

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПРОТЕИНАЗ.

ОБЗОРЫ

УДК161.33-616.348.002/541.64

© Т.В.Ротанова

ЭНЕРГОЗАВИСИМЫЙ СЕЛЕКТИВНЫЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ПРОТЕОЛИЗ. СТРОЕНИЕ, АКТИВНЫЕ ЦЕНТРЫ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ АТР- ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНАЗ.

Т.В. РОТАНОВА

Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Охарактеризованы основные ферментные системы селективного протеолиза, функционирующие в прокариотических и в эукариотических клетках и обеспечивающие поддержание внутриклеточного гомеостаза. Приведены сведения о структуре, активных центрах и специфичности по отношению к белкам-мишеням АТР-зависимых протеиназ.

Ключевые слова: протеолиз селективный; протеиназы АТР-зависимые; протеасомы; прокариоты; эукариоты.

Внутриклеточный протеолиз – это строго контролируемый процесс, который, как выяснилось в последнее время, у про- и эукариот осуществляется [1-12] высокомолекулярными мультимерными энергозависимыми протеиназами. Эти протеиназы выполняют две основные функции: освобождают клетки от дефектных, поврежденных и мутантных белков – *деструктивная функция* [2, 13-15], и осуществляют деградацию ряда короткоживущих регуляторных белков – *регуляторная функция* [2, 14-18].

Энергозависимые протеиназы – особая группа протеиназ, обладающая целым рядом уникальных характеристик. Протеолитическая активность этих ферментов сопряжена с гидролизом АТР. Ферменты проявляют высокую селективность, поскольку производят отбор субстратов-мишеней из общего пула внутриклеточных белков, большая часть которых не должна повреждаться. При этом специфичность по отношению к аминокислотам, образующим расщепляемую связь, у энергозависимых протеиназ зачастую не выражена.

Дегградация белков-субстратов происходит по процессивному механизму – без высвобождения высокомолекулярных промежуточных продуктов. Все известные энергозависимые протеиназы являются олигомерами.

Основные проблемы при изучении АТР-зависимых протеиназ определяются особенностями этих ферментов и состоят в установлении принципов отбора белкового субстрата и механизма сопряжения гидролиза АТР и протеолиза.

АТР-зависимая дегградация белков у прокариот

В клетках *Escherichia coli* к настоящему времени обнаружено пять АТР-зависимых протеиназ [5, 6, 19] – Lon (La) [1-5, 14, 15, 19-42], FtsH (HflB) [43-54], ClpAP (Ti) [55-66], ClpXP [58, 59, 67-71] и HslVU (ClpQY) [72-80]. Некоторые характеристики этих протеиназ представлены в таблице.

Таблица. АТР-Зависимые протеиназы, участвующие в селективном протеолизе в клетках *E. coli*

Протеиназа	Ген	К-во а.о.	Мол. масса, Да (число субъединиц)	Тип активного центра (каталитические остатки)	Субстраты в клетках <i>E. coli</i> *
<i>Семейство AAA-протеиназ</i>					
Lon (La)	<i>lon</i>	784	87300 (4?)	Сериновая протеиназа (<i>Ser</i> ⁶⁷⁹ , ?)	RcsA, SulA, LuxR, λN, λcII, λXis, CcdA, RelBP307, σ32, UmuD, дефектные белки
FtsH (HflB)	<i>FtsH</i>	644	70700 (2 или 4)	Zn-зависимая металлопротеиназа (<i>His</i> ⁴¹⁴ -Glu-Ala-Gly-His)	SecY, σ32, λcII, λcIII, λXis, белки с модифицированными С-концевыми последовательностями
<i>Семейство Clp-протеиназ</i>					
ClpAP (Ti)	<i>clpA</i> <i>clpP</i>	758 193	83000 (12) 21000 (14)	Сериновая протеиназа (<i>Ser</i> ⁹⁷ , <i>His</i> ¹²² , <i>Asp</i> ¹⁷¹)	MazE, ClpA, σ32, некоторые гибридные белки, белки с модифицированными С-концевыми последовательностями
ClpXP	<i>clpX</i> <i>clpP</i>	424 193	46300 (?) 21000 (14)	Сериновая протеиназа (<i>Ser</i> ⁹⁷ ; <i>His</i> ¹²² , <i>Asp</i> ¹⁷¹)	λO, Phd, RpoS, σ32, MuA, MuC
HslUV (ClpYQ)	<i>HslU</i> <i>hslV</i>	443 176	50000 (14 или 12) 19000 (12)	Треониновая протеиназа (<i>Thr</i> ¹)	Денатурированные белки, ряд регуляторных белков, σ32

Примечание: * SulA [26] - регулятор клеточного деления, RcsA [27] и LuxR [31] - регуляторы транскрипции генов, CcdA [28] и RelBP307 [29] - белки-"антидоты", λN, λcII, λcIII [30, 52, 70], λXis [50] и λO [69] - белки фага λ, σ32 [75, 76] - фактор теплового шока, UmuD [32] - субъединица ДНК-полимеразы V, SecY [53] - компонент белок-секретирующего аппарата, MazE [65] - регулятор программируемой гибели клеток, ClpA [57] - АТР-зависимая субъединица ClpAP-протеиназы, Phd [70] - белок фага P1, RpoS [71] - α-фактор, MuA [66] - транспозаза, MuC [66] - репрессор фага Mu.

Lon и FtsH относятся к семейству AAA-белков (АТРаз, ассоциированных с другими клеточными активностями). Протеолитический и АТР-зависимый центры этих ферментов локализованы в одной полипептидной цепи, и они

функционируют как гомоолигомеры. Схематически структуры этих протеиназ сопоставлены на рис. 1.

Исторически **Lon-протеиназа** явилась первой обнаруженной АТФ-зависимой протеиназой. Косвенные сведения о существовании фермента, селективно гидролизующего дефектные белки в клетках *E. coli*, появились еще в 70-х годах [21], однако выделен он был в начале 80-х [22, 23], а аминокислотная последовательность Lon-протеиназы (784 аминокислотных остатков (а.о.)) была расшифрована только в 1988 году одновременно в лаборатории проф. А.Гольдберга (США) [24] и в лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ [25]. Сначала ферменту приписывали исключительно деструктивную функцию. И только в последнее время стало ясно, что кроме деградации дефектных белков, то есть выполнения роли «санитара клетки», Lon-протеиназа расщепляет еще и целый ряд короткоживущих регуляторных белков [26-32] (таблица). Считается, что Lon-протеиназа *E. coli* функционирует как тетра- или октамер [3].

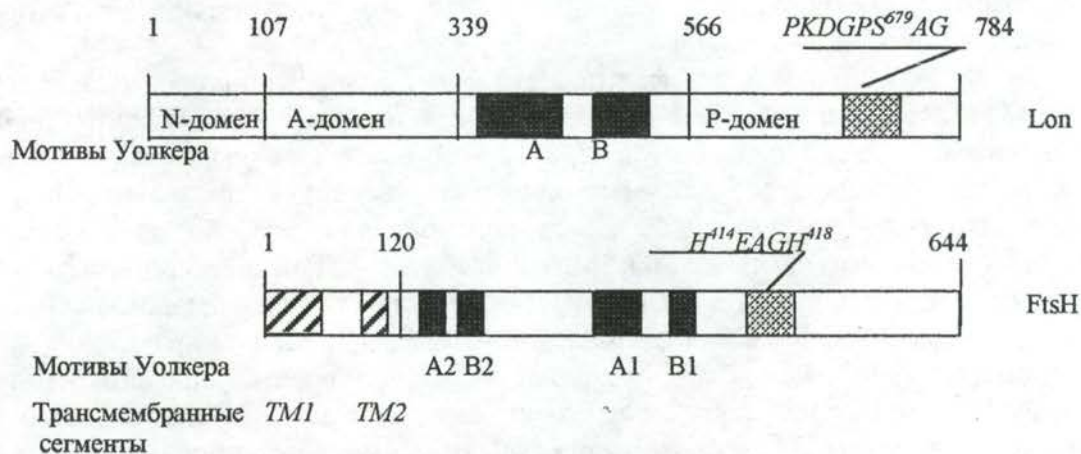


Рисунок 1.

Схема строения Lon- и FtsH-протеиназ (по [20 и 46]).

Субъединица Lon-протеиназы состоит из трех функциональных доменов [33, 34] (рис. 1). Протеолитическим является С-концевой домен (Р-домен, His⁵⁶⁷-Lys⁷⁸⁴), содержащий каталитически активный остаток Ser⁶⁷⁹ [35] в составе строго консервативного для Lon-протеиназ из различных источников октапептида PKDGPSAG [20]. Надо отметить, что аминокислотная последовательность протеолитического домена не обнаруживает гомологии ни с одной из известных групп сериновых протеиназ, активный центр которых представлен так называемой классической каталитической триадой – Ser, His, Asp [20, 36]. Более того, показано, что наличие в Lon-протеиназе классической триады маловероятно, однако, есть основания полагать, что в активном центре фермента функционирует каталитическая диада Ser – Lys [36] (такой тип активного центра обнаружен в последнее время у ряда сигнальных протеиназ [37]). Протеолитическая функция Lon-протеиназы реализуется исключительно полноразмерным ферментом и только в условиях функционирования АТФ-зависимого центра; изолированный протеолитический домен проявляет лишь пептидгидролазную активность [38]. Lon-протеиназа способна гидролизовать пептидные субстраты в отсутствие АТФ; в присутствии комплекса АТФ-Mg скорость гидролиза пептидов значительно

возрастает; ADP-Mg ингибирует пептидгидролазную активность фермента [3, 39]. Нарушение олигомерной структуры Lon-протеиназы приводит к утрате протеолитической активности, однако пептидгидролазная активность сохраняется [39].

Lon-протеиназа гидролизует АТФ и в отсутствие белкового субстрата, проявляя так называемую «базовую» АТФазную активность. Связывание белкового субстрата приводит к повышению АТФазной активности. АТФазный центр локализован в центральном домене (А-домен, Glu¹⁰⁸-Lys⁵⁶⁶, рис. 1), который состоит из двух субдоменов (а.о. 108-339 и 340-566) [20]. Первый субдомен состоит из протяженных α -спиральных участков и, возможно, вовлечен в обеспечение регуляторных функций фермента. Второй субдомен осуществляет АТФазную функцию и содержит мотивы Уолкера: А и В – консервативные фрагменты последовательности, характерные для ряда АТФ-связывающих белков и АТФаз [33, 40]. Мотивы Уолкера участвуют в связывании нуклеотида и иона магния и присутствуют во всех АТФ-зависимых протеиназах *E. coli* (таблица). В АТФазном домене локализован также дополнительный центр связывания белкового субстрата [39], который, как предполагается, участвует в распознавании белка-мишени.

Прямая корреляция эффективности функционирования протеолитического и АТФазного центров Lon-протеиназы отсутствует. При физиологических концентрациях АТФ и ионов Mg (3 и 15 мМ, соответственно) свободные ионы металла проявляют регуляторные свойства, активируя протеолитическую и пептидгидролазную функции фермента и ингибируя базовую АТФазную функцию [39]. Показано, что комплекс ADP-Mg – ингибитор АТФазной и протеолитической активности нативной Lon-протеиназы – активирует пептидгидролазный центр мутантной формы фермента с заменой K362Q [39], функционирующей в форме мономера (рис. 2). Это позволило сформулировать предположение о существовании двух путей передачи сигнала от АТФазных центров к протеолитическим – внутрисубъединичного и межсубъединичного: (1) внутри субъединиц пептидгидролазные центры активируются при связывании нуклеотида любого типа в присутствии ионов магния; (2) при межсубъединичной передаче сигнала пептидгидролазные центры активируются при связывании в «сопряженных» субъединицах комплекса АТФ-Mg и ингибируются при связывании ADP-Mg (действие последнего носит доминирующий характер) [39].

Функция N-концевого домена (N-домен, Met¹-Gly¹⁰⁷, рис. 1) еще не определена. Однако следует отметить, что у большого количества Lon-протеиназ, выявленных в настоящее время в различных эволюционно отдаленных источниках (в том числе и в клетках эукариот), именно N-концевые домены являются наиболее вариабельными по размеру (от 96 до 287 а.о.) и по первичной структуре [20]. Степень подобия в протеолитических (от 206 до 239 а.о.) и в АТФазных (от 458 до 538 а.о.) доменах весьма высока [20].

Отличительной особенностью Lon-протеиназы является ее способность к связыванию ДНК [40, 41], однако до сих пор ДНК-связывающий участок не локализован.

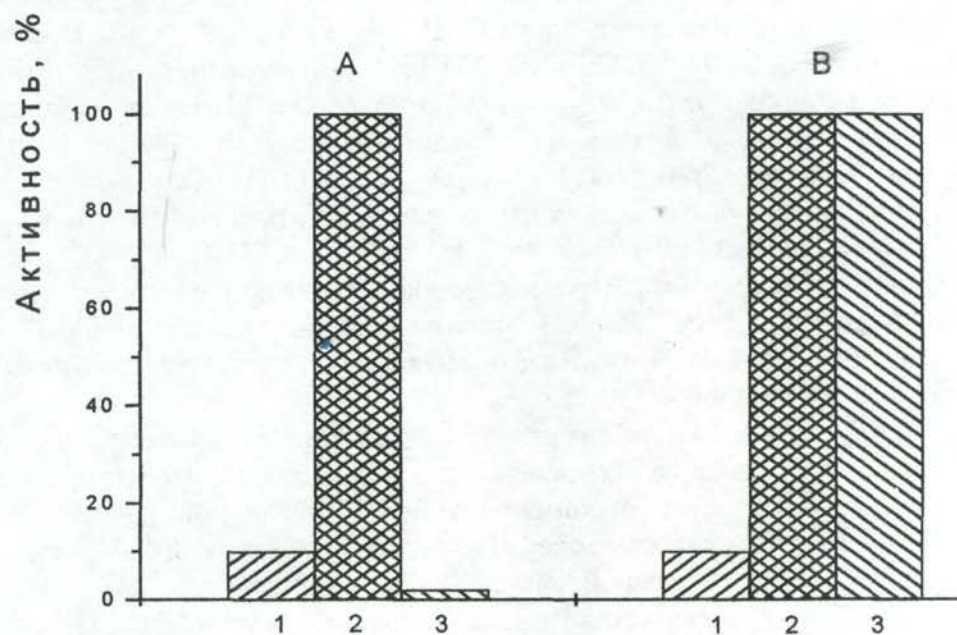


Рисунок 2.

Пептидгидролазная активность нативной Lon-протеиназы (А) и ее мутантной формы Lon-K362Q (В) в отсутствие эффекторов (1) и в присутствии комплексов АТФ-Mg (2) или ADP-Mg (3). Субстрат – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl.

FtsH-протеиназа – единственная мембрано-связанная АТФ-зависимая протеиназа *E. coli*, относится к семейству Zn-зависимых металлопротеиназ (табл.). Первичная структура фермента (644 а.о.) опубликована в 1993 г. [43]. В N-концевой части фермента локализованы два богатых гидрофобными аминокислотами участка, образующих α -спиральные трансмембранные сегменты *TM1* и *TM2* (рис. 1), с помощью которых FtsH-протеиназа дважды пересекает цитоплазматическую мембрану, при этом фрагмент последовательности между сегментами *TM1* и *TM2* локализуется в периплазматическом пространстве [45,46]. Основная часть молекулы (а.о. 121-644) – цитоплазматическая. Центральный ее фрагмент (около 200 а.о.) проявляет высокую гомологию с рядом АТРаз и содержит две пары мотивов Уолкера [46, 47] (A1-B1 и A2-B2, рис. 1). В С-концевом фрагменте FtsH-протеиназы обнаружена характерная для металлопротеиназ Zn-связывающая последовательность с двумя остатками гистидина ($H^{414}EAGH^{418}$) [48, 49]. Предполагается, что фермент функционирует как димер или тетрамер и расщепляет, в основном, регуляторные белки (таблица). Получены данные в пользу участия молекулярных шаперонов (в частности, DnaK, DnaJ, GrpE) в презентации белков-мишеней для деградации ферментом [48]. Показано, что FtsH-протеиназа является единственной АТФ-зависимой протеиназой, наличие которой необходимо для жизнеспособности клеток *E. coli*. Возможно, это связано с собственной шапероноподобной активностью фермента [54].

Семейство **Clp-протеиназ** (т.е. казеинолитических, или шапероноподобных протеиназ) в клетках *E. coli* представлено тремя ферментами (таблица). Все они – гетероолигомеры, состоящие из протеолитических (ClpP и HslV) и АТРазных (ClpA или ClpX и HslU) субъединиц [58, 65].

ClpP-субъединица – общая для ClpAP- и ClpXP-протеиназ. В аминокислотной последовательности ClpP (193 а.о.) обнаружены каталитически активные остатки Ser97, His122 и Asp171 [59]. Изолированная ClpP-субъединица не способна гидролизовать белковые субстраты, но обладает пептидгидролазной активностью [62, 64]. АТРазные субъединицы ClpA и ClpX относят к двум различным классам Clp-белков [81]: ClpA (784 а.о.) [57] принадлежит к белкам первого класса, которые содержат два нуклеотид-триггерных центра, разделенных вариабельной спейсерной областью, ClpX (424 а.о.) [67, 69] – белок второго класса, представители которого существенно меньше по размеру и содержат один АТРазный центр. Таким образом, протеолитические комплексы ClpAP и ClpXP представляют собой АТР-зависимые сериновые протеиназы с классической каталитической триадой.

HslUV [72, 73] принадлежит к недавно открытому подсемейству протеиназ, каталитически активным остатком которых является N-концевой остаток треонина. АТРазный компонент HslUV-протеиназы (HslU) относится к Clp-белкам второго класса, содержит мотивы Уолкера и обладает высокой гомологией с ClpX-субъединицей [81]. Протеолитическая HslV-субъединица состоит из 176 а.о., несет каталитически активный остаток Thr¹ [75] и проявляет пептидгидролазную активность.

Схема функционирования протеиназ Clp-семейства предложена в работе [4] (рис. 3). На первых этапах (стадии 1 и 2) происходит сборка активного мультисубъединичного комплекса фермента. По данным электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа ClpP образует структуру из двух гептамерных колец, наложенных друг на друга [82]. У HslV кольца состоят из 6 субъединиц [72]. АТРазные субъединицы представляют смесь нестабильных мономеров и димеров, которые в присутствии АТР образуют стабильные структуры из гексамерных колец (для HslU возможен также вариант с гептамерными кольцами). Вслед за этим в присутствии АТР окончательно формируется полный фермент, состоящий из колец протеолитических субъединиц, фланкированных кольцами АТРазных субъединиц (стадия 2).

Распознавание и связывание белка-субстрата осуществляется регуляторным АТРазным компонентом – либо его свободной формой, либо в составе полноразмерного фермента (стадия 3). То, что именно АТРазный компонент определяет селективность действия фермента подтверждается тем фактом, что ClpAP и ClpXP, имеющие общий протеолитический компонент, гидролизуют разные внутриклеточные субстраты (таблица). Следующим шагом в функционировании фермента считается разворачивание молекулы субстрата и транслокация ее в область протеолитических центров (стадия 4). Надо отметить, что на этом этапе АТРазные субъединицы могут проявлять шапероноподобную активность и участвовать в рефолдинге белков (стадии 3а-с). Далее происходит процессивное расщепление субстрата внутри мультисубъединичного ферментного комплекса и высвобождение продуктов (стадия 5).

Таким образом, пять рассмотренных выше АТР-зависимых протеиназ *E. coli* представляют четыре различных подсемейства протеолитических ферментов и, следовательно, не проявляют структурной гомологии в своих протеолитических компонентах. АТРазные субъединицы и домены этих протеиназ также не проявляют выраженной гомологии. До недавнего времени

считалось, что единственным общим структурным элементом энергозависимых протеиназ является наличие у них мотивов Уолкера.

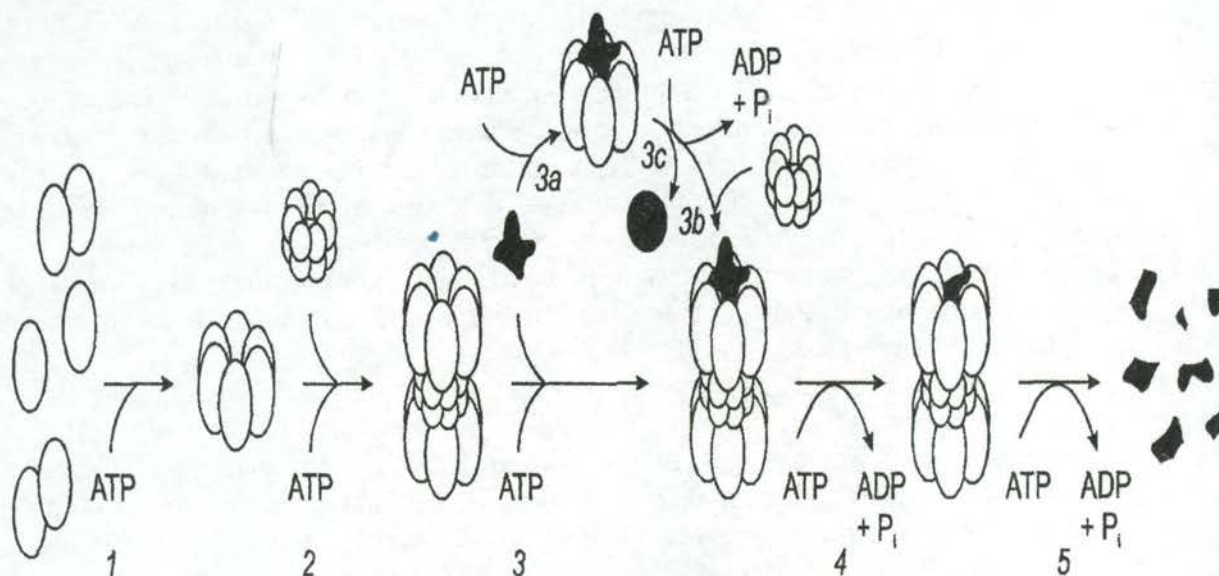


Рисунок 3.

АТФ-Зависимая деградация белка-субстрата протеиназами Clp-семейства (по [4]).

1 – сборка АТФазных регуляторных субъединиц (ClpA, ClpX, HslU); 2 – сборка протеолитических субъединиц (ClpP, HslV) и полноразмерных ферментов (ClpAP, ClpXP, HslUV); 3 – связывание субстрата ферментом (3a – связывание субстрата АТФазным компонентом; 3b – связывание субстрат-АТФазного комплекса с протеолитическим компонентом; 3c – реализация АТФазным компонентом функции молекулярного шаперона); 4 – разворачивание субстрата и транслокация его в область протеолитического центра; 5 – расщепление пептидных связей в субстрате и выделение продуктов деградации. Стадии 1, 2, 3, 3a и 3b реализуются при связывании АТФ; стадии 3c, 4 и 5 сопряжены с гидролизом АТФ.

Черты сходства между АТФ-зависимыми протеиназами *E. coli* обнаруживаются прежде всего в механизме их функционирования, характеризующемся высокой селективностью, сопряжением протеолиза с гидролизом АТФ и процессивностью деградации белковых субстратов, а также в олигомерной организации. Кроме того, надо подчеркнуть, что протеолитический и АТФазный компоненты у энергозависимых протеиназ разделены пространственно и принадлежат либо отдельным субъединицам, либо отдельным доменам.

Общим и очень важным фактором является и то, что гидролиз белковых субстратов осуществляется только полноразмерными ферментами: ни отдельные протеолитические субъединицы (ClpP или HslV), ни изолированный протеолитический домен Lon-протеиназы не способны гидролизовать белковый субстрат. Вместе с тем изолированные протеолитические компоненты АТФ-зависимых протеиназ проявляют пептидгидролазную активность – гидролизуют небольшие пептидные субстраты. Эти данные свидетельствуют о том, что в формировании протеолитического каталитического центра АТФазные компоненты молекул участия не принимают. Но именно АТФазные компоненты осуществляют селективный отбор субстратов-мишеней для последующего

гидролиза. Механизм реализации селективности еще неясен, однако имеются некоторые сведения о фрагментах структуры ферментов, принимающих участие в отборе субстратов.

В 1999 г. было установлено [83], что в N-концевой области АТРазного домена (или в первом субдомене АТРазного домена) Lon-протеиназы вблизи остатка Glu²⁴⁰ локализован α -спирализованный участок, ответственный за связывание с высокой аффинностью специфических внутриклеточных субстратов фермента – регуляторных белков RcsA и SulA; авторы назвали этот участок распознающим центром (“discriminator site”). Кроме того, они постулировали наличие в ферменте в области остатков 538-588 другого участка связывания – (“initiator site”) инициаторного центра, проявляющего пониженную аффинность и взаимодействующего с неспецифическими субстратами Lon-протеиназы (белками с нарушенной структурой).

В том же году другой группой исследователей у Lon- и Clp-протеиназ были обнаружены родственные структурные субдомены (“sensor and substrate-discrimination domain”, SSD) размером около 100 а.о., которые, как полагают авторы, обеспечивают распознавание некоторых белковых субстратов [84] (рис. 4). Фрагменты, соответствующие этим субдоменам, стабильны и способны к независимому образованию третичной структуры (“фолдингу”). В Lon-протеиназе такой субдомен (а.о. 495-607) локализован «на стыке» АТРазного и протеолитического доменов (рис. 1) и включает постулированный выше [83] инициаторный центр, а в Clp-протеиназах SSD-субдомен занимает C-концевую область АТРазных субъединиц (а.о. 766-857 для ClpA и 318-424 для ClpX). При этом в субстрате узнаются, по-видимому, не специфические фрагменты последовательности, а некоторые локализованные вблизи N- или C-концевой части молекулы белка неструктурированные области, способные претерпевать конформационные изменения, приводящие к образованию комплементарного комплекса с SSD-субдоменом фермента.

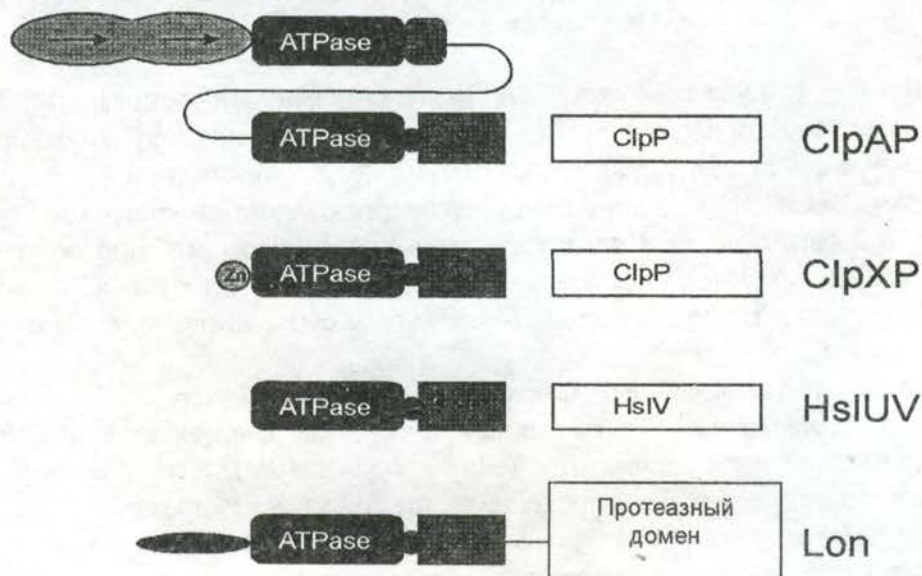


Рисунок 4.
Доменное строение Lon- и Clp-протеиназ (по [84]).

Опираясь на эти данные, авторы работы [85] предложили модифицированную модель функционирования АТФ-зависимых протеиназ, в которой связывание субстрата с ферментом (рис. 3, стадия 3) конкретизируется как связывание либо N-концевого, либо С-концевого участка белка-мишени с распознающим SSD-субдоменом АТФазного компонента молекулы фермента. Исходя из структуры SSD-субдомена и его локализации в ClpA/X и в Lon-протеиназе, авторы приходят к заключению о том, что первичное связывание белка-мишени с SSD-субдоменом может быть дополнено взаимодействием субстрата с поверхностью фермента, обеспечивающим второй уровень распознавания субстрата.

АТФ-зависимая деградация белков у эукариот

В цитозоле эукариот селективную деградацию белков осуществляют большие мультимолулярные комплексы [7] с мол. массой около 2 млн., называемые **26S-протеасомами** (то есть протеиназами, являющимися крупными частицами – «сомами»). Мишенями 26S-протеасом являются белки, вовлеченные во многие внутриклеточные процессы (регуляция метаболизма, дифференцировка клеток, контроль клеточного цикла, ответ на стресс и др.) [9] или дефектные белки, возникающие в результате мутаций или посттрансляционных повреждений. При этом белки-мишени предварительно подвергаются модификации небольшим белком – убиквитином, состоящим из 76 а.о. [8, 86, 87]. 26S-протеасома – это сложный комплекс (рис. 5), образованный 20S-протеасомой, играющей роль протеолитического ядра, и двумя регуляторными комплексами, так называемыми активаторами протеасомы Р700 (или 19S-комплексами), которые обеспечивают проявление ферментативной активности и определяют субстратную специфичность 26S-комплекса [7].

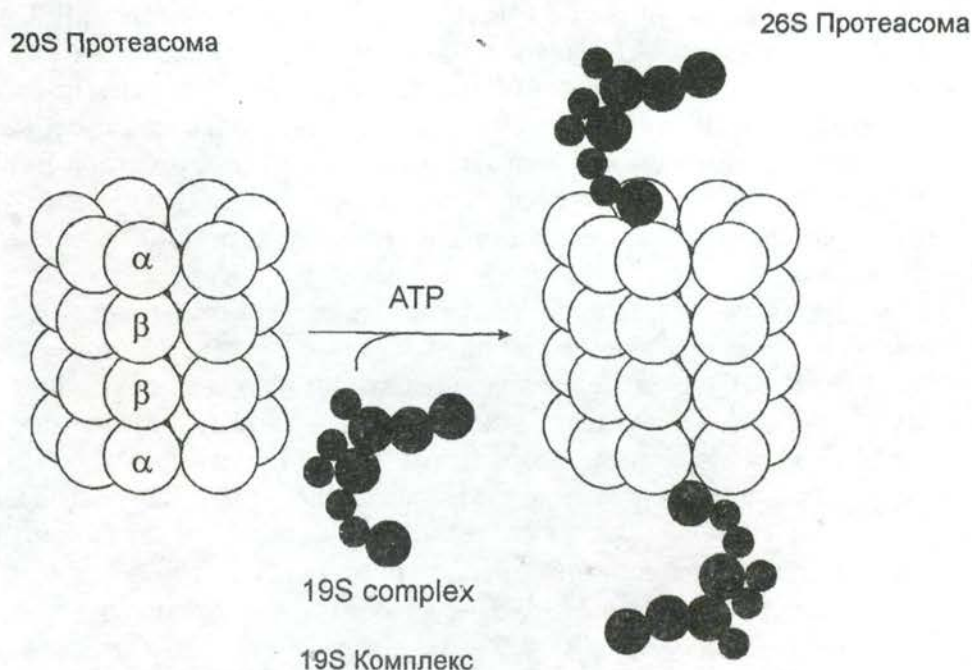


Рисунок 5.
Строение и сборка 26S-протеасомы (по [88]).

Центральная часть 26S-протеасомы **20S-протеасома** представляет собой цилиндрическую частицу, которая состоит из четырех семичленных колец (рис. 5). Кольца расположены друг над другом и формируют обширную внутреннюю полость. 20S-протеасомы эукариот содержат более десяти различных типов субъединиц, которые делятся на два семейства (α и β). Наружные кольца образованы α -субъединицами, а внутренние – β -субъединицами [88-90].

In vitro 20S-протеасома обладает широким спектром пептидгидролазной активности. Каждое кольцо из семи β -субъединиц содержит три активных центра, проявляющих различную первичную специфичность: химотрипсино-, трипсино- и каспазоподобную, т.е. в белках-мишенях атакуются пептидные связи, образованные, соответственно, гидрофобными, положительно заряженными или дикарбоновыми аминокислотами [91-94]. При этом каталитически активным остатком каждого из активных центров является N-концевой остаток треонина – Thr¹ [95] (так же, как это было установлено для HslUV-протеиназы). Протеасома осуществляет процессивную деградацию белковых субстратов с образованием пептидных продуктов размером от 3 до 22 а.о. [96]. В последнее время обнаружен феномен аллостерической взаиморегуляции активных центров, обладающих различной специфичностью [97]. Функционирует ли 20S-протеасома *in vivo* – неизвестно.

26S-протеасома образуется при АТФ-зависимой ассоциации 20S-протеасомы и регуляторного 19S-комплекса, включающего около 20 различных субъединиц (рис. 5) [98]. Этот комплекс обладает АТФазной активностью и выполняет функции селективного распознавания субстратов и взаимодействия с ними, активации пептидазной активности 20S-комплекса, обеспечения сборки полного 26S-комплекса и др. [88]. 19S-комплекс содержит, по крайней мере, 6 различных АТФазных субъединиц, которые принадлежат к белкам AAA-типа (так же как и описанные выше Lon- и FtsH-протеиназы прокариот) [99, 100]. Значение такого разнообразия АТФазных субъединиц и роль каждой из них не выяснены. Помимо АТФазных субъединиц 19S-комплекс содержит и другие субъединицы, не обладающие АТФ-связывающей способностью. Роль этих субъединиц может заключаться в обеспечении взаимодействия с 20S-протеасомой и в ее активации, высвобождении полиубиквитиновых цепей и их гидролизе, поддержании структуры 26S-комплекса, взаимодействии с субстратами и их презентации 20S-протеасоме [7].

Процессу деградации белков протеасомой (рис. 6) предшествует селективная модификация мишеней путем ковалентного присоединения убиквитина [101-103]. Сначала происходит активация C-концевого остатка глицина в молекуле убиквитина, катализируемая специфическим убиквитинактивирующим ферментом E1, и связывание активированного убиквитина с убиквитинпереносящим ферментом E2. Затем при помощи убиквитинлигазы E3 образуется изопептидная связь между C-концевым остатком глицина убиквитина и ϵ -аминогруппой внутреннего остатка лизина белка-мишени.

Другая группа E2-ферментов катализирует образование полиубиквитиновых цепей (рис. 6) путем связывания каждой последующей молекулы убиквитина с ϵ -аминогруппой остатка Lys48 предыдущей [104]. И уже полиубиквитиновые белки-мишени подвергаются быстрой деградации 26S-протеасомой, сопровождающейся отщеплением убиквитина. Все стадии этого процесса АТФ-зависимы.

Фактически распознавание белка-мишени осуществляется убиквитин-лигазой – ферментом E3, однако, по какому принципу происходит отбор мишени, до сих пор не ясно. В настоящее время предложено несколько вариантов так называемых сигналов, определяющих белки, подлежащие селективному протеолизу. Согласно *N-концевому правилу* [105-107] скорость деградации белка зависит от природы его N-концевой аминокислоты, при этом одни аминокислоты считаются дестабилизирующими, а другие – стабилизирующими. Другой молекулярной детерминантой деградации белка считаются *PEST-сигналы* – фрагменты последовательности белка-мишени, обогащенные остатками пролина (P), глутаминовой кислоты (E), серина (S) и треонина (T) [108, 109]. Обнаружено также два варианта специфических фрагментов последовательностей (обозначаемых как “*destruction box*” – RXALGXIXN [110] и “*destabilizing tail*” – AANDENYALAA [111-113]), являющихся сигналами деградации. Однако ни один из этих сигналов не носит обобщающего характера. Общие принципы селективного отбора субстратов еще не сформулированы, а может, они вообще не существуют.

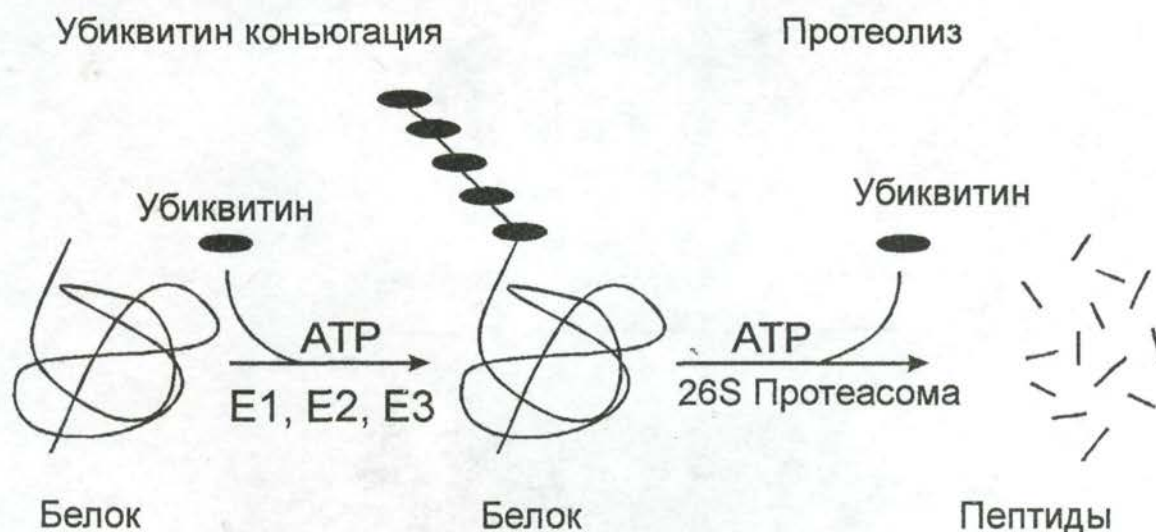


Рисунок 6.

Убиквитин-зависимая деградация белков 26S-протеасомой (по [102]).

Следует отметить, что несмотря на более сложную организацию, 26S-протеасома обнаруживает некоторое структурное подобие с АТФ-зависимыми протеиназами прокариот Clp-семейства. Действительно, структура ClpP и HslV подобна структуре внутреннего ядра из β -субъединиц 20S-протеасомы, однако при этом только HslV проявляет сходство по первичной структуре с β -субъединицей. Методом электронной микроскопии показано (рис. 7), что Clp-протеиназы и 26S-протеасома имеют сходную архитектуру: центральный элемент обоих комплексов представляет двухкольцевую структуру с осью симметрии 7 порядка, фланкированную с двух сторон олигомерными АТФ-разными компонентами [114]. Такое структурное сходство позволяет предполагать сходство в основных биохимических механизмах, посредством которых эти ферменты связывают, разворачивают и переносят белковые субстраты к

протеолитическим активным центрам. Обладают ли функционально активные олигомеры Lon- и FtsH-протеиназ каким-либо структурным сходством с Clp-протеиназами и протеасомами, в настоящее время не известно, поскольку четвертичная структура их еще не определена.

Ферменты, родственные протеиназам AAA-семейства прокариот, также были сравнительно недавно обнаружены в митохондриях клеток эукариот – это Pim1-протеиназа (аналог Lon) [115, 116], m-AAA(Yta10h/Yta12p)-протеиназа [117, 118] и i-AAA(Yme1p)-протеиназа (обе – аналоги FtsH) [119, 120]. Протеиназа Pim1 участвует в формировании дыхательных комплексов в митохондриях, и в регулируемом протеолизе митохондриальных белков [121]. m- и i-AAA-протеиназы вовлечены в деградацию свободных продуктов митохондриальной трансляции во внутренней мембране и необходимы для формирования системы окислительного фосфорилирования [117, 119, 122].

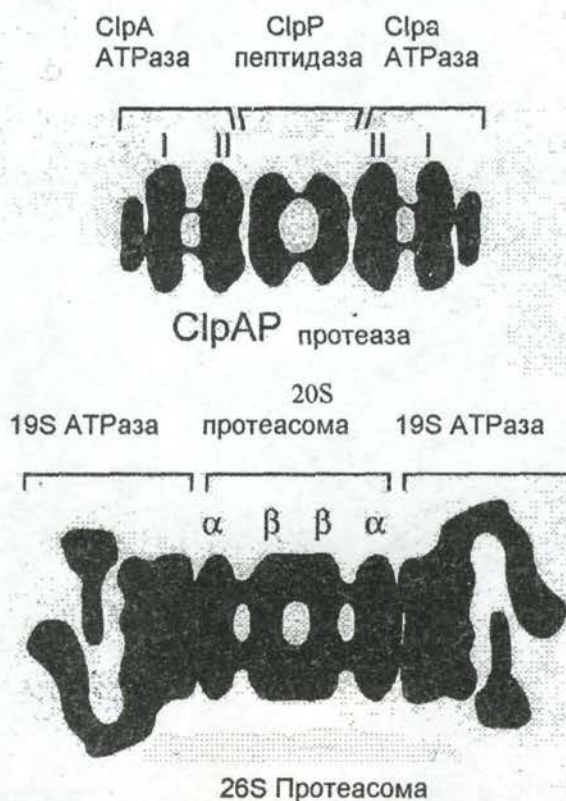


Рисунок 7.
Сопоставление строения ClpAP-протеиназы и 26S-протеасомы (по [114]).

Таким образом, селективный внутриклеточный протеолиз, осуществляемый олигомерными АТР-зависимыми протеиназами, обеспечивает контроль качества функциональных белков и поддержание необходимого уровня их в клетке. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в исследовании энергозависимого протеолиза, многие его аспекты остаются невыясненными. В первую очередь это касается природы селективности, реализуемой при отборе ферментом субстрата-мишени, и механизма сопряжения протеолиза и гидролиза АТР. Осуществление функции гидролиза белковых субстратов исключительно полноразмерными энергозависимыми протеиназами может быть обусловлено

участием их АТРазных компонентов (субъединиц или доменов) либо в селективном отборе белков-мишеней с последующим изменением их пространственной структуры («разворачивание») и транслокацией их к протеолитическим центрам, либо в активации собственно протеолитических центров фермента, либо в совместном действии указанных факторов. Дальнейший прогресс в выяснении механизмов селективного внутриклеточного протеолиза, по-видимому, во многом связан с исследованием взаимовлияния АТРазного и пептидгидролазного центров в процессе их функционирования и с изучением влияния конформационного состояния как фермента, так и субстрата на каталитическую активность каждого центра.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gottesman S., Maurizi M.R. (1992) *Microbiol. Rev.*, **56**, 592-621.
2. Gottesman S. (1996) *Ann. Rev. Genet.*, **30**, 465-506.
3. Goldberg A.L., Moerschell R.P., Chung C.H., Maurizi M.R. (1994) *Meth. Enzymol.*, **244**, 350-375.
4. Gottesman S., Maurizi M.R., Wickner S. (1997) *Cell.*, **91**, 435-438.
5. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. (1997) *Gen. Develop.*, **11**, 815-823.
6. Старкова Н.Н., Королева Е.П., Ротанова Т.В. (2000) *Биоорг. химия*, **26**, 83-96.
7. Coux O., Tanaka K., Golberg A.L. (1996) *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 801-847.
8. Tanaka K., Ii K., Ichihara A., Waxman L., Golberg A.L. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 15197-15203.
9. Hilt W., Wolf D.H. (1996) *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 96-102.
10. Deshaies R.J. (1995) *Trends Cell. Biol.*, **5**, 428-434.
11. Hicke L. (1997) *FASEB J.*, **11**, 1215-1226.
12. Sommer T., Wolf D.H. (1997) *FASEB J.*, **11**, 1227-1233.
13. Goldberg A.L., John A.C.S. (1987) *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 747-803.
14. Goldberg A.L. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **203**, 9-23.
15. Maurizi M.R. (1992) *Experientia.*, **48**, 178-201.
16. Ciechanover A., Schwartz A.L. (1994) *FASEB J.*, **8**, 182-191.
17. Pagano M. (1997) *FASEB J.*, **11**, 1067-1075.
18. Tanaka K., Tanahashi N., Tsurumi C., Yokota K.Y., Shimbara N. (1997) *Adv. Immunol.*, **64**, 1-38.
19. Van Melder L., Gottesman S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6064-6071.
20. Ротанова Т.В. (1999) *Биоорг. химия*, **25**, 883-891.
21. Goldschmidt R. (1970) *Nature.*, **228**, 1151-1154.
22. Charette M.F., Henderson G.W., Markovitz A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4728-4732.
23. Chung C.H., Goldberg A.L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4931-4935.
24. Chin T.D., Goff S.A., Webster T., Smith T., Goldberg A.L. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 11718-11728.
25. Америк А.Ю., Чистякова Л.Г., Остроумова Н.И., Гуревич А.И., Антонов В.К. (1988) *Биоорг. химия*, **14**, 408-411.
26. Mizusawa S., Gottesman S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 358-362.

27. Gottesman S., Stout V. (1991) *Mol. Microbiol.*, **5**, 1599-1606.
28. Van Melder L., Bernard P., Couturier M. (1994) *Mol. Microbiol.*, **11**, 1151-1157.
29. Gronlund H., Gerdes K. (1999) *J. Mol. Biol.*, **285**, 1401-1415.
30. Gottesman S., Gottesman M. (1981) *Cell.*, **24**, 225-233.
31. Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. (1997) *Молекул. биология*, **31**, 945-949.
32. Gonzalez M., Frank E.G., Levine A.S., Woodgate R. (1998) *Gen. Develop.*, **12**, 3889-3899.
33. Америк А.Ю., Антонов В.К., Остроумова Н.И., Ротанова Т.В., Чистякова Л.Г. (1990) *Биоорган. химия*, **16**, 869-881.
34. Ротанова Т.В., Котова С.А., Америк А.Ю., Лыков И.П., Гинодман Л.М., Антонов В.К. (1994) *Биоорган. химия*, **20**, 114-125.
35. Amerik A.Yu., Antonov V.K., Gorbalenya A.E., Kotova S.A., Rotanova T.V., Schimbarevich E.V. (1991) *FEBS Lett.*, **287**, 211-214.
36. Starkova N.N., Koroleva E.P., Rumsh L.D., Ginodman L.M., Rotanova T.V. (1998) *FEBS Lett.*, **422**, 218-220.
37. Paetzel M., Dalbey R.E. (1997) *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 28-31.
38. Rasulova F.S., Dergousova N.I., Starkova N.N., Melnikov E.E., Rumsh L.D., Ginodman L.M., Rotanova T.V. (1998) *FEBS Lett.*, **432**, 179-181.
39. Мельников Э.Э., Цирюльников К.Б., Ротанова Т.В. (2000) *Биоорган. химия*, **26**, 546-554.
40. Yoshida M., Amano T. (1995) *FEBS Lett.*, **359**, 1-5.
41. Chung C.H., Goldberg A.L. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 795-799.
42. Fu G.K., Smith M.J., Markovitz D.M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 534-538.
43. Tomoyasu T., Yuki T., Morimura S., Mori H., Yamanaka K., Niki H., Hiraga S., Ogura T. (1993) *J. Bacteriol.*, **175**, 1344-1351.
44. Herman C., Ogura T., Tomoyasu T., Hiraga S., Akiyama Y., Ito K., Thomas R., d'Ari R., Bouloc P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10861-10865.
45. Akiyama Y., Yoshihisa T., Ito K. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 23485-23490.
46. Tomoyasu T., Yamanaka K., Murata K., Suzuki T., Bouloc P., Kato A., Niki H., Hiraga S., Ogura T. (1993) *J. Bacteriol.*, **175**, 1352-1357.
47. Confalonieri F., Duguet M. (1995) *BioEssays*, **17**, 639-650.
48. 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.
49. Herman C., Lecat S., d'Ari R., Bouloc P. (1995) *Mol. Microbiol.*, **18**, 247-255.
50. Leffers G.G., Gottesman S. (1998) *J. Bacteriol.*, **180**, 1573-1577.
51. Shotland Y., Koby S., Teff D., Mansur N., Oren D.A., Tatematsu K., Tomoyasu T., Kessel M., Bukau B., Ogura T., Oppenheim A.B. (1997) *Mol. Microbiol.*, **24**, 1303-1310.
52. Herman C., Thevenet D., d'Ari R., Bouloc P. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 358-363.
53. Akiyama Y., Kihara A., Tokuda H., Ito K. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 31196-31201.
54. Shirai Y., Akiyama Y., Ito K. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 1141-1145.
55. Katayama Y., Gottesman S., Pumphrey J., Rudikoff S., Clark W.P., Maurizi M.R. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 15226-15236.
56. Hwang B.J., Park W.J., Chung C.H., Goldberg A.L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5550-5554.

57. Gottesman S., Clark W.P., Maurizi M.R. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 7886-7893.
58. Hwang B.J., Woo K.M., Goldberg A.L., Chung C.H. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8727-8734.
59. Maurizi M.R., Clark W.P., Katayama Y., Rudikoff S., Pumphrey J., Bowers B., Gottesman S. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 12536-12545.
60. Wang J., Hartling J.A., Flanagan J.M. (1997) *Cell*, **91**, 447-456.
61. Maurizi M.R. (1991) *Biochem. Soc. Trans.*, **19**, 719-723.
62. Thompson M.W., Maurizi M.R. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 18201-18208.
63. Woo K.M., Chung W.J., Ha D.B., Goldberg A.L., Chung C.H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 2088-2091.
64. Maurizi M.R., Thompson M.W., Singh S.K., Kim S.H. (1994) *Meth. Enzymol.*, **244**, 314-331.
65. Aizenman E., Engelberg-Kulka H., Glaser G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6059-6063.
66. Gottesman S. (1996) Regulation of Gene Expression in <Escherichia coli.> Eds E.C.C. Lin, A.S. Lynch. Austin, TX. RG Landers Company, pp.503-519.
67. Gottesman S., Clark W.P., de Crecy-Lagard V., Maurizi M.R. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 22618-22626.
68. Schirmer E.C., Glover J.R., Singer M.A., Lindquist S. (1996) *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 289-296.
69. Wojtkowiak D., Georgopoulos C., Zylicz M. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 22609-22617.
70. Lehnher H., Yarmolinsky M.B. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3274-3277.
71. Schweder T., Lee K.H., Lomovskaya O., Matin A. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 470-476.
72. 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.
73. Chuang S.E., Burland V., Plunkett G. 3d, Daniels D.L., Blattner F.R. (1993) *Gene*, **134**, 1-6.
74. Lupas A., Zwickl P., Baumeister W. (1994) *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 533-534.
75. Yoo S.J., Shim Y.K., Seong I.S., Seol J.H., Kang M.S., Chung C.H. (1997) *FEBS Lett.*, **412**, 57-60.
76. Kanemori M., Nishihara K., Yanagi H., Yura T. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 7219-7225.
77. Missiakas D., Schwager F., Betton J.M., Georgopoulos C., Raina S. (1996) *EMBO J.*, **15**, 6899-6909.
78. 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.
79. Huang H., Goldberg A.L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21364-21372.
80. Yoo S.J., Seol J.H., Seong I.S., Kang M.S., Chung C.H. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **238**, 581-585.
81. Shrimmer E.C., Glover J.R., Singer M.A., Lindquist S. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 289-296.
82. Kessel M., Maurizi M.R., Kim B., Kosis E., Trus B.L., Singh S.K., Steven A.C. (1995) *J. Mol. Biol.*, **250**, 587-594.
83. Ebel W., Skinner M.M., Dierksen K.P., Scott J.M., Trempey J.E. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 2236-2243.

84. *Smith C.K., Baker T.A., Sauer R.T.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6678-6682.
85. *Wickner S., Maurizi M.R.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 3363-3371.
86. *Hochstrasser M.* (1996) *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 405-439.
87. *Haas A.L., Siepmann T.J.* (1997) *FASEB J.*, **11**, 1257-1268.
88. *Pickart C.M.* (1997) *FASEB J.*, **11**, 1055-1066.
89. *Grziwa A., Baumeister W., Dahlmann B., Kopp F.* (1991) *FEBS Lett.*, **290**, 186-190.
90. *Lowe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W., Huber R.* (1995) *Science*, **268**, 533-539.
91. *Groll M., Ditzel L., Lowe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H., Huber R.* (1997) *Nature*, **386**, 463-471.
92. *Orlowski M.* (1990) *Biochemistry*, **29** 10289-10297.
93. *Heinemeyer W., Fischer M., Krimmer T., Stachon U., Wolf D.H.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 25200-25209.
94. *Arendt C.S., Hochstrasser M.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7156-7161.
95. *Seemuller E., Lupas A., Stock D., Lowe J., Huber R., Baumeister W.* (1995) *Science*, **268**, 579-582.
96. *Kisselev A.F., Akopian T.N., Woo K.M., Goldberg A.L.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 3363-3371.
97. *Kisselev A.F., Akopian T.N., Castillo V., Goldberg A.L.* (1999) *Mol. Cell.*, **4**, 395-402.
98. *Orino E., Tanaka K., Tamura T., Sone S., Ogura T., Ichihara A.* (1991) *FEBS Lett.*, **284**, 206-210.
99. *Dubiel W., Ferrell K., Pratt G., Rechsteiner M.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 22699-22702.
100. *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.
101. *Haas A.L., Siepmann T.J.* (1997) *FASEB J.*, **11**, 1257-1268.
102. *Lee D.H., Goldberg A.L.* (1998) *Trends Cell Biol.*, **8**, 397-403.
103. *Sharp P.M., Li W.H.* (1987) *J. Mol. Evol.*, **25**, 58-64.
104. *Chau V., Tobias J.W., Bachmair A., Mariott D., Ecker D.J., Gonda D.K., Varshavsky A.* (1989) *Science*, **243**, 1576-1583.
105. *Varshavsky A.* (1992) *Cell*, **69**, 725-735.
106. *Bachmair A., Varshavsky A.* (1989) *Cell*, **56**, 1019-1032.
107. *Gonda D.K., Bachmair A., Wunning I., Tobias J.W., Lane W.S., Varshavsky A.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 16700-16712.
108. *Rogers S., Wells R., Rechsteiner M.* (1986) *Science*, **234**, 364-368.
109. *Rechsteiner M., Rogers S.W.* (1996) *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 267-271.
110. *Glutzer M., Murray A.W., Kirschner M.W.* (1991) *Nature*, **349**, 132-138.
111. *Tu G.-F., Reid G.E., Zhang J.-G., Moritz R.L., Simpson R.J.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 9322-9326.
112. *Keiler K.C., Silber K.R., Downard K.M., Papayannopoulos I.A., Biemann K., Sauer R.T.* (1995) *Protein Sci.*, **4**, 1507-1515.
113. *Bowie J.U., Sauer R.T.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 7596-7602.

114. *Gottesman S., Wickner S., Jubete Y., Singh S.K., Kessel M., Maurizi M.* (1995) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **60**, 533-548.
115. *Kutejova E., Durcova G., Surovkova E., Kujela S.* (1993) FEBS Lett., **329**, 47-50.
116. *VanDyck L., Pearce D.A., Sherman F.* (1994) J. Biol. Chem., **269**, 238-242.
117. *Pajic A., Tauer R., Feldmann H., Neupert W., Langer T.* (1994) FEBS Lett., **353**, 201-206.
118. *Arlt H., Tauer R., Feldmann H., Neupert W., Langer T.* (1996) Cell, **85**, 875-885.
119. *Guelin E., Rep M., Grivell L.A.* (1994) Yeast, **10**, 1389-1394.
120. *Leonhard K., Herrmann J.M., Stuart R.A., Mannhaupt G., Neupert W., Langer T.* (1996) EMBO J., **15**, 4218-4229.
121. *Suzuki C.K., Suda K., Wang N., Schatz G.* (1994) Science, **264**, 273-276.
122. *Pearce D.A., Sherman F.* (1995) J. Biol. Chem., **270**, 1141-1155.

Поступила 14.11.2000.

**ENERGY-DEPENDENT SELECTIVE INTRACELLULAR PROTEOLYSIS
STRUCTURE, ACTIVE SITES
AND SPECIFICITY OF ATP-DEPENDENT PROTEASES**

T.V. ROTANOVA

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

The enzymatic systems of selective proteolysis serving for the maintenance of cell homeostasis and functioning in prokaryotic and eukaryotic cells are characterized. The data on structure, active sites and specificity towards protein targets are given.

Key words: selective proteolysis, ATP-dependent proteases, proteasome, prokaryotes, eukaryotes.