Gottesman S., Couturier M., Maurizi M.R. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 27730–27738.
88. Wickner S., Gottesman S., Skowrya D., Hoskins J., McKenney K., Maurizi M.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 12218–12222.
89. Tanaka K., Tanahashi N., Tsurumi C., Yokota K.Y., Shimbara N. // *Adv. Immunol.* 1997. V. 64. P. 1–38.
90. DeMartino G.N., Goldberg A.L. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. P. 3712–3715.

91. Hough R., Pratt G., Rechsteiner M. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 8303–8313.
92. Waxman L., Fagan J.M., Goldberg A.L. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 2451–2457.
93. Grziwa A., Baumeister W., Dahlmann B., Kopp F. // FEBS Lett. 1991. V. 290. P. 186–190.
94. Lowe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W., Huber R. // Science. 1995. V. 268. P. 533–539.
95. Puhler G., Weinkauff S., Bachmann L., Muller S., Engel A., Hegerl R., Baumeister W. // EMBO J. 1992. V. 11. P. 1607–1616.
96. Baumeister W., Dahlmann B., Hegerl R., Kopp F., Kuehn L., Pfeifer G. // FEBS Lett. 1988. V. 241. P. 239–245.
97. Hegerl R., Pfeifer G., Puhler G., Dahlmann B., Baumeister W. // FEBS Lett. 1991. V. 283. P. 117–121.
98. Coux O., Nothwang H.G., Scherrer K., Bergsma-Schutter W., Arnberg A.C., Timminis P.A., Langowski J., Cohen-Addad C. // FEBS Lett. 1992. V. 300. P. 49–55.
99. Dahlmann B., Kopp F., Kuehn L., Hegerl R., Pfeifer G., Baumeister W. // Biomed. Biochim. Acta. 1991. V. 50. P. 465–469.
100. Lupas A., Koster A.J., Baumeister W. // Enzyme Protein. 1993. V. 47. P. 252–273.
101. Ahn J.Y., Hong S.O., Kwak K.B., Kang M.S., Tanaka K., Ichihara A., Ha D.B., Chung C.H. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 15746–15749.
102. Hong S.O., Ahn J.Y., Lee C.S., Kang M.S., Ha D.B., Tanaka K., Chung C.H. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1994. V. 32. P. 723–729.
103. Zwickl P., Kleinz J., Baumeister W. // Nat. Struct. Biol. 1994. V. 1. P. 765–770.
104. Rivett A.J. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 12215–12219.
105. Kisselev A.F., Akopian T.N., Woo K.M., Goldberg A.L. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 3363–3371.
106. Kisselev A.F., Akopian T.N., Castillo V., Goldberg A.L. // Mol. Cell. 1999. V. 4. P. 395–402.
107. Yoshimura T., Kameyama K., Takagi T., Ikai A., Tokunaga F., Koide T., Tanahashi N., Tamura T., Cejka Z., Baumeister W. // J. Struct. Biol. 1993. V. 111. P. 200–211.
108. Fujinami K., Tanahashi N., Tanaka K., Ichihara A., Cejka Z., Baumeister W., Miyawaki M., Sato T., Nakagawa H. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 25905–25910.
109. Rubin D.M., Coux O., Wefes I., Hengartner C., Young R.A., Goldberg A.L., Finley D. // Nature. 1996. V. 379. P. 655–657.
110. Orino E., Tanaka K., Tamura T., Sone S., Ogura T., Ichihara A. // FEBS Lett. 1991. V. 284. P. 206–210.
111. Deveraux Q., Ustrell V., Pickart C., Rechsteiner M. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 7059–7061.
112. Tanahashi N., Tsurumi C., Tamura T., Tanaka K. // Enzyme Protein. 1993. V. 47. P. 241–251.
113. Dahlmann B., Becher B., Sobek A., Ehlers C., Kopp F., Kuehn L. // Enzyme Protein. 1993. V. 47. P. 274–284.
114. Dubiel W., Ferrell K., Rechsteiner M. // Mol. Biol. Rep. 1995. V. 21. P. 27–34.
115. Hochstrasser M. // Annu. Rev. Genet. 1996. V. 30. P. 405–439.
116. Haas A.L., Siepmann T.J. // FASEB J. 1997. V. 11. P. 1257–1268.
117. Sharp P.M., Li W.H. // J. Mol. Evol. 1987. V. 25. P. 58–64.
118. Haas A.L., Warms J.V., Hershko A., Rose I.A. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 2543–2548.
119. Haas A.L., Warms J.V., Rose I.A. // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 4388–4394.
120. Pickart C.M., Rose I.A. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 7903–7910.
121. Chau V., Tobias J.W., Bachmair A., Mariott D., Eckler D.J., Gonda D.K., Varshavsky A. // Science. 1989. V. 243. P. 1576–1583.
122. Hayashi S., Murakami Y. // Biochem. J. 1995. V. 306. P. 1–10.
123. Heller J.S., Fong W.F., Canellakis E.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. P. 1858–1862.
124. Matsufuji S., Matsufuji T., Miyazaki Y., Murakami Y., Atkins J.F., Gesteland R.F., Hayashi S. // Cell. 1995. V. 80. P. 51–60.
125. Bercovich Z., Rosenberg-Hasson Y., Ciechanover A., Kahana C. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 15949–15952.
126. Murakami Y., Tanaka K., Matsufuji S., Miyazaki Y., Hayashi S. // Biochem. J. 1992. V. 283. P. 661–664.
127. Murakami Y., Matsufuji S., Kameji T., Hayashi S., Igarashi K., Tamura T., Tanaka K., Ichihara A. // Nature. 1992. V. 360. P. 597–599.
128. Haas A.L., Rose I.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 6845–6848.
129. Hayashi S., Murakami Y., Matsufuji S. // Trends Biochem. Sci. 1996. V. 21. P. 27–30.
130. Ghoda L., van Daalen Wetters T., Macrae M., Ascherman D., Coffino P. // Science. 1989. V. 243. P. 1493–1495.
131. Bachmair A., Finley D., Varshavsky A. // Science. 1986. V. 234. P. 179–186.
132. Banuett F., Hoyt M.A., McFarlane L., Echols H., Herskovitz I. // J. Mol. Biol. 1986. V. 187. P. 213–224.
133. Shyne-Athwal S., Riccio R.V., Chakraborty G., Ingoglia N.A. // Science. 1986. V. 231. P. 603–605.
134. Varshavsky A. // Cell. 1992. V. 69. P. 725–735.
135. Bachmair A., Varshavsky A. // Cell. 1989. V. 56. P. 1019–1032.
136. Gonda D.K., Bachmair A., Wunning I., Tobias J.W., Lane W.S., Varshavsky A. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 16700–16712.
137. Tobias J.W., Shrader T.E., Rocap G., Varshavsky A. // Science. 1991. V. 254. P. 1374–1377.
138. Bartel B., Wunning I., Varshavsky A. // EMBO J. 1990. V. 9. P. 3179–3189.
139. Hershko A. // Trends Biochem. Sci. 1991. V. 16. P. 265–268.
140. Balzi E., Choder M., Chen W.N., Varshavsky A., Goffeau A. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 7464–7471.
141. Baker R.T., Varshavsky A. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 12065–12074.
142. Grigoryev S., Stewart A.E., Kwon Y.T., Arfin S.M., Bradshaw R.A., Jenkins N.A., Copeland N.G., Varshavsky A. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 28521–28532.
143. Shrader T.E., Tobias J.W., Varshavsky A. // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 4364–4374.
144. Byrd C., Turner G.C., Varshavsky A. // EMBO J. 1998. V. 17. P. 269–277.

145. Solomon V., Baracos V., Sarraf P., Goldberg A.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 12602–12607.
146. Tobery T., Siliciano R.F. // J. Immunol. 1999. V. 162. P. 639–642.
147. Rogers S., Wells R., Rechsteiner M. // Science. 1986. V. 234. P. 364–368.
148. Rechsteiner M., Rogers S.W. // Trends Biochem. Sci. 1996. V. 21. P. 267–271.
149. Rosenberg-Hasson Y., Bercovich Z., Kahana C. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 196. P. 647–651.
150. Tyers M., Tokiwa G., Nash R., Futcher B. // EMBO J. 1992. V. 11. P. 1773–1784.
151. Bai C., Richman R., Elledge S.J. // EMBO J. 1994. V. 13. P. 6087–6098.
152. Kornitzer D., Raboy B., Kulka R.G., Fink G.R. // EMBO J. 1994. V. 13. P. 6021–6030.
153. Lin R., Beauparlant P., Makris C., Meloche S., Hiscott J. // Mol. Cell. Biol. 1996. V. 16. P. 1401–1409.
154. Rechsteiner M. // Semin. Cell. Biol. 1990. V. 1. P. 433–440.
155. Carillo S., Pariat M., Steff A.-M., Jariel-Encontre I., Poulat F., Berta Ph., Piechaczyk M. // Biochem. J. 1996. V. 313. P. 245–251.
156. Glotzer M., Murray A.W., Kirschner M.W. // Nature. 1991. V. 349. P. 132–138.
157. Lorca T., Devault A., Colas P., van Loon A., Fesquet D., Lazaro J.B., Dorce M. // FEBS Lett. 1992. V. 306. P. 90–93.
158. Kobayashi H., Stewart E., Poon R., Adamczewski J.P., Gannon J., Hunt T. // Mol. Biol. Cell. 1992. V. 3. P. 1279–1294.
159. Gallant P., Nigg E.A. // J. Cell Biol. 1992. V. 117. P. 213–224.
160. Galan J.M., Volland C., Urban-Grimal D., Haguenaier-Tsapris R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. V. 201. P. 769–775.
161. Funabiki H., Yamamoto H., Nagao K., Tanaka H., Yasuda H., Hunt T., Yanagida M. // EMBO J. 1997. V. 16. P. 5977–5987.
162. Yu H., King R.W., Peters J.M., Kirschner M.W. // Curr. Biol. 1996. V. 6. P. 455–466.
163. Sudakin V., Ganoth D., Dahan A., Heller H., Hershko J., Luca F.C., Ruderman J.V., Hershko A. // Mol. Biol. Cell. 1995. V. 6. P. 185–197.
164. Page A.M., Hieter P. // Cancer Surv. 1997. V. 29. P. 133–150.
165. Krek W. // Curr. Opin. Genet. Dev. 1998. V. 8. P. 36–42.
166. Herman C., Thevenet D., Bouloc P., Walker G.C., d'Ari R. // Gen. and Develop. 1998. V. 12. P. 1348–1355.
167. Tu G.-F., Reid G.E., Zhang J.-G., Moritz R.L., Simpson R.J. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 9322–9326.
168. Keiler K.C., Silber K.R., Downard K.M., Papayannopoulos I.A., Biemann K., Sauer R.T. // Protein Sci. 1995. V. 4. P. 1507–1515.
169. Bowie J.U., Sauer R.T. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 7596–7602.
170. Silber K.R., Keiler K.C., Sauer R.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 295–299.
171. Keiler K.C., Sauer R.T. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 28864–28868.
172. Komine Y., Kitabatake M., Yokogawa T., Nishikawa K., Inokuchi H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 9223–9227.
173. Keiler K.C., Waller P.R., Sauer R.T. // Science. 1996. V. 271. P. 990–993.
174. Gottesman S., Roche E., Zhou Y., Sauer R.T. // Genes Dev. 1998. V. 12. P. 1338–1347.
175. Maurizi M.R., Clark W.P., Kim S.H., Gottesman S. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 12546–12552.
176. Rasulova F.S., Dergousova N.I., Starkova N.N., Melnikov E.E., Rumsh L.D., Ginodman L.M., Rotanova T.V. // FEBS Lett. 1998. V. 432. P. 179–181.

Intracellular Proteolysis: Signals of Selective Protein Degradation

N. N. Starkova, E. P. Koroleva, and T. V. Rotanova[#]

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Selective proteolysis is one of the mechanisms for the maintenance of cell homeostasis via rapid degradation of defective polypeptides and certain short-lived regulatory proteins. In prokaryotic cells, high-molecular-mass oligomeric ATP-dependent proteases are responsible for selective protein degradation. In eukaryotes, most polypeptides are attacked by the multicatalytic 26S proteasome, and the degradation of the majority of substrates involves their preliminary modification with the protein ubiquitin. The proteins undergoing the selective proteolysis often contain specific degradation signals necessary for their recognition by the corresponding proteases.

Key words: selective proteolysis, ATP-dependent proteases, proteasome, degradation signals

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095)335-4222; e-mail: rotanova@enzyme.siobc.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 2. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.