

ОБЗОРЫ

УДК: 577.152.342*1'134

©Ротанова, Мельников

АТР-ЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ

Т.В. Ротанова, Э.Э. Мельников*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10; тел.: (495)335-42-22; факс: (495)335-71-03; эл. почта: rotanova@enzyme.siocb.ras.ru

Охарактеризованы основные ферментные системы, осуществляющие селективный протеолиз и обеспечивающие сохранность внутриклеточного протеома в организмах бактерий, эукариот и архей. Обсуждаются особенности протеолитических составляющих АТР-зависимых протеиназ, а также сходство и различия их регуляторных компонентов, относящихся к AAA⁺-АТРазам.

Ключевые слова: AAA⁺-белки, АТР-зависимые протеиназы, внутриклеточный протеолиз, протеасомы, прокариоты, эукариоты, археи.

ВВЕДЕНИЕ. Протеолитические ферменты играют ключевую роль в жизненном цикле клеток всех организмов, представляющих три основных эволюционных клеточных домена жизни - бактерии, эукариоты и археи. Протеиназы вовлечены в процессы деградации клеточных белков, сопряженные с контролем факторов транскрипции, процессингом и активацией предшественников, развитием и дифференцировкой клеток, регуляцией клеточного цикла и апоптозом [1-5]. Таким образом, в настоящее время протеиназы рассматриваются не только в качестве деструктивных ферментов, обеспечивающих катаболизм белков и образование пептидов и аминокислот, но, прежде всего, в качестве основных участников регуляторных процессов, отвечающих за сохранность клеточного протеома.

Внутриклеточный селективный гидролиз белков, направленный на поддержание низкого базального уровня регуляторных белков и быстрое удаление мутантных, поврежденных и других опасных для клетки белков, выполняется специфическими ферментами - АТР-зависимыми протеиназами, которые часто называют "наномашинами белковой деструкции". Эти комплексные механоферменты объединяют в своей структуре АТРазные и протеолитические компоненты и относятся к выявленному в 1990-х гг. суперсемейству AAA⁺-белков (АТРаз с альтернативными активностями) [6]. АТРазные компоненты АТР-зависимых, или AAA⁺-протеиназ, осуществляют регуляцию протеолитической активности этих ферментов и участвуют в отборе белковых субстратов-мишеней.

AAA⁺-протеиназы отличаются от классических протеолитических ферментов следующими уникальными характеристиками: (1) *высокой селективностью* взаимодействия с белковыми мишенями *при отсутствии выраженной специфичности* по отношению к аминокислотным остаткам, образующим расщепляемые связи; (2) *сопряжением* протеолитической активности с гидролизом АТР; (3) *процессивным механизмом* деградации белков-субстратов (с образованием 10-15-членных пептидных продуктов без высвобождения высокомолекулярных интермедиатов); (4) *мультисубъединичной* (гомо- или гетероолигомерной) организацией.

* - адресат для переписки

СИСТЕМА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПРОТЕОЛИЗА

Исторически первой обнаруженной энергозависимой протеиназой явилась Lon-протеиназа *Escherichia coli* [7]. К настоящему времени в бактериальных клетках выявлено четыре группы АТФ-зависимых протеиназ: Lon (подсемейство LonA), FtsH, ClpAP/XP и HslUV/CodWX (таблица). Родственные этим ферментам протеиназы обнаружены также в органеллах (митохондриях и хлоропластах) клеток эукариот. Однако основную роль в селективной деградации белков в эукариотах играют крупные мультикаталитические комплексы - 26S-протеасомы [8] (таблица).

Таблица. AAA⁺-протеиназы и протеолитические комплексы, осуществляющие селективный внутриклеточный протеолиз.

Протеиназа или протеолитический комплекс	Субъ- единицы (SE)	A.o., n*	Мол. масса SE, Да (число субъединиц)**	AAA ⁺ -АТФаза		Тип протеолитического активного центра (каталитические остатки)	MEROPS клян	семей- ство
				класс	экстра- домейн***			
В клетках бактерий (<i>Escherichia coli</i>)								
Lon (1A, подсемейство A)	Lon	784	87300 (4, 6, 8, 12?)	II	N	Серин – лизиновая протеиназа (Ser ⁶⁹ , Lys ⁷²)	SJ	S16
FtsH (HIV) (мембраносвязанная)	FtsH	633	70700 (6)	II	N	Zn-зависимая металлопротеиназа (His ⁴⁴ -Glu-Ala-Gly- His ⁴⁸ , Asp ⁶²)	MA	M41
ClpAP/XP	ClpA ClpP	758 207	84200 (12) 21000 (14)	I	N	Сериновая протеиназа (Ser ¹¹¹ , His ¹³⁶ , Asp ¹⁶⁵)	SK	S14
ClpXP	ClpX ClpP	424 207	46200 (12) 21000 (14)	II	N	Сериновая протеиназа (Ser ¹¹¹ , His ¹³⁶ , Asp ¹⁶⁵)	SK	S14
HslUV/ CodWX	HslU HslV	443 176	49600 (12) 19000 (12)	II	I	Треониновая N(α- протеиназа (Thr ¹)	PB	T1B
CodWX (в <i>Bacillus subtilis</i>)	CodX CodW	467 175	52500 (12 или 24) 19500 (12)	II	I	Сериновая N(α- протеиназа (Ser ¹)	PB	T1B
В клетках археобактерий (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>)								
Lon (подсемейство B) (мембраносвязанная)	Lon	621	68300 (?)	II	I	Серин – лизиновая протеиназа (Ser ⁵⁹ , Lys ⁵⁵)	SJ	S16
Протеасома	Рав-комплекс 20S-протеасома		(12, 600 кДа) (28, 700 кДа)	II	N	Треониновая N(α- протеиназа (Thr ¹)	PB	T1A
В клетках эукариот								
26S-протеасома	19S-комплекс 20S-протеасома		(17, 890 кДа) (28, 720 кДа)	II	N	Треониновые N(α- протеиназы (Thr ¹)	PB	T1A

Примечания: * - А.о., n - количество аминокислотных остатков; ** - для протеасом в скобках указана мол. масса комплекса; *** - N - N-концевой экстрадомен, I - вставочный или инсерционный экстрадомен.

Сравнительно недавно были выявлены протеиназы, выполняющие селективную деградацию белков в клетках археобактерий [9]. Оказалось, что основными участниками внутриклеточного протеолиза в археях являются аналоги бактериальных Lon-протеиназ (подсемейство LonB) и эукариотических протеасом (таблица).

Из таблицы видно, что известные АТР-зависимые протеиназы и протеолитические комплексы различаются как по типам их протеолитических активных центров, так и по субъединичному составу и олигомерной организации. АТР-зависимые компоненты обсуждаемых ферментов относятся, как было отмечено выше, к общему суперсемейству AAA⁺-белков. Они характеризуются сходной топологией, имеют ряд общих консенсусных мотивов, хотя в целом их первичные структуры не проявляют высокой гомологии.

1. Общая характеристика AAA⁺-белков.

Суперсемейство AAA⁺-белков, в состав которого входят и АТР-зависимые компоненты энергозависимых протеиназ, представляет специфическую ветвь так называемых Р-петлевых нуклеотидтрифосфатаз [10], гидролизующих β-γ-фосфатную связь в связанном нуклеотиде (АТР или GTP). Основой биохимической активности и биологических функций этих ферментов служит индуцирование конформационных изменений в других молекулах (партнерах или мишенях) за счет энергии реакции гидролиза нуклеотида (конформационное ремоделирование субстрата) [11, 12]. В частности, функционирование AAA⁺-белков опосредуется разворачиванием их белковых мишеней и проявлением, таким образом, шапероновой (или "анфолдазной") активности [13].

Представители AAA⁺-белков характеризуются наличием специфического домена (AAA⁺-модуль) размером ~200-250 аминокислотных остатков (а.о.), который содержит ряд областей высокой консервативности. Подавляющее большинство AAA⁺-белков взаимодействует с функциональными белковыми партнерами, образуя комплексные гетероолигомерные структуры, АТР-зависимые составляющие которых представлены самостоятельными субъединицами [13, 14] (среди АТР-зависимых протеиназ - это ClpAP/XP и HslUV/CodWX, а также протеасомы, таблица). В редких случаях AAA⁺-АТР-аза и ее функциональный компонент локализованы в единой полипептидной цепи (протеиназы Lon и FtsH). AAA⁺-белки, содержащие два AAA⁺-модуля, относятся к классу I (ClpAP-протеиназы в таблице), белки, содержащие один модуль, - к классу II (остальные протеиназы и протеолитические комплексы из таблицы) [15]. Межсубъединичные взаимодействия AAA⁺-модулей приводят к образованию характерных для AAA⁺-белков кольцевых гексамерных, а иногда и гептамерных структур (при наличии в белке двух или более АТР-зависимых модулей каждый из них образует отдельное кольцо).

Собственно AAA⁺-модули сформированы двумя структурными доменами: большим N-концевым нуклеотид-связывающим (α/β-домен или NB-домен) и меньшим С-концевым α-спирализованным (α-домен) (рис. 1) [12, 13, 16, 17]. Наличие α-доменов - важная особенность AAA⁺-белков, отличающая их от других нуклеотид-связывающих белков. В структуре AAA⁺-модулей α-домены располагаются над N-концевыми областями α/β-доменов, прикрывая нуклеотид-связывающие центры [12]. Кроме контактов с собственными α/β-доменами, α-домены образуют контакты с α/β-доменами соседних субъединиц AAA⁺-белков, участвуя тем самым в образовании четвертичной структуры [13, 18].

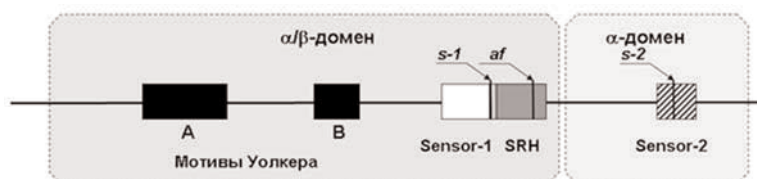


Рисунок 1.

Схема строения AAA⁺-модуля (по [12]).

Показана локализация консервативных фрагментов - мотивов Уолкера A и B, SRH-, sensor-1- и sensor-2-областей, а также остатков sensor-1 (s-1), sensor-2 (s-2) и "аргининовый палец" (af).

В α/β -доменах содержится ряд характеристических областей (рис. 1). К ним относятся мотивы Уолкера А (GXXGXGKT/S, где X - остаток любой аминокислоты) и В (Φ_4 DE, где Φ - остаток гидрофобной аминокислоты), консервативный SRH-фрагмент (или "вторичная область гомологии"), граничащий своей N-концевой частью с фрагментом "sensor-1" с одноименным ключевым остатком (Asn или реже - Thr), в С-концевой части SRH-фрагмента локализован специфический остаток Arg ("аргининовый палец") [11-13, 16, 17]. Другой остаток аргинина ("sensor-2") и окружающий его фрагмент последовательности являются характерными элементами α -доменов (рис. 1). Мотивы Уолкера, а также остатки "sensor-1" и "sensor-2" участвуют в связывании и гидролизе нуклеотидов, а "аргининовый палец" обеспечивает взаимодействие AAA^+ -модуля с α/β -доменом соседней субъединицы. Полагают также, что sensor-2-область может быть непосредственным образом вовлечена в процесс ремоделирования белкового субстрата [13].

Помимо α/β - и α -доменов АТРазных модулей AAA^+ -белки содержат третий структурно независимый домен (экстрадомен), соединяющийся с АТРазным кором через подвижный линкер (рис. 2). Обычно это - либо вариабельный "не-АТРазный" N-концевой домен (N-домен), который предшествует AAA^+ -модулям, либо вставочный домен (I-домен), локализованный внутри α/β -кора [18]. Считается, что экстрадомены могут служить первичной областью узнавания субстрата-мишени, а также играть вспомогательную роль в разворачивании субстрата или контролировать доступ мишеней к связывающим центрам, локализованным внутри AAA^+ -модуля. В последнее время выяснилось, что обеспечение селективности при отборе субстратов AAA^+ -белками зачастую связано с использованием адаптерных белков (рис. 2). Последние участвуют в распознавании мишеней посредством специфического связывания и с мишенью и с AAA^+ -партнерным белком [19]. Большинство адаптеров связываются с N-концевым доменом AAA^+ -белка, тем самым обеспечивая идеальное взаиморасположение AAA^+ -олигомера и "заякоренной" через этот белковый линкер мишени.

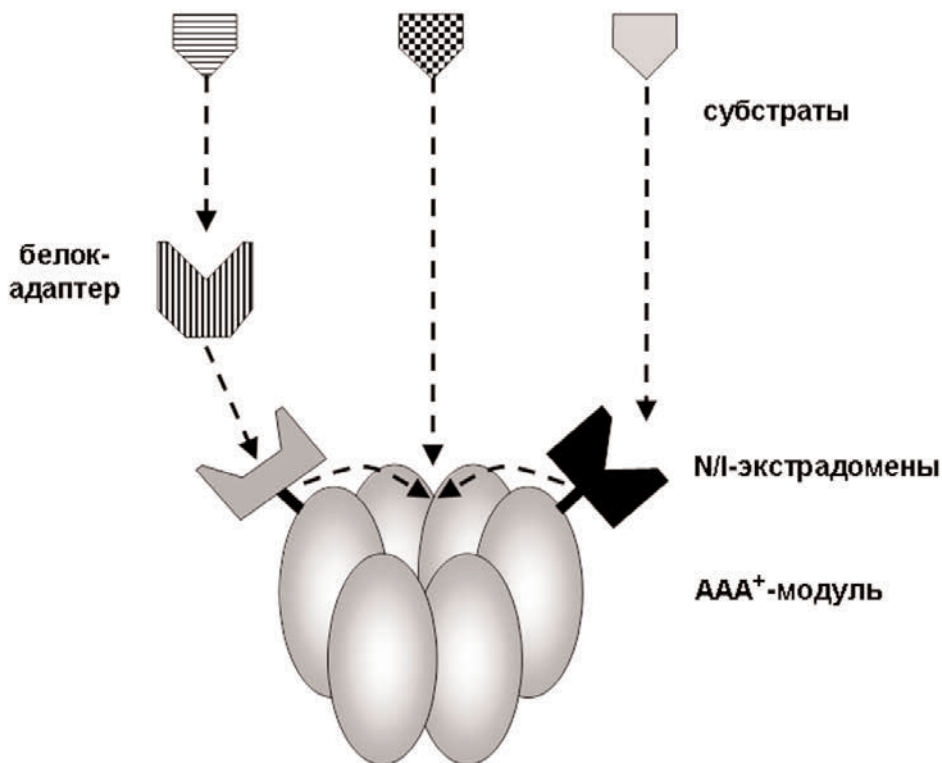


Рисунок 2.

Механизмы связывания субстратов AAA^+ -белками (по [27]).

Показано взаимодействие белка-субстрата с AAA^+ -модулем (центр), с экстрадоменом (справа), с экстрадоменом через адаптерный белок (слева).

При выполнении функции контроля качества AAA⁺-белки отбирают потенциальные мишени с нарушенной структурой из общего пула клеточных белков, в основном правильно фолдированных. Предполагается, что при этом происходит взаимодействие AAA⁺-белка либо с гидрофобными областями, экспонированными на поверхности поврежденных белков [20], либо со специфическими метками (например, с 11-членным пептидом AANDENYALAA (SsrA-tag), способствующим диссоциации укороченного полипептида с рибосомы [21]). Установлено, что основными функциональными мотивами AAA⁺-белков, обеспечивающими связывание ненативных белковых мишеней, являются суперспирализованные сегменты, имеющие антипараллельное строение [22]. Взаимодействие AAA⁺-белков с неповрежденными мишенями происходит путем узнавания в последних специфических сигналов. В AAA⁺-белках обычно заключено несколько центров узнавания мишеней, что приводит к проявлению широкой специфичности в сочетании с высокой селективностью, к осуществлению шапероновой и регуляторной функций.

Этапы разворачивания и транслокации белков-мишеней сопряжены с гидролизом АТР. При этом во время АТРазного цикла кольцевые структуры, образованные AAA⁺-модулями, претерпевают значительные конформационные изменения, приводящие к поворотам колец друг относительно друга, изменению размеров их аксиальных отверстий и т.д. [23]. Таким образом AAA⁺-белки трансформируют энергию связывания и гидролиза АТР в собственные механические движения, которые могут служить источником для развития напряжений в молекулах связанных белков и тем самым приводить к разворачиванию полипептидных цепей, к диссоциации белок-белковых комплексов или механическому движению вдоль определенных путей в клетке. В целом, совокупность AAA⁺-белков можно рассматривать как уникальное суперсемейство механоферментов, сходные конформационные изменения которых приводят к реализации широкого круга различных биологических проявлений [24].

2. АТРазные компоненты AAA⁺-протеиназ.

АТР-зависимые протеиназы и протеолитические комплексы, представленные в таблице, обладают всеми характеристиками AAA⁺-белков. В состав протеиназ и ферментативных комплексов бактерий и архей входят одинаковые АТРазные субъединицы или домены, в то время как регуляторный 19S-комплекс 26S-протеасом эукариот содержит шесть различных AAA⁺-АТРаз, а также большое число некаталитических субъединиц. Общее количество субъединиц энергозависимых протеиназ и протеолитических комплексов варьирует от шести (FtsH) до 62 (26S-протеасома) (таблица). Индивидуальные АТРазные субъединицы ClpA, ClpX и HslU способны функционировать как молекулярные шапероны-анфолдазы [25], и в то же время в комплексе с протеолитическими субъединицами они выполняют роль стимуляторов активности последних [26].

Экстрадомены АТР-зависимых протеиназ относятся к различным типам. Протеиназы семейств ClpAP/XP и FtsH, а также регуляторные нуклеотидазы (Rpt) и гомологичные им Rap-нуклеотидазы протеасом эукариот и архей, соответственно, имеют N-концевые домены размером от 61 (ClpX) до 169 (ClpA) а.о. Протеиназы семейства HslUV/CodWX содержат вставочные экстрадомены, локализованные между мотивами Уолкера и включающие 130-150 остатков. И только в протеиназах семейства Lon представлены оба типа экстрадоменов - N-концевой у ферментов подсемейства LonA и вставочный у ферментов из архей (подсемейство LonB). Следует отметить, что трансмембранные сегменты мембраносвязанных АТР-зависимых протеиназ LonB и FtsH локализованы именно в их экстрадоменах, близких по размеру. Протеиназы подсемейства LonA имеют в своем составе N-концевые домены, содержащие до 500 и более а.о., намного превышающие по размеру N-концевые экстрадомены не только протеиназ других семейств, но и других AAA⁺-белков. Можно полагать, что N-концевые домены LonA-протеиназ состоят из двух фрагментов: один из них (около 100 а.о., непосредственно

примыкающих к AAA⁺-модулю) является аналогом N-концевых экстрадоменов AAA⁺-белков и, возможно, имеет сходное функциональное значение, а другой - протяженный собственно N-концевой фрагмент - служит характеристическим доменом LonA-протеиназ, не имеющим аналогов в структуре других AAA⁺-белков.

Установлено, что роль экстрадоменов АТР-зависимых протеиназ может заключаться в распознавании, связывании и разворачивании белков-мишеней, активации протеолитических составляющих, во взаимодействии с белками-адаптерами или другими белками, важными для функционирования AAA⁺-протеиназ [18, 27-29]. Адаптерные белки влияют на взаимодействие АТР-зависимых составляющих с субстратами и способствуют расширению специфичности AAA⁺-протеиназ [30].

К настоящему времени определены кристаллические структуры АТР-зависимых субъединиц ClpA [31], ClpX [32] и HslU [33-35], а также AAA⁺-модуля FtsH [36, 37] и его комбинации с протеолитическим доменом [38, 39]. Все они аналогично другим исследованным AAA⁺-белкам представляют кольцевые гомогексамеры, несмотря на то, что в растворе олигомерность соответствующего белка может быть значительно понижена.

3. Протеолитические составляющие энергозависимых протеиназ.

Согласно классификации MEROPS [40], протеолитические компоненты АТР-зависимых протеиназ и протеолитических комплексов являются представителями четырех кланов: SJ, SK, MA и PB (таблица). При этом у гомоолигомерных Lon- и FtsH-протеиназ протеолитические составляющие представлены С-концевыми доменами единой полипептидной цепи, а у гетероолигомерных протеиназ семейств ClpAP/XP и HslUV/CodWX, а также у протеасом эукариот и архей - индивидуальными субъединицами (таблица).

Протеолитические домены **Lon-протеиназ** образуют семейство эндопептидаз S16. Lon-протеиназа из *E. coli*, первая обнаруженная энергозависимая протеиназа, была получена в очищенном состоянии в начале 1980 гг. [7, 41, 42], а в 1988 г. была определена ее аминокислотная последовательность [43, 44]. Исследование фермента показало, что в его активном центре функционирует каталитическая диада Ser-Lys [45-47]. Данные рентгеноструктурного анализа протеолитического домена Lon-протеиназы *E. coli* [48] обнаружили уникальность типа его пространственной структуры, что послужило основанием для выделения Lon-протеиназ в самостоятельное структурное семейство, представляющее индивидуальный клан SJ в классификации пептидгидролаз MEROPS.

Сопоставление фрагментов первичных структур Lon-протеиназ из отдаленных источников (рис. 3), позволило выявить два варианта окружения каталитических остатков Ser и Lys активного центра ферментов и, тем самым, разделить семейство Lon на два подсемейства - обширное подсемейство LonA, охватывающее ферменты бактерий и эукариот, и менее представительное подсемейство LonB, включающее ферменты архебактерий [49]. Следует особо подчеркнуть, что разделение семейства Lon на подсемейства, основанное на строении протеолитических доменов, полностью совпало с результатами эволюционно-генетического анализа Lon-протеиназ, основу которого составляло строение АТР-зависимых компонентов ферментов [11, 13]. Таким образом, можно констатировать, что подсемейства LonA и LonB различаются окружением каталитических остатков протеолитического центра, структурной организацией АТР-зависимого домена и общей архитектурой молекулы (наличие N-концевого экстрадомена у LonA-протеиназ и вставочного трансмембранного экстрадомена в AAA⁺-модуле LonB-протеиназ) (рис. 4). Вместе с тем, с помощью рентгеноструктурного анализа обнаружено полное совпадение общей укладки полипептидной цепи протеолитических доменов LonA- и LonB-протеиназ, хотя отмечено некоторое различие во взаимном расположении остатков каталитического центра [48, 50].

	-10	0	+10	
LonA	<i>H</i> Φ <i>H</i> X <i>P</i> <i>X</i> G <i>A</i> <i>X</i> F K D G P S A <i>G</i> <i>X</i> <i>X</i> <i>X</i> <i>X</i> <i>T</i> <i>X</i> ΦΦ S <i>X</i> Φ <i>X</i> <i>X</i> <i>X</i> <i>X</i>			
LonB	<i>X</i> Φ <i>X</i> Φ <i>X</i> <i>Q</i> <i>X</i> <i>Y</i> <i>X</i> <i>X</i> Φ E G D S A <i>S</i> <i>X</i> <i>S</i> <i>X</i> <i>X</i> <i>X</i> <i>X</i> ΦΦ S <i>A</i> Φ <i>X</i> <i>X</i> Φ P Φ			
		★		
	+20	+30	+40	+50
LonA	<i>X</i> <i>X</i> <i>X</i> Φ A M T G E Φ <i>X</i> L <i>X</i> G <i>X</i> Φ <i>X</i> <i>X</i> Φ G G Φ K E K <i>X</i> Φ A <i>A</i> <i>X</i> <i>R</i> <i>X</i> <i>X</i>			
LonB	<i>X</i> Q <i>X</i> Φ A Φ T G <i>S</i> Φ <i>X</i> <i>X</i> <i>X</i> G <i>X</i> Φ <i>X</i> <i>X</i> Φ G G Φ <i>X</i> <i>X</i> K Φ E <i>A</i> Φ <i>X</i> <i>X</i> Φ G			
			★	

Рисунок 3.

Фрагменты последовательностей LonA- и LonB-протеиназ, включающие остатки протеолитических центров (по [49]).

* - каталитически активные остатки серина и лизина; Φ - остатки гидрофобных аминокислот; X - остатки любых аминокислот; жирным шрифтом выделены абсолютно консервативные остатки, курсивом - остатки, консервативность которых превышает 90%.

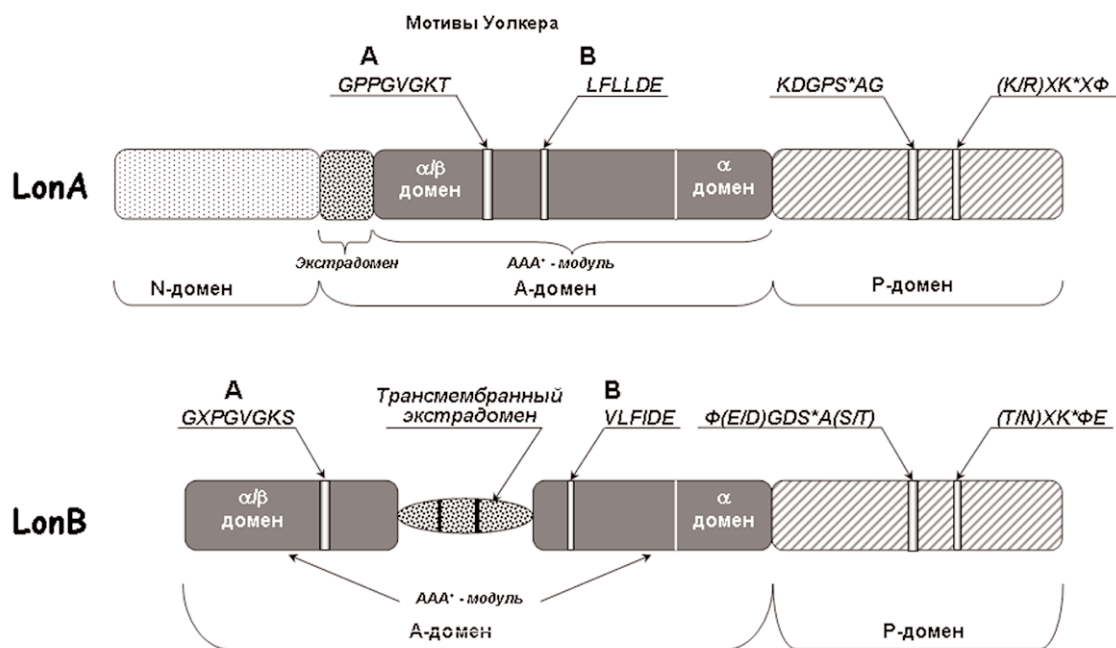


Рисунок 4.

Схема строения LonA и LonB-протеиназ.

Ферменты семейства Lon проявляют свойства как АТР-зависимых процессивных протеиназ, так и активируемых белковыми субстратами АТРаз. Продукт гидролиза АТР - АDP - является ингибитором и АТРазной, и протеолитической активностей ферментов. Lon-протеиназы не проявляют строгой специфичности, хотя преимущественное расщепление субстратов обычно происходит по связям, P1-положение в которых занимают либо небольшие аминокислотные остатки (Ala, Ser, Thr - тип протеолиза, характерный для серин-лизиновых пептидаз), либо гидрофобные аминокислоты (химотрипсиновый тип протеолиза) [51, 52]. Гидролиз пептидных субстратов (число которых весьма ограничено) происходит и в отсутствие нуклеотидов, однако значительно активируется в присутствии АТР [53, 54].

Субстратами Lon-протеиназ кроме поврежденных белков служат ингибитор клеточного деления SulA, регулятор капсулярного синтеза RcsA, белки-антидоты CcdA, RelB и PasA, белки фага λ N, cII и Xis, σ^{32} -субъединица РНК-полимеразы, субъединицы ДНК-полимеразы V UnuD и UmuC и др.

Специфические низкомолекулярные ингибиторы протеолитического центра Lon-протеиназ не известны. Природным ингибитором Lon-протеиназы из *E. coli* служит белок PinA бактериофага T4, присутствие которого снижает эффективность гидролиза белкового субстрата, однако не влияет на деградацию ферментом пептидов [55]. Синтетические ингибиторы Z-Gly-Leu-Phe-CH₂Cl и диизопропилфторфосфат лишь частично угнетают активность фермента [53].

FtsH-протеиназа - единственная мембраносвязанная AAA⁺-протеиназа бактерий, относится к Zn-зависимым металлопротеиназам (клан MA, семейство M41, таблица). Первичная структура фермента из *E. coli* (644 а.о.) опубликована в 1993 г. [56]. В N-концевом экстрадомене фермента локализованы два богатых гидрофобными аминокислотами участка, образующие α -спиральные трансмембранные сегменты TM1 и TM2, с помощью которых FtsH-протеиназа дважды пересекает цитоплазматическую мембрану [57, 58]. В цитоплазматической части молекулы (а.о. 121-644) локализованы AAA⁺-модуль и протеолитический домен (а.о. 394-644), в котором обнаружена характерная для активных центров металлопротеиназ-цинкинов последовательность H⁴¹⁴EAGH⁴¹⁸ с двумя остатками гистидина, взаимодействующими с ионом Zn²⁺, и каталитически активным остатком Glu⁴¹⁵ [59, 60]. До недавнего времени полагали, что третьим лигандом иона Zn²⁺ служит остаток Glu⁴⁷⁶ [57, 61]. Однако, авторы работы [38] установили, что FtsH-протеиназа принадлежит к новому семейству Asp-цинкинов, поскольку во взаимодействие с цинком вовлечен остаток аспарагиновой кислоты (Asp⁴⁹² для FtsH из *E. coli*). Характерной особенностью FtsH является наличие суперспирализованного фрагмента структуры в С-концевой части молекулы [38, 62].

FtsH-протеиназа расщепляет белки, локализованные как в мембране [63], так и в цитозоле [64]. При этом деградация мембранных белков сопровождается их дислокацией из мембраны [65]. Процессивная деградация белка-мишени может осуществляться FtsH-протеиназой как с N-, так и с С-конца [66]. Выявлены некоторые фрагменты, которые могут служить сигналами инициации деградации (дегронами) в белковом субстрате [57], вместе с тем показано, что для ряда природных мишеней FtsH-протеиназы дегронами являются области пониженной термодинамической стабильности [67-69]. Кроме того, получены данные в пользу участия молекулярных шаперонов (в частности, DnaK, DnaJ, GrpE) в презентации белков-мишеней для деградации ферментом [60].

Регулирующее действие на активность FtsH-протеиназы оказывает сIII-пептид бактериофага λ , который по отношению к ферменту проявляет свойства и ингибитора и субстрата [70]. Природным ингибитором FtsH-протеиназы в *B. subtilis* является белок SpoVM [71]. Синтетические ингибиторы для FtsH не описаны.

Ранее предполагалось, что FtsH функционирует как гомоолигомер. В последнее время установлено, что в клетках *E. coli* фермент существует исключительно в виде крупного комплекса с молекулярной массой около 1000 кДа, состоящего из гексамеров FtsH и белков мембранного комплекса HflK-HflC [72]. Объединенный комплекс FtsH/HflK-HflC способен связать несколько молекул белка-мишени. Установлено, что FtsH-протеиназа является единственной АТР-зависимой протеиназой, наличие которой необходимо для жизнеспособности клеток *E. coli*.

Семейство цитозольных **Clp-протеиназ** в клетках *E. coli* представлено двумя гетероолигомерными ферментами - ClpAP и ClpXP [73, 74], имеющими различные АТР-азные субъединицы (ClpA и ClpX) и общую протеолитическую субъединицу (ClpP), относящуюся к классическим сериновым протеиназам (семейство S14 клана SK) (таблица).

Хотя в аминокислотной последовательности ClpP-субъединицы не обнаружены консенсусные фрагменты известных сериновых протеиназ, активный

центр фермента, как оказалось, представлен классической каталитической триадой - Ser111, His136 и Asp185 [75, 76]. Следует заметить, что подобное взаиморасположение каталитических остатков триады в первичной структуре уникально для сериновых пептидгидролаз. Изолированные ClpP-субъединицы не способны гидролизовать белковые субстраты, но обладают пептидазной активностью [77]. При этом субъединицы ClpP ассоциированы в семичленные кольца, а функционирование фермента осуществляется комплексом из двух колец, наложенных друг на друга [76]. Внутренняя полость комплекса способна вместить белок размером более 50 кДа, однако диаметр входных отверстий ClpP (около 10 Å) не позволяет обеспечить доступ к обращенным внутрь полости активным центрам, даже небольшим фолдированным белкам [4]. Таким образом, самоассоциация протеолитических субъединиц приводит к образованию так называемых "компарментов" - бочкообразных структур, содержащих во внутренней полости 14 изолированных от внешней среды активных центров, способных к избирательной деградации только тех белковых молекул, которые могут проникнуть внутрь полости [78].

Гексамерные кольца АТРазных субъединиц (ClpA или ClpX) образуются из смеси нестабильных мономеров и димеров в присутствии АТФ (рис. 5а). Они пристыковываются к одной или к обеим сторонам тетрадекамерной структуры ClpP и регулируют доступ мишеней внутрь протеолитической полости [79]. Формирование комплекса из четырех колец типа $A_6P_7P_7A_6$ или $X_6P_7P_7X_6$ завершает процесс самокомпарментализации, общий для всех гетероолигомерных АТФ-зависимых протеиназ и мультикаталитических комплексов [78]. ClpA (или ClpX) узнают и связывают субстраты через специфические мотивы, локализованные в N- или C-концевой части первичной структуры белка [80], после чего происходит разворачивание мишени и ее транслокация во внутреннюю зону комплекса для последующей деградации [81-83]. Гидролиз белковых мишеней предпочтительно происходит по пептидным связям, образованным карбоксильными группами неполярных аминокислот [84, 85], вместе с тем, известны случаи расщепления связей, образованных полярными или заряженными аминокислотами. Активность ClpP ингибируется добавлением PMSF [86].

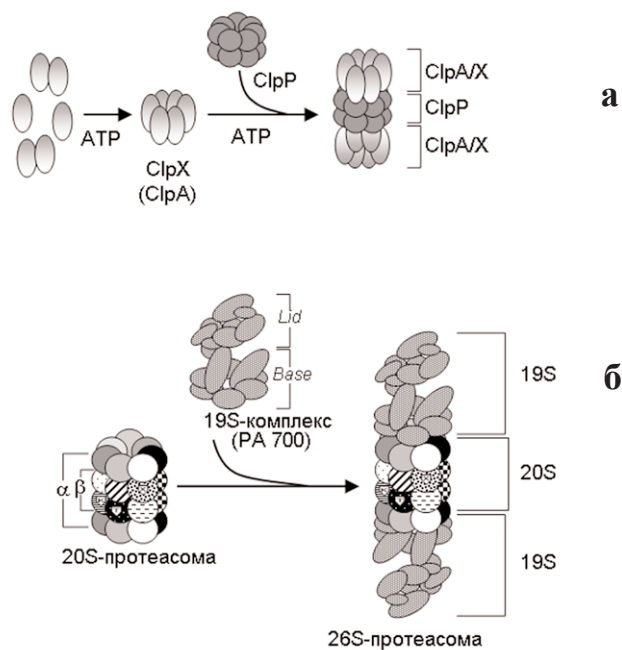


Рисунок 5.

Сборка АТФ-зависимых протеолитических комплексов Clp/Hsl (а, экстрадомены не показаны) и 26S-протеасомы эукариот (б) (по [8, 94, 121 и 123]). К, Т, Х - субъединицы, проявляющие, соответственно, каспазо-, трипсино- и химотрипсиноподобную активности.

Протеолитические субъединицы **HslV** и **CodW** комплексов **HslUV** [87] и **CodWX** [88, 89] принадлежат к недавно открытому классу Ntn (N-terminal nucleophile)-пептидгидролаз, каталитически активными остатками которых являются N-концевые треонин (для HslV) или серин (для CodW), клан PB, семейство T1B в классификации MEROPS (таблица).

Молекулярная архитектура комплекса HslUV аналогична архитектуре комплексов Clp-протеиназ (рис. 5а) с тем отличием, что протеолитические HslV-субъединицы ассоциированы в додекамеры из двух шестичленных колец (V_6V_6), при этом двенадцать каталитически активных остатков Thr¹ также изолированы внутри центральной полости [90]. Самостоятельный додекамер HslV проявляет только пептидазную активность. Гексамерные кольца АТРазного компонента HslU фланкируют додекамер HslV и образуют полноразмерный комплекс HslUV ($U_6V_6V_6U_6$) [91, 92], зачастую рассматривающийся как "малая протеасома", или бактериальный аналог протеасом эукариот. HslUV - единственная гетероолигомерная AAA⁺-протеиназа, для которой определена пространственная структура полноразмерного комплекса [34, 35, 93].

Аналог HslUV из *B. subtilis*, CodWX (образован пептидазным компонентом CodW и АТРазным - CodX), проявляет свойства щелочной протеиназы. Протеолитический кор CodW представляет обычную для Clp- и Hsl-протеиназ структуру и состоит из двух состыкованных гексамерных колец (W_6W_6). Однако АТРазный компонент CodX в отличие от HslU и ClpA/X также формирует цилиндрическую структуру из двух своих гексамерных (или гептамерных) колец (X_6X_6 или X_7X_7). Последняя фланкируется с одной или с обеих сторон двойными кольцами CodW с образованием, соответственно, асимметричных (WWXX) или симметричных частиц (WWXXWW, в этом случае оба внешних кольца представлены протеолитическими компонентами). Следует заметить, что в отличие от других гетероолигомерных протеиназ для образования комплекса CodWX требуется не только связывание АТФ, но и его гидролиз [89]. CodWX может формировать также более сложные комплексы, в которых к симметричной структуре присоединяется двойное кольцо CodX (XX) с образованием гетероолигомера состава WWXXWWXX [89].

Протеолитическим кором **протеасом** архебактерий и эукариот служат **20S-протеасомы** - бочкообразные цилиндрические частицы, состоящие из четырех состыкованных гептамерных колец, формирующих обширную внутреннюю полость [94, 95] (рис. 5б). 28 субъединиц 20S-протеасом (мол. массы от 20 до 35 кДа) относятся к двум типам - α или β . Наружные кольца протеасомы образованы α -субъединицами, а внутренние - β -субъединицами [94, 96, 97], и таким образом архитектуру кора можно представить как $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$. Каталитическими являются β -субъединицы. Как и протеолитические субъединицы "малых протеасом" (HslUV) β -субъединицы 20S-протеасом принадлежат к классу Ntn-пептидгидролаз с каталитически активным N-концевым остатком треонина [98] и относятся к семейству T1A (клан PB) в классификации MEROPS (таблица). Кольца α -субъединиц ограничивают доступ цитоплазматическим белкам клетки во внутреннюю полость комплекса. Кроме того, они инициируют процесс сборки 20S-протеасомы, а также служат местами связывания компонентов регуляторных комплексов, включающих AAA⁺-белки [99].

В большинстве 20S-протеасом архей кольца α - и β -типа образованы одинаковыми субъединицами, вместе с тем известны протеасомы, содержащие три или четыре различающиеся субъединицы [100]. Все 14 β -субъединиц протеасом архей каталитически активны и обладают специфичностью химотрипсинового типа [101, 102].

В отличие от архей эукариоты в своих 20S-протеасомах содержат неповторяющиеся субъединицы: 7 различных α - и 7 различных β -. Кроме того, известно большое количество изоформ 20S-протеасомы. В высших эукариотах наряду с конститутивными обнаружены различные индуцибельные протеасомы [103].

In vitro 20S-протеасома эукариот обладает широким спектром пептидгидролазной активности. При этом кольца β -субъединиц содержат только по три активных центра, локализованных в каталитических субъединицах β_1 , β_2 и β_5 и проявляющих различную первичную специфичность (рис. 5б): каспазо-, трипсино- и химотрипсиноподобную (в модельных пептидах атакуются связи, образованные карбоксильными группами, соответственно, дикарбоновых, положительно заряженных или гидрофобных аминокислот) [104-107]. Каталитически активными остатками всех трех центров являются N-концевые остатки треонина - Thr¹ [98, 106, 107]. Каталитические субъединицы синтезируются в форме предшественников, активация которых происходит по аутокаталитическому механизму. Протеасома осуществляет процессивную деградацию некоторых белковых субстратов с образованием пептидных продуктов размером от 3 до 22 а.о. [108]. Обнаружен феномен аллостерической взаиморегуляции активных центров, обладающих различной специфичностью [109].

Универсального синтетического субстрата 20S-протеасом не существует. Для тестирования различных типов активности применяются защищенные производные пептидов, такие как Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (AMC - 4-метил-7-кумариниламид), Z-Leu-Leu-Glu-NA (NA - β -нафтиламид) и ряд пептидных субстратов трипсина. Природные ингибиторы 20S-протеасом не известны. Из актиномицетов выделены соединения (лактацистин, эпоксимицин и эпонемицин), способные путем взаимодействия с каталитическим остатком треонина блокировать все три типа активности. Для ингибирования химотрипсино- и трипсиноподобной активности протеасом применяются, соответственно, химостатин и лейпептин.

Реализация селективного внутриклеточного протеолиза в цитозоле архей и эукариот осуществляется комплексами 20S-протеасом с фланкирующими их регуляторными комплексами (таблица). В археях это, главным образом, - Pan-комплексы (**P**roteasome-**a**ctivating **n**ucleotidases), которые представляют кольцевые гексамерные АТФазы AAA⁺-типа [110-112]. Другой регуляторный комплекс, VCP, содержит AAA⁺-АТФазы, подобные белку Cdc48 (или p97) [100].

В цитозоле эукариот функционирует так называемая 26S-протеасома - комплекс 20S-протеасомы с активатором PA700 (**P**roteasome **A**ctivator (PA700), иначе - регулятор протеасомы (**RP**) или регуляторный 19S-комплекс) [9, 96, 113] (таблица, рис. 5б). 19S-Комплекс (более 800 кДа) включает 17 различных субъединиц и состоит из двух структурно и функционально различных компонентов, называемых "основанием" (base) и "крышкой" (lid) (рис. 5б) [114]. Надо отметить, что с помощью электронной микроскопии показано структурное подобие Pan-комплекса архей и base-субкомплекса 19S-регулятора [112].

В целом, 26S-протеасома (иначе PA700-20S-PA700 или RP-20S-RP) представляет собой зеркально симметричную структуру типа гантели (рис. 5б), в которой lid-субкомплекс отвечает за распознавание и подготовку субстратов к деградации, а стадии связывания, разворачивания и транслокации субстратов-мишеней внутрь 20S-протеасомы, где и происходит протеолиз, обеспечиваются АТФазными субъединицами base-субкомплекса. Последний играет важнейшую роль в работе 26S-протеасомы; он расположен на границе с 20S-ядром и состоит из двух регуляторных и шести различных АТФазных субъединиц, относящихся к суперсемейству AAA⁺-белков [112, 115]. Кроме взаимодействия с белками-мишенями эти АТФазы участвуют в процессе сборки 26S-протеасомы из 19S- и 20S-компонентов, в активации протеолиза и высвобождении продуктов [9, 96]. Интересно отметить, что AAA⁺-АТФаза Pan-комплекса архей проявляет 41-45% гомологии с каждой из шести АТФаз 19S-комплекса [112].

Другим регулятором 26S-протеасомы может служить комплекс PA28 (или 11S), представляющий гексамерную структуру, образованную двумя родственными белками. Комплекс PA28-20S-PA28 эффективно гидролизует пептиды, но не способен к гидролизу белковых субстратов. Популяция протеасом

в тканях обычно представлена смесью комплексов RP-20S-RP, RP-20S-PA28 и PA28-20S-PA28 [116]. Впервые 26S-протеасомы были выделены в конце 1980-х годов [117-119].

26S-Протеасома эукариот - единственная из известных АТР-зависимых протеолитических систем, функционирование которой включает этап предварительной селективной модификации белков-мишеней, подлежащих деградации, путем ковалентного присоединения убиквитина (Ub) - белка, состоящего из 76 а.о. [120].

Следует отметить, что открытие опосредованной убиквитином деградации белков было удостоено Нобелевской премии по химии 2004 г. Тем самым были отмечены достижения в исследовании селективного внутриклеточного протеолиза, которые привели к пониманию молекулярных основ контроля клеткой таких важнейших биохимических процессов как клеточный цикл, регуляция транскрипции генов, репарация ДНК, иммунная защита, модуляция рецепторов, механизм контроля качества клеточных белков и др.

4. Функционирование АТР-зависимых протеиназ и протеолитических комплексов.

Общий принцип функционирования гетероолигомерных бактериальных протеиназ семейств Clp/Hsl предложен в работе [121] (рис. 6а). Распознавание и связывание белка-мишени осуществляется регуляторным АТР-зависимым компонентом активного мультисубъединичного комплекса фермента. То, что именно АТР-зависимый компонент определяет селективность действия фермента подтверждается тем фактом, что ClpAP и ClpXP, имеющие общий протеолитический компонент, гидролизуют разные внутриклеточные субстраты. На следующем этапе происходит разворачивание молекулы субстрата и транслокация ее в область протеолитических центров, где и происходит процессивное расщепление субстрата с последующим высвобождением продуктов. Образовавшиеся олигопептидные фрагменты могут в дальнейшем гидролизоваться АТР-независимыми протеиназами до ди-, три- и тетрапептидов и, наконец, клеточными аминопептидазами до свободных аминокислот.

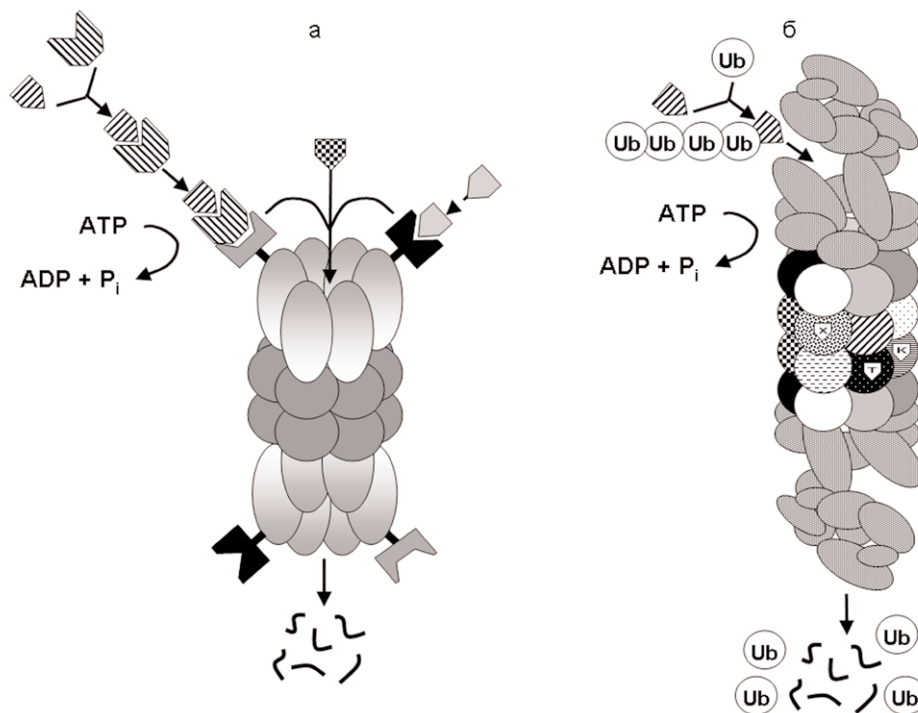


Рисунок 6.

Общность механизмов деградации белков в прокариотах (а) и в эукариотах (б) (по [113 и 121]).

Аналогичный механизм функционирования протеолитического комплекса постулируют для гомоолигомерных Lon- и FtsH-протеиназ [4, 57]. Для FtsH-протеиназы предполагают, что начальная стадия узнавания растворимого субстрата заключается в связывании его на наружной поверхности α -домена AAA^+ -модуля фермента. Ряд последующих стадий приводит к проникновению субстрата в гексамерную полость через входное отверстие, локализованное в N-концевой части АТРазного домена [122], и деградации внутри полости с последующим высвобождением продуктов гидролиза. Существует мнение, что в связывании субстрата может принимать участие также консервативная суперспирализованная область С-концевого сегмента FtsH [57]. Подобный способ взаимодействия с ферментом постулируют и для мембранных белков-мишеней при условии, что они имеют обращённый в цитозоль фрагмент последовательности размером около 20 а.о. Вместе с тем, предполагают, что в начальном узнавании мембранных мишеней участвуют также белки комплекса HflKC.

Следует отметить, что при всей неоднозначности представлений о начальных этапах взаимодействия белков-мишеней с АТР-зависимыми протеиназами, механизм проникновения субстратов во внутреннюю полость комплекса через консервативный вход-пору в настоящее время считается общим для "наномашин", осуществляющих дезагрегацию и деградацию белков в клетках [57].

Схема функционирования системы внутриклеточной деградации белков у эукариот представлена на рисунке 7 [123-125]. Здесь следует особо подчеркнуть, что только у эукариот узнавание белков-мишеней, подлежащих деградации, осуществляется компонентом, не принадлежащим протеолитическому комплексу. Первые четыре стадии процесса, которые служат для обеспечения специфического мечения мишеней путем ковалентного присоединения убиквитина, не имеют аналогии в клетках бактерий или архей. Иницирующим этапом (1) является АТР-зависимая активация убиквитина, которая сопровождается высвобождением неорганического пирофосфата, происходит по механизму переноса аденилата с участием в качестве промежуточного соединения аденилата убиквитина и завершается образованием тиоэфирной связи между активным остатком цистеина фермента E_1 (убиквитин-активирующий фермент, Ubiquitin Activating Enzyme, Uba) и С-концевым остатком глицина-76 молекулы убиквитина [126, 127]. На второй стадии (2) происходит перенос активированного убиквитина на тиоловую группу убиквитин-переносящего (или -конъюгирующего, Ubiquitin Conjugating Enzyme, Ubc) фермента E_2 . Последний служит донором метки как для третьей стадии (3), на которой под действием убиквитин-протеин-лигаз E_3 (Ubiquitin-Protein Ligase или Ubiquitin Recognition Factor, Ubr) образуется изопептидная связь между остатком глицина-76 убиквитина и ϵ -аминогруппой внутреннего остатка лизина белка-мишени, так и для последующего наращивания (стадия 4) полиубиквитиновой цепи (не менее четырех звеньев) путем связывания каждой последующей молекулы убиквитина с ϵ -аминогруппой остатка Lys48 предыдущей [123, 128].

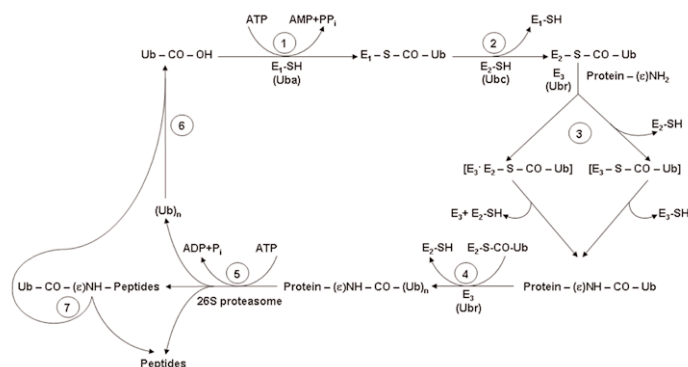


Рисунок 7.

Схема функционирования системы внутриклеточной деградации белков у эукариот (по данным работы [123]).

Высокая специфичность и селективность системы деградации внутриклеточных белков у эукариот достигается за счет ее иерархичности. Обычно клетки содержат только один убиквитин-активирующий фермент (E_1) и ряд убиквитин-переносящих ферментов (E_2), каждый из которых участвует в определенном клеточном процессе [123, 129]. Количество же E_3 -лигаз, принадлежащих к нескольким различным типам, исчисляется сотнями, что является следствием огромного разнообразия мишеней, подлежащих протеолизу. E_3 -лигазы распознают белковые субстраты, несущие деградационные сигналы (дегроны), связывают их либо напрямую, либо через вспомогательный белок-адаптер и осуществляют убиквитилирование по одному из двух механизмов, представленных на стадии 3 (рис. 7) [123]. Таким образом, именно E_3 -лигазы готовят белки-мишени к встрече с "деградирующей машиной" - 26S-протеасомой, регуляторный 19S-комплекс которой распознает универсальную метку на мишени и осуществляет связывание белка-субстрата, то есть 26S-протеасома деградирует меченые убиквитином белки независимо от природы последних, а высокая селективность внутриклеточного протеолиза обеспечивается именно функционированием E_3 -лигаз.

Гидролиз убиквитинилированных субстратов 26S-протеасомой (рис. 7, стадия 5) происходит аналогично гидролизу белков-мишеней бактериальными АТР-зависимыми протеиназами (рис. 6б). Он включает стадию разворачивания мишени, протекает по процессивному механизму и завершается образованием свободных пептидов, пептидов, конъюгированных с убиквитином, а также полиубиквитиновых цепей. Продукты последних двух типов подвергаются деградации изопептидазами (стадии 6 и 7) с образованием свободного убиквитина, пригодного для повторного использования [120, 130, 131]. Интересно отметить, что обнаружены также корректирующие изопептидазы, которые отщепляют метку от "неправильно" убиквитиленных белков и тем самым ограждают их от деградации 26S-протеасомой [123].

В археях, как было упомянуто выше, убиквитиновый путь мечения белков-мишеней селективного протеолиза протеасомами отсутствует. По аналогии с Clp-протеиназами считается, что регуляторные Pap-комплексы протеасом архей распознают и связывают белки-мишени посредством суперспирализованных фрагментов N-концевых экстрадоменов, после чего происходит активация гидролиза АТР, промотирование разворачивания субстрата и раскрытие аксиального отверстия в протеолитическом комплексе. Однако, механизмы этих процессов еще не установлены. Считают, что в них могут принимать участие некоторые адаптерные белки [100]. Последующая деградация белков-субстратов происходит, по-видимому, согласно общим для АТР-зависимых протеиназ прокариот и 26S-протеасом эукариот закономерностям (рис. 6). Исследования в этом направлении интенсивно развиваются. В частности, недавно с высоким разрешением определена кристаллическая структура комплекса 20S-протеасома-Pap [132].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Суммируя представленные материалы, можно констатировать, что несмотря на отсутствие подобия первичных последовательностей, сходства третичных структур и механизмов функционирования протеолитических центров, гетероолигомерные протеиназы и протеолитические комплексы, осуществляющие селективный внутриклеточный протеолиз, объединены общей архитектурой: (1) их протеолитические субъединицы ассоциированы в состыкованные олигомерные кольца, представляющие бочкообразные комплексы; (2) доступ к протеолитическим центрам, локализованным внутри центральной полости, возможен только через узкие аксиальные отверстия; (3) регуляторные компоненты, содержащие AAA^+ -АТРазы, контактируют с дистальными поверхностями протеолитического кора. Обнаруженное структурное сходство позволяет предполагать сходство в основных биохимических механизмах, посредством которых эти гетероолигомерные комплексы связывают, разворачивают и переносят белковые субстраты к протеолитическим активным центрам. Что касается

гомоолигомерных энергозависимых протеиназ, то вопросы архитектуры их функциональных комплексов и механизмов функционирования требуют дополнительного исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 05-04-48383).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Goldberg A.L.* (1992) *Eur. J. Biochem.*, **203**, 9-23.
2. *Pahl H.L., Baeuerle P.A.* (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 340-347.
3. *Martoglio B.* (1999) *Protoplasma*, **207**, 141-146.
4. *Gottesman S.* (2003) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 565-587.
5. *King R.W., Deshaies R.J., Peters J.M., Kirschner M.W.* (1996) *Science*, **274**, 1652-1659.
6. *Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V.* (1999) *Genome Res.*, **9**, 27-43.
7. *Swamy K.S., Goldberg A.L.* (1981) *Nature*, **292**, 652-654.
8. *Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L.* (1996) *Ann. Rev. Biochem.*, **65**, 801-847.
9. *Maupin-Furlow J.A., Wilson H.L., Kaczowka S.J., Ou M.S.* (2000) *Front. Biosci.*, **5**, D837-D865.
10. *Erdmann R., Wiebel F.F., Flessau A., Rytka J., Beyer A., Frohlich K.U., Kunau W.H.* (1991) *Cell*, **64**, 499-510.
11. *Iyer L.M., Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L.* (2004) *J. Struct. Biol.*, **146**, 11-31.
12. *Hanson Ph.I., Whiteheart S.W.* (2005) *Mol. Cell Biol.*, **6**, 519-529.
13. *Lupas A.N., Martin J.* (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 746-753.
14. *Frickey T., Lupas A.N.* (2004) *J. Struct. Biol.*, **146**, 2-10.
15. *Schirmer E.C., Glover J.R., Singer M.A., Lindquist S.* (1996) *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 289-296.
16. *Erzberger J.P., Berger J.M.* (2006) *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **35**, 93-114.
17. *Tucker P.A., Sallai L.* (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**, 641-652.
18. *Singh S.K., Rozycki J., Ortega J., Ishikawa T., Lo J., Steven A.C., Maurizi M.R.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 29420-29429.
19. *Dougan D.A., Mogk A., Zeth K., Turgay K., Bukau B.* (2002) *FEBS Lett.*, **529**, 6-10.
20. *Tomoyasu T., Mogk A., Langen H., Goloubinoff P., Bukau B.* (2001) *Mol. Microbiol.*, **40**, 397-413.
21. *Keiler K.C., Waller P.R., Sauer R.T.* (1996) *Science*, **271**, 990-993.
22. *Martin J., Gruber M., Lupas A.N.* (2004) *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 455-458.
23. *Rouiller I., DeLaBarre B., May A.P., Weis W.I., Brunger A.T., Milligan R.A., Wilson-Kubalek E.M.* (2002) *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 950-957.
24. *Vale R.D.* (2000) *J. Cell Biol.*, **150**, F13-F19.
25. *Singh S.K., Grimaud R., Hoskins J.R., Wickner S., Maurizi M.R.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8898-8903.
26. *Seol J.H., Yoo S.J., Shin D.H., Shim Y.K., Kang M.S., Goldberg A.L., Chung C.H.* (1997) *Eur. J. Biochem.*, **247**, 1143-1150.
27. *Mogk A., Dougan D., Weibezahn J., Schlieker C., Turgay K., Bukau B.* (2004) *J. Struct. Biol.*, **146**, 90-98.
28. *Hinnerwisch J., Reid B.G., Fenton W.A., Horwich A.L.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 40838-40844.
29. *Wojtyra U.A., Thibault G., Tuite A., Houry W.A.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 48981-48990.
30. *Flynn J.M., Neher S.B., Kim Y.I., Sauer R.T., Baker T.A.* (2003) *Mol. Cell*, **11**, 671-683.
31. *Guo F., Maurizi M.R., Esser L., Xia D.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 46743-46752.
32. *Kim D.Y., Kim K.K.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 50664-50670.

33. Sousa M.C., Trame C.B., Tsuruta H., Wilbanks S.M., Reddy V.S., McKay D.B. (2000) *Cell*, **103**, 633-643.
34. Bochtler M., Hartmann C., Song H.K., Bourenkov G.P., Bartunik H.D., Huber R. (2000) *Nature*, **403**, 800-805.
35. Wang J., Song J.J., Franklin M.C., Kamtekar S., Im Y.J., Rho S.H., Seong I.S., Lee C.S., Chung C.H., Eom S.H. (2001) *Structure (Camb)*, **9**, 177-184.
36. Krzywda S., Brzozowski A.M., Verma C., Karata K., Ogura T., Wilkinson A.J. (2002) *Structure (Camb)*, **10**, 1073-1083.
37. Niwa H., Tsuchiya D., Makyio H., Yoshida M., Morikawa K. (2002) *Structure (Camb)*, **10**, 1415-1423.
38. Bieniossek C., Schalch T., Bumann M., Meister M., Meier R., Baumann U. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3066-3071.
39. Suno R., Niwa H., Tsuchiya D., Zhang X., Yoshida M., Morikawa K. (2006) *Mol. Cell*, **22**, 575-585.
40. Barrett A.J., Rawlings N.D., O'Brien E.A. (2001) *J. Struct. Biol.*, **134**, 95-102.
41. Chung C.H., Goldberg A.L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4931-4935.
42. Charette M.F., Henderson G.W., Markovitz A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4728-4732.
43. Америк А.Ю., Чистякова Л.Г., Остроумова Н.И., Гуревич А.И., Антонов В.К. (1988) *Биоорган. химия*, **14**, 408-411.
44. Америк А.Ю., Антонов В.К., Остроумова Н.И., Ротанова Т.В., Чистякова Л.Г. (1990) *Биоорган. химия*, **16**, 869-880.
45. Amerik A.Yu., Antonov V.K., Gorbalenya A.E., Kotova S.A., Rotanova T.V., Shimbarevich E.V. (1991) *FEBS Lett.*, **287**, 211-214.
46. Ротанова Т.В. (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 541-552.
47. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э., Цирюльников К.Б. (2003) *Биоорган. химия*, **29**, 97-99.
48. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Tropea J., Khalatova A.G., Rasulova F.S., Dauter Z., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Wlodawer A., Gustchina A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 8140-8148.
49. Rotanova T.V., Melnikov E.E., Khalatova A.G., Makhovskaya O.V., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 4865-4871.
50. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Kozlov S., Makhovskaya O.V., Tropea J., Gustchina A., Rotanova T.V., Wlodawer A. (2005) *J. Mol. Biol.*, **351**, 144-157.
51. Chung C.H., Goldberg A.L. (2004) *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F., eds.), p. 1998-2002.
52. Nishii W., Maruyama T., Matsuoka R., Muramatsu T., Takahashi K. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 451-457.
53. Waxman L., Goldberg A.L. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 12022-12028.
54. Thomas-Wohlever J., Lee I. (2002) *Biochemistry*, **41**, 9418-9425.
55. Hilliard J.J., Simon L.D., Van Melder L., Maurizi M.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 524-527.
56. Tomoyasu T., Yuki T., Morimura S., Mori H., Yamanaka K., Niki H., Hiraga S., Ogura T. (1993) *J. Bacteriol.*, **175**, 1344-1351.
57. Ito K., Akiyama Y. (2005) *Ann. Rev. Microbiol.*, **59**, 211-231.
58. Akiyama Y., Yoshihisa T., Ito K. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 23485-23490.
59. Herman C., Lecat S., D'Ari R., Boulloc P. (1995) *Mol. Microbiol.*, **18**, 247-255.
60. 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. (1995) *EMBO J.*, **14**, 2551-2560.
61. Saikawa N., Ito K., Akiyama Y. (2002) *Biochemistry*, **41**, 1861-1868.
62. Shotland Y., Teff D., Koby S., Kobiler O., Oppenheim A.B. (2000) *J. Mol. Biol.*, **299**, 953-964.
63. Akiyama Y., Kihara A., Tokuda H., Ito K. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 31196-31201.
64. Tomoyasu T., Yamanaka K., Murata K., Suzuki T., Boulloc P., Kato A., Niki H., Hiraga S., Ogura T. (1993) *J. Bacteriol.*, **175**, 1352-1357.

65. Kihara A., Akiyama Y., Ito K. (1999) EMBO J., **18**, 2970-2981.
66. Chiba S., Akiyama Y., Ito K. (2002) J. Bacteriol., **184**, 4775-4782.
67. Kanemori M., Yanagi H., Yura T. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 22002-22007.
68. Rist W., Jorgensen T.J., Roepstorff P., Bukau B., Mayer M.P. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 51415-51421.
69. Okuno T., Yamada-Inagawa T., Karata K., Yamanaka K., Ogura T. (2004) J. Struct. Biol., **146**, 148-154.
70. Herman C., Thevenet D., D'Ari R., Boulloc P. (1997) J. Bacteriol., **179**, 358-363.
71. Prajapati R.S., Ogura T., Cutting S.M. (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1475**, 353-359.
72. Saikawa N., Akiyama Y., Ito K. (2004) J. Struct. Biol., **146**, 123-129.
73. Hwang B.J., Woo K.M., Goldberg A.L., Chung C.H. (1988) J. Biol. Chem., **263**, 8727-8734.
74. Gottesman S., Clark W.P., de Crecy-Lagard V., Maurizi M.R. (1993) J. Biol. Chem., **268**, 22618-22626.
75. Maurizi M.R., Clark W.P., Kim S.H., Gottesman S. (1990) J. Biol. Chem., **265**, 12546-12552.
76. Wang J., Hartling J.A., Flanagan J.M. (1998) J. Struct. Biol., **124**, 151-163.
77. Maurizi M.R., Thompson M.W., Singh S.K., Kim S.H. (1994) Meth. Enzymol., **244**, 314-331.
78. Lupas A., Flanagan J.M., Tamura T., Baumeister W. (1997) Trends Biochem. Sci., **22**, 399-404.
79. Beuron F., Maurizi M.R., Belnap D.M., Kocsis E., Booy F.P., Kessel M., Steven A.C. (1998) J. Struct. Biol., **123**, 248-259.
80. Levchenko I., Smith C.K., Walsh N.P., Sauer R.T., Baker T.A. (1997) Cell, **91**, 939-947.
81. Ortega J., Singh S.K., Ishikawa T., Maurizi M.R., Steven A.C. (2000) Mol. Cell, **6**, 1515-1521.
82. Lee C., Schwartz M.P., Prakash S., Iwakura M., Matouschek A. (2001) Mol. Cell, **7**, 627-637.
83. Reid B.G., Fenton W.A., Homwich A.L., Weber-Ban E.U. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 3768-3772.
84. Thompson M.W., Maurizi M.R. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 18201-18208.
85. Arribas J., Castano J.G. (1993) J. Biol. Chem., **268**, 21165-21171.
86. Halperin T., Ostersetzer O., Adam Z. (1999) Planta, **213**, 614-619.
87. Rohrwild M., Coux O., Huang H.C., Moerschell R.P., Yoo S.J., Seol J.H., Chung C.H., Goldberg A.L. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 5808-5813.
88. Kang M.S., Lim B.K., Seong I.S., Seol J.H., Tanahashi N., Tanaka K., Chung C.H. (2001) EMBO J., **20**, 734-742.
89. Kang M.S., Kim S.R., Kwack P., Lim B.K., Ahn S.W., Rho Y.M., Seong I.S., Park S.C., Eom S.H., Cheong G.W., Chung C.H. (2003) EMBO J., **22**, 2893-2902.
90. Yoo S.J., Shim Y.K., Seong I.S., Seol J.H., Kang M.S., Chung C.H. (1997) FEBS Lett., **412**, 57-60.
91. Rohrwild M., Pfeifer G., Santarius U., Muller S.A., Huang H.C., Engel A., Baumeister W., Goldberg A.L. (1997) Nat. Struct. Biol., **4**, 133-139.
92. Yoo S.J., Seol J.H., Seong I.S., Kang M.S., Chung C.H. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun., **238**, 581-585.
93. Sousa M.C., Kessler B.M., Overkleeft H.S., McKay D.B. (2002) J. Mol. Biol., **318**, 779-785.
94. Lowe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W., Huber R. (1995) Science, **268**, 533-539.
95. Groll M., Brandstetter H., Bartunik H., Bourenkow G., Huber R. (2003) J. Mol. Biol., **327**, 75-83.
96. Pickart C.M. (1997) FASEB J., **11**, 1055-1066.
97. Grziwa A., Baumeister W., Dahlmann B., Kopp F. (1991) FEBS Lett., **290**, 186-190.

98. Seemuller E., Lupas A., Stock D., Lowe J., Huber R., Baumeister W. (1995) *Science*, **268**, 579-582.
99. Groll M., Huber R. (2003) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **35**, 606-616.
100. Maupin-Furlow J.A., Gil M.A., Karadzic I.M., Kirkland P.A., Reuter C.J. (2004) *Front. Biosci.*, **9**, 1743-1758.
101. Kisselev A.F., Songyang Z., Goldberg A.L. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 14831-14837.
102. Zwickl P., Seemuller E., Kapelari B., Baumeister W. (2001) *Adv. Protein Chem.*, **59**, 187-222.
103. Claverol S., Burlet-Schiltz O., Girbal-Neuhausser E., Gairin J.E., Monsarrat B. (2002) *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 567-578.
104. Groll M., Ditzel L., Lowe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R. (1997) *Nature*, **386**, 463-471.
105. Orlowski M. (1990) *Biochemistry*, **29**, 10289-10297.
106. Heinemeyer W., Fischer M., Krimmer T., Stachon U., Wolf D.H. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 25200-25209.
107. Arendt C.S., Hochstrasser M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7156-7161.
108. Kisselev A.F., Akopian T.N., Woo K.M., Goldberg A.L. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 3363-3371.
109. Kisselev A.F., Akopian T.N., Castillo V., Goldberg A.L. (1999) *Mol. Cell*, **4**, 395-402.
110. Zwickl P., Ng D., Woo K.M., Klenk H.P., Goldberg A.L. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 26008-26014.
111. Wilson H.L., Ou M.S., Aldrich H.C., Maupin-Furlow J. (2000) *J. Bacteriol.*, **182**, 1680-1692.
112. Smith D.M., Benaroudj N., Goldberg A. (2006) *J. Struct. Biol.*, **156**, 72-83.
113. Mogk A., Schmidt R., Bukau B. (2007) *Trends Cell. Biol.*, **17**, 165-172.
114. Orino E., Tanaka K., Tamura T., Sone S., Ogura T., Ichihara A. (1991) *FEBS Lett.*, **284**, 206-210.
115. DeMartino G.N., Moomaw C.R., Zagnitko O.P., Proske R.J., Chu-Ping M., Afendis S.J., Swaffield J.C., Slaughter C.A. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 20878-20884.
116. Wollenberg K., Swaffield J.C. (2001) *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 962-974.
117. Waxman L., Fagan J.M., Goldberg A.L. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 2451-2457.
118. Hough R., Pratt G., Rechsteiner M. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 8303-8313.
119. Eytan E., Ganoth D., Armon T., Hershko A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7751-7755.
120. Hochstrasser M. (1996) *Ann. Rev. Genet.*, **30**, 405-439.
121. Gottesman S., Maurizi M.R., Wickner S. (1997) *Cell*, **91**, 435-438.
122. Yamada-Inagawa T., Okuno T., Karata K., Yamanaka K., Ogura T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 50182-50187.
123. Hershko A., Ciechanover A. (1998) *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425-479.
124. Lee D.H., Goldberg A.L. (1998) *Trends Cell. Biol.*, **8**, 397-403.
125. Ротанова Т.В., Абрамова Е.Б., Шарова Н.П. (2005) *Биол. мембраны*, **22**, 151-156.
126. Ciechanover A., Heller H., Katz-Etzion R., Hershko A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **782**, 761-765.
127. Hershko A., Ciechanover A., Rose I.A. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 1525-1528.
128. Chau V., Tobias J.W., Bachmair A., Marriott D., Ecker D.J., Gonda D.K., Varshavsky A. (1989) *Science*, **243**, 1576-1583.
129. Pickart C.M., Rose I.A. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 1573-1581.
130. Hadari T., Warms J.V., Rose I.A., Hershko A. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 719-727.
131. Voges D., Zwickl P., Baumeister W. (1999) *Ann. Rev. Biochem.*, **68**, 1015-1068.
132. Forster A., Masters E.I., Whitby F.G., Robinson H., Hill C.P. (2005) *Mol. Cell*, **18**, 589-599.

Поступила: 07. 02. 2007.

**ATP-DEPENDENT PROTEASES AND PROTEOLYTIC COMPLEXES INVOLVED INTO
INTRACELLULAR PROTEIN DEGRADATION**

T.V. Rotanova, E.E. Melnikov

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia; tel.: (495)335-42-22; fax: (495)335-71-03;
e-mail: rotanova@enzyme.siocb.ras.ru

The review characterized the main enzymatic systems of selective proteolysis responsible for maintenance of intracellular proteome in prokaryotes, eukaryotes and archaea. The features of proteolytic components of the ATP-dependent proteases as well as similarity and diversity of their regulatory AAA⁺-ATPases are discussed.

Key words: AAA⁺ proteins, ATP-dependent proteases, selective proteolysis, proteasome, prokaryotes, eukaryotes, archaea.