

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ ПРОТЕАСОМ И ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

© 2019 г. Е. Е. Дьяконов¹, *, А. С. Цимоха¹, **

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

*E-mail: e.diakonov@incras.ru

**E-mail: atsimokha@incras.ru

Поступила в редакцию 08.10.2018 г.

После доработки 23.11.2018 г.

Принята к публикации 03.12.2018 г.

Протеасома – большой белковый комплекс эукариотических клеток, осуществляющий деградацию белков и являющийся удобным и важным объектом для изучения его посттрансляционных модификаций. Известно, что посттрансляционные модификации субъединиц протеасомы регулируют протеолитическую активность, субстратную специфичность, клеточную локализацию протеасомы, а также сборку и поддержание стабильности комплекса. Наибольшее количество известных сайтов посттрансляционных модификаций протеасомы приходится на долю фосфорилирования и ацетилирования, тем не менее, для большинства известных сайтов их функциональное значение для протеасомы остается неизученным. Следует отметить, что изучение специфических посттрансляционных модификаций протеасомных субпопуляций, включая иммунопротеасомы и внеклеточные протеасомы, до сих пор проведено не было. В этом обзоре описаны посттрансляционные модификации протеасом, функциональное значение которых известно.

Ключевые слова: протеасома, убиквитин-протеасомная система, посттрансляционные модификации

DOI: 10.1134/S0041377119030039

Протеасома является крупным (2.5 МДа) мульти-субъединичным белковым комплексом, осуществляющим убиквитин-зависимую деградацию белков (Konstantinova et al., 2008). Основой протеасомы является 20S-коровая частица, состоящая из 14 пар субъединиц с массой от 25 до 35 кДа, которые вместе образуют комплекс с массой около 750 кДа (Lowe et al., 1995). 20S-коровая частица представляет собой цилиндрическую структуру длиной 15–17 нм и диаметром 11–12 нм и состоит из 7 дублированных α -субъединиц и 7 β -субъединиц, которые образуют стопку из 4 гетерогептамерных колец (Groll et al., 1997). 2 внешних кольца состоят из 7 гомологичных α -субъединиц, а 2 внутренних – из 7 гомологичных консервативных β -субъединиц. Субстратные пептидные связи гидролизуются N-терминальным остатком треонина, который присутствует в составе β -субъединиц (Seemuller et al., 1995).

Протеасома может существовать в виде 20S-коровой частицы, в этом случае она называется 20S-протеасомой, и осуществляет только убиквитин-независимый протеолиз. Для выполнения своей основной функции в клетке – убиквитин-зависимого протеолиза, в состав протеасомы должна входить 19S-регуляторная частица (PA700), и в таком виде

комплекс называется 26S-протеасомой (рис. 1). 19S-частица состоит, по крайней мере, из 19 различных субъединиц, имеет молекулярную массу около 900 кДа и располагается с одной или обеих сторон 20S-корового комплекса (Glickman et al., 1998). 19S-комплекс распознает и разворачивает полиубиквитинированные субстраты, отщепляет мономеры убиквитина, а также регулирует вхождение субстрата внутрь коровой 20S-частицы (Glickman, Ciechanover, 2002). 19S-частица состоит из двух основных структур: “основания” и “крышки” (Glickman et al., 1998). В “основании” находятся 6 различных гомологичных АТФаз (Rpt1–6), образующих гексамерное кольцо, 2 адаптерные субъединицы (Rpn1, Rpn2) и 2 рецептора убиквитина (Rpn10, Rpn13) (Glickman et al., 1998). В “крышке” находится в том числе субъединица Rpn11, которая обладает каталитической способностью, являясь Zn^{2+} -зависимым деубиквитинирующим ферментом (Verma et al., 2002; Yao, Cohen, 2002). Именно “крышка” способна узнавать полиубиквитиновые цепи, поскольку протеолиз убиквитинированных белков осуществляется протеасомой только в присутствии “крышки” (Glickman et al., 1998).

Расщепляя большую часть синтезируемых клеткой белков, протеасома участвует в регуляции мно-

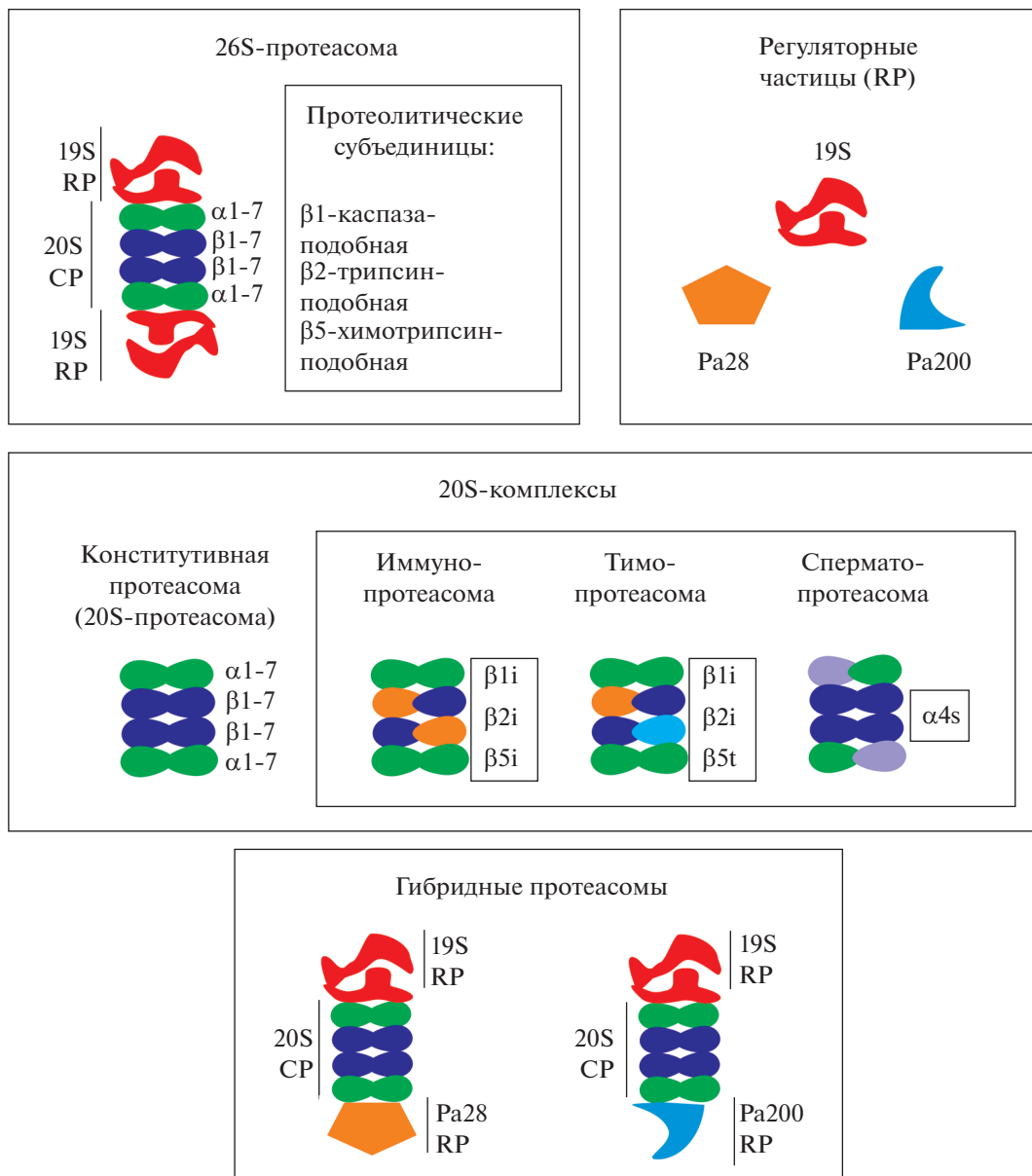


Рис. 1. Вариабельность популяций протеасом.

Протеасомы представлены не только конститутивными 20S- и 26S-комплексами, но и альтернативными комплексами – иммунопротеасомами, тимопротеасомами и сперматопротеасомами, различающимися по своим функциям и составу субъединиц. Также в клетке существуют гибридные протеасомы, в которых состав субъединиц может отличаться от классических форм. 19S RP – 19S-регуляторная частица; 20S CP – 20S-коровая частица; PA28 RP – PA28-регуляторная частица; $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ – альтернативные субъединицы иммунопротеасомы; $\beta 5t$ – альтернативная субъединица тимопротеасомы; $\alpha 4s$ – альтернативная субъединица сперматопротеасомы.

гих клеточных процессов, включая прохождение по клеточному циклу, апоптоз, дифференцировку, иммунный ответ, транскрипцию и репарацию ДНК (Wojcik et al., 2000; Pajonk, McBride, 2001; Glickman, Ciechanover, 2002; Kloetzel, 2004; Collins, Tansey, 2006; Maupin-Furlow et al., 2006; Reed, 2006; Sikder et al., 2006; Ferdous et al., 2007). Интерес к изучению про-

теасом значительно возрос с тех пор, как в 2003 г. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) был одобрен первый ингибитор протеасом Velcade (Бортезомиб) для лечения рефрактерной формы множественной миеломы, так как раковые клетки не могут пролиферировать без функциональных протеасом

(Huber, Groll, 2012). Нейродегенеративные заболевания также часто характеризуются накоплением токсичных неправильно свернутых белков, которые в норме должны удаляться протеасомой (Dantuma, Bott, 2014). Таким образом, изучение механизмов модуляции функций протеасомы имеет не только фундаментальный интерес, но и практическую значимость. Одним из важнейших механизмов модуляции функций протеасомы являются посттрансляционные модификации ее субъединиц (Livneh et al., 2016), которые мы подробно рассмотрим в этом обзоре.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПРОТЕАСОМЫ

Протеасома является высоко консервативным белковым комплексом, но все же обладает некоторой вариабельностью. У археи *Thermoplasma acidophilum* протеасома состоит из α - и β -субъединиц только одного типа, и протеолитически активными являются все 7 β -субъединиц, в то время как у клеток эукариот 20S-протеасома представлена различными типами α - и β -субъединиц ($\alpha 1-7$, $\beta 1-7$). Стоит отметить, что вследствие более сложной субъединичной структуры сборка протеасомы в клетках эукариот проходит в строго определенном порядке при участии определенных белков-регуляторов (Budenholzer et al., 2017). Важным моментом является то, что у дрожжей и млекопитающих деградация субстрата также более специфична (Coix et al., 1996), и каталитические центры имеются только у 3 из 7 типов β -субъединиц ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) (Groll et al., 1997). Эти субъединицы обладают активностью по типу каспазы, трипсина и химотрипсина, соответственно (Groll et al., 2005). У млекопитающих 20S-коровый комплекс может ассоциироваться с различными регуляторными частицами, такими как 19S, PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ , PA200 (рис. 1) (Jung et al., 2009). В том случае, если 20S-протеасома присоединяет к себе две различные регуляторные частицы, она называется гибридной (рис. 1). Более того, при воздействии γ -интерферона конститутивные каталитические субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ могут заменяться на альтернативные индуцибельные — $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$, образуя иммунопротеасому, которая чаще всего еще дополнительно присоединяет PA28 $\alpha\beta$ (рис. 1) (Ferrington, Gregerson, 2012; Селенина и др., 2017). Интересно, что эти 3 β -субъединицы необязательно должны замещаться полностью индуцибельными, и это приводит к появлению переходной (intermediate) протеасомы (Drewe et al., 2007). Считается, что более короткие продукты протеолиза, реализуемого иммунопротеасомой, по сравнению с продуктами протеолиза конститутивной протеасомы идеальны для презентации антигенных пептидов на главный комплекс гистосовместимости класса I (Rock, Goldberg, 1999; Tanaka, Kasahara, 1998). В мужских половых

клетках после их дифференцировки в сперматоциты обнаруживаются сперматопротеасомы, которые отличаются наличием альтернативной субъединицы — $\alpha 4s$ (Uechi et al., 2014). Похожим образом дополнительная альтернативная каталитическая субъединица $\beta 5t$ является составной частью тимопротеасомы, которая синтезируется только в эпителиальных клетках коры тимуса (Murata et al., 2008). Кроме этого, в составе тимопротеасомы часто встречаются индуцированные $\beta 1i$ - и $\beta 2i$ -субъединицы. (Murata et al., 2008). Тимопротеасома отличается более низким уровнем химотрипсин-подобной активности и способствует положительной селекции Т-клеток (Murata et al., 2008). В сперматозоидах асидии *Halocynthia roretzi* также встречается особая популяция 26S-протеасом, в которых обнаружен специфичный процессинг 16 аминокислотных остатков с С-конца $\alpha 6$ -субъединицы (Yokota et al., 2011).

В 1993 г. впервые были обнаружены внеклеточные протеасомы в плазме крови человека с помощью метода иммуноферментного анализа (Wada et al., 1993), и впоследствии получили название “циркулирующие протеасомы” или “плазматические протеасомы”. Последующие исследования с помощью электронной микроскопии и масс-спектрометрии показали, что очищенные внеклеточные протеасомы представляют собой интактные 20S-комплексы без регуляторных 19S-частиц с сохраненными пептидазными активностями (Zoeger et al., 2006; Kulichkova et al., 2017; Tsimokha et al., 2017). Функции внеклеточных протеасом до сих пор неизвестны, однако был выявлен повышенный уровень экспорта протеасом во внеклеточное пространство при опухолевой трансформации клеток, гематологических злокачественных новообразованиях и метастазирующей злокачественной меланоме (Sixt, Dahlmann, 2008; Зайкова и др., 2013а). Стоит отметить, что повышенную концентрацию внеклеточных протеасом наблюдали не только в случае онкологических заболеваний, но также и при циррозе печени, остром или хроническом гепатите и жировой инфильтрации печени (Wada et al., 1993). У пациентов с сепсисом, травмами и некоторыми аутоиммунными заболеваниями также наблюдалось повышение концентрации внеклеточных протеасом. Несмотря на большое количество исследований, посвященных анализу концентрации и активности внеклеточных протеасом у пациентов, страдающих тем или иным заболеванием, свойства секретируемых клетками протеасом или механизм их секреции на сегодняшний день не исследованы, что отдалает перспективу использования внеклеточных протеасом в качестве маркеров онкологических и других заболеваний. При этом не исключено, что посттрансляционные модификации

потенциально могут регулировать экспорт протеасом во внеклеточное пространство.

Субъединицы протеасом также могут существовать в различных протеоформах, обусловленных различными посттрансляционными модификациями. Так как взаимодействия биологических молекул основаны на электростатических и гидрофобных силах, даже небольшие различия в заряде между протеасомными субъединицами могут приводить к различиям выполняемых протеасомным комплексом функций. У протеасомных белков были обнаружены такие посттрансляционные модификации как фосфорилирование (Iwafune et al., 2004; Tsimokha et al., 2007; Lu et al., 2008; Артамонова и др., 2014), убиквитинирование (Isasa et al., 2010a; Моисеева и др., 2010; Зайкова и др., 2013б; Zong et al., 2014; Артамонова и др., 2014), сумоилирование (Panse et al., 2004; Scruggs et al., 2012), N^α-ацетилирование (Kimura et al., 2010; Зайкова и др., 2013б; Артамонова и др., 2014), N^α-миристилирование (Kimura et al., 2012), N^α-метилование (Kimura et al., 2013), сукцинирование (Weinert et al., 2013) и другие. Наиболее изучены посттрансляционные модификации 26S-протеасомы *Saccharomyces cerevisiae*. Это обусловлено тем, что дрожжи являются удобными модельными объектами, для которых разработаны методы получения мутантов без определенных посттрансляционных модификаций с целью изучения их функционального значения для клетки.

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ ПРОТЕАСОМЫ

Протеомика по типу “снизу-вверх”, при котором сначала анализируемое вещество (протеом) гидролизуется трипсином (или другим ферментом) и затем подвергается масс-спектрометрическому анализу, является наиболее часто используемым и успешным способом для идентификации посттрансляционных модификаций белков протеасомы. Такой подход, например, был использован при масс-спектрометрическом анализе 26S-протеасом, аффинно очищенных из клеток человека (Wang et al., 2007). Однако при таком подходе некоторые модификации, в том числе фосфорилирование, могут теряться при фрагментации ионов (Guo et al., 2017). Следует отметить, что протеасома является удобным объектом для разработки подходов масс-спектрометрического анализа в силу своего большого размера, сложности своей структуры и биологической значимости для клетки и всего организма в целом. Так, была предложена масс-спектрометрическая платформа, основанная на подходе “сверху-вниз”, при котором анализу подвергается интактный белок и его фрагменты без предварительной трипсинизации (Gersch et al.,

2015). В этом случае субъединицы очищенной протеасомы отделяются друг от друга с помощью обращенно-фазовой хроматографии и затем анализируются с помощью высокоразрешающей электроспрей-ионизационной масс-спектрометрии.

Фосфорилирование является самой изученной посттрансляционной модификацией протеасом. Впервые фосфорилирование протеасомы было обнаружено в 1989 г. у *Drosophila melanogaster* с помощью меченых радиоактивным изотопом ³²P вскоре после открытия самой протеасомы (Haass, Kloetzel, 1989). С помощью таких методов было сложно идентифицировать сайты фосфорилирования, однако появление протеомики, основанной на масс-спектрометрическом анализе, значительно увеличило число известных сайтов фосфорилирования протеасомы. Так, сейчас известно, что у 26S-протеасомы дрожжей и человека все субъединицы фосфорилируются. У 26S-протеасомы человека известно более 450 сайтов фосфорилирования, причем консервативность сайтов фосфорилирования в сравнении с 26S-протеасомой *Saccharomyces cerevisiae* составляет менее 50% (Guo et al., 2017).

Функциональное влияние фосфорилирования протеасомы у дрожжей первоначально изучали путем полного дефосфорилирования очищенного 20S-комплекса щелочной фосфатазой, что приводило к снижению химотрипсин-подобной активности в присутствии SDS (Iwafune et al., 2002). Дефосфорилирование протеасом, очищенных из клеток человека, щелочной фосфатазой также снижало их химотрипсин-подобную активность *in vitro* (Tsimokha et al., 2007). Полное дефосфорилирование 19S-частицы протеасомы дрожжей λ-фосфатазой приводило к 30%-ному снижению АТФ-зной активности (Kikuchi et al., 2010). Обнаружено также, что фосфорилирование субъединицы Rpt6 вовлечено в сборку протеасом, выделенных из клеток сердечной мышцы свиньи, за счет ее взаимодействия с α2-субъединицей 20S-протеасомы (Satoh et al., 2001). Предпринимались попытки изучения влияния фосфорилирования путем сайт-направленного мутагенеза. Замена серина в положениях 243 и 250 α7-субъединицы на аланин и аспарагин нарушала стабильность 26S-протеасомного комплекса крысы (Bose et al., 2004).

Фосфорилирование также оказывает влияние на локализацию протеасом внутри клетки. Показано, что фосфорилирование серина в положении 120 субъединицы Rpt6 киназой SamKII приводит к накоплению протеасом в дендритных шипиках в нейронах крысы (Bingol et al., 2010). В протеасоме человека фосфорилирование тирозина в положении 106 субъединицы α4 киназой c-Abl предотвращало убиквити-

нирование и последующую деградацию $\alpha 4$ (Li et al., 2015).

Недавно обнаружено специфическое фосфорилирование серина в положении 6 субъединицы Rpn3, ассоциированное с увеличением времени полужизни протеасомы в эмбриональных фибробластах мыши (Tomita et al., 2018).

Посттрансляционные модификации лизина. Лизин является наиболее модифицируемой аминокислотой, являясь мишенью для ацетилирования, убиквитинирования, сукцинирования и метилирования. Ацетилирование N-концевой аминокислоты или лизина является одной из часто встречающихся модификаций субъединиц протеасом. Предполагается, что ацетилирование может изменять физико-химические свойства субъединиц протеасом, тем самым, осуществляя, например, модуляцию протеасомной активности. На клетках дрожжей показано, что N^α-ацетилирование $\alpha 3$ -субъединицы регулирует открытие ворот коровой частицы (Kimura et al., 2000), поэтому делеция N-концевой последовательности $\alpha 3$ -субъединицы открывает ворота 20S-протеасомы, позволяя субстрату достичь каталитического центра протеасомы (Groll et al., 2000). Тем не менее, данная модификация не влияет на активность 26S-протеасомы, поскольку 19S-частица поддерживает ворота коровой частицы открытыми (Kimura et al., 2003).

Функции протеасом также регулируются посредством убиквитинирования. У 26S-протеасомы дрожжей моноубиквитинирование убиквитин-рецептора Rpn10 лигазой Rsp5 ингибирует взаимодействие субстрата с протеасомой (Isasa et al., 2010b). Похожим образом, полиубиквитинирование убиквитин-рецептора Rpn13 26S-протеасомы млекопитающих приводит к снижению протеолитической активности протеасомы (Besche et al., 2014). Была выдвинута гипотеза, что функции протеасом могут регулироваться перекрестным взаимовлиянием ацетилирования и убиквитинирования, так как более половины сайтов ацетилирования 20S-протеасомы сердечной ткани человека также могут быть убиквитинированы (Zong et al., 2014). У дрожжей наряду с убиквитинированием, в субъединицах Rpn1, Rpn7, Rpn12 и $\alpha 3$ встречалось сукцинирование (Panse et al., 2004; Scruggs et al., 2012). Перекрестное взаимовлияние ацетилирования и сукцинирования отмечали у 26S-протеасомы дрожжей (Weinert et al., 2013), однако возможные биологические функции сукцинирования до сих пор остаются неизвестными.

Остатки лизина более 10 субъединиц протеасом человека также являются мишенью для SUMO-илирования (Guo et al., 2005; Tatham et al., 2011). Показано, что SUMO-илирование протеасомы влияет на ее рекрутирование в ядерные PML-тельца (Lamoliatte

et al., 2017), а SUMO-илирование субъединицы 19S-регулятора Rpn2 регулирует ассоциацию ее с другой субъединицей Rpn13, что может изменять состав и функцию протеасомы (Ryu et al., 2014).

Функциональное значение метилирования белков протеасомы изучено слабо, известно только то, что метилирование субъединицы Rpt1 протеасомы дрожжей необходимо для роста клеток дрожжей и их устойчивости к окислительному стрессу (Kimura et al., 2013).

Минорные посттрансляционные модификации. В результате большого числа протеомных исследований были обнаружены такие посттрансляционные модификации белков протеасомы, как гликозилирование, поли-АДФ-рибозилирование, 4-гидрокси-2-ноненил-алкилирование, миристилирование и окисление серосодержащих аминокислот белков протеасомы. Интересно, что O-гликозилирование может конкурировать с фосфорилированием по серину и треонину (Sumegi et al., 2003). Гликозилирование субъединицы Rpt2 19S-комплекса снижало ее АТФазную активность и, как следствие, эффективность 26S-протеасомы в протеолизе убиквитинированных субстратов (Zhang et al., 2003). Важно отметить, что N-гликозилирование субъединицы $\beta 7$ по аспарагину в 83-м положении было обнаружено для протеасомы человека (Jia et al., 2009), и, учитывая тот факт, что гликозилирование встречается у одной трети всех секреторируемых белков (Walsh et al., 2005), можно предположить, что эта посттрансляционная модификация может регулировать экспорт внеклеточных протеасом клетками. Если у мышей гликозилирование протеасом изучено слабо – было обнаружено у субъединиц $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ и $\beta 6$ с помощью двумерного электрофореза и окрашиванием ProQ Emerald (Zong et al., 2008), то у дрожжей гликозилирование белков протеасомы не обнаружено вообще.

В культуре клеток миелогенной лейкемии человека K562 обнаруживалось поли-АДФ-рибозилирование протеасомы при добавлении пероксида водорода (Ullrich et al., 1999). При этом поли-АДФ-рибозилированная протеасома эффективно расщепляла поврежденные гистоны. Предполагается, что такая модификация протеасомы может быть связана с защитной системой ядра при избыточном окислении. Еще один пример регуляции активности протеасомы в результате АДФ-рибозилирования показан у дрозофилы и в клетках человека (Cho-Park, Steller, 2013). Так, АДФ-рибозилирование протеасомного ингибитора PI31 резко снижало его сродство к 20S-протеасомным α -субъединицам, что приводило к секвестрации шаперонов, участвующих в сборке 19S-комплекса, способствуя формированию 26S-протеасомы.

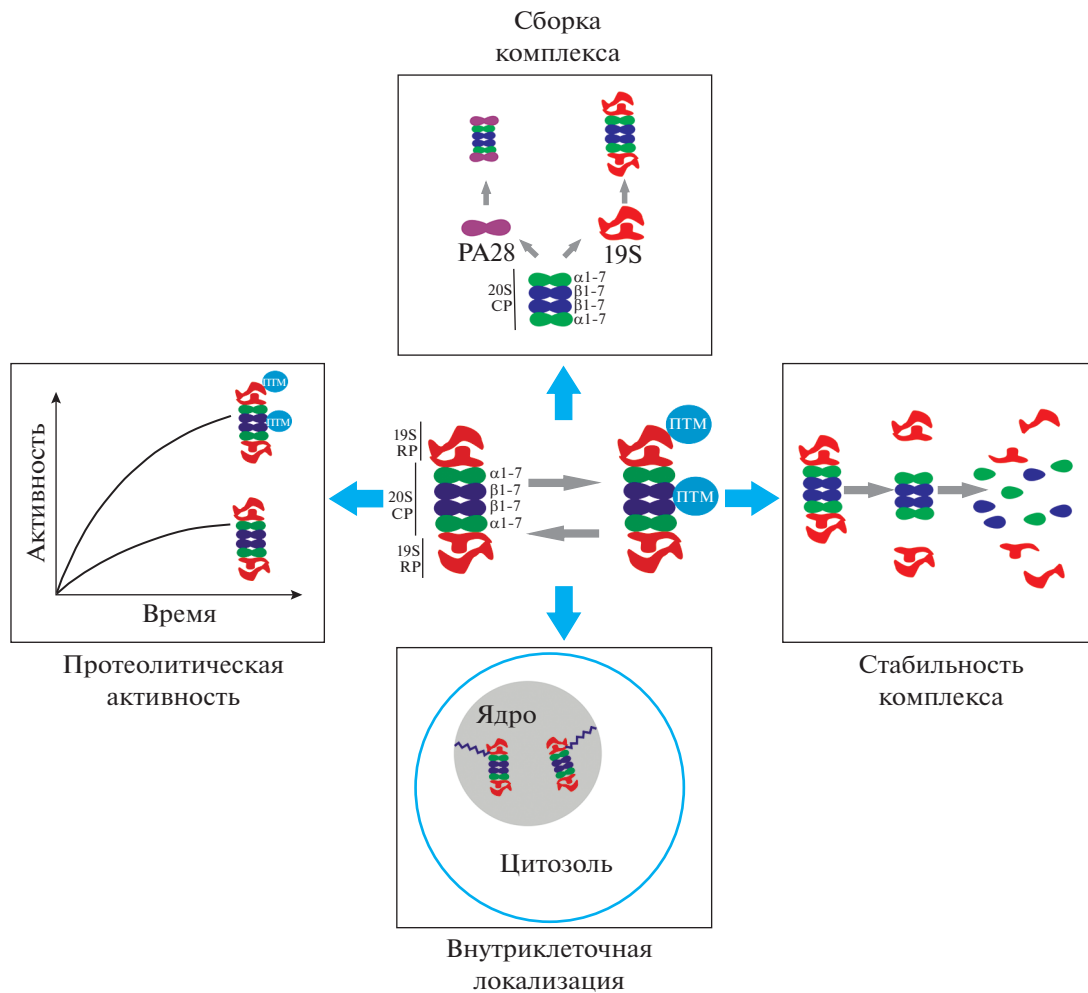


Рис. 2. Посттрансляционные модификации (ПТМ) модулируют функции протеасомы, влияя на его каталитическую активность и субстратную специфичность, сборку комплекса, стабильность комплекса, а также на его внутриклеточную локализацию.

Некоторые из перечисленных выше модификаций также влияют на локализацию протеасом. Например, функцией N^{α} -миристилирования субъединицы Rpt2 протеасомы дрожжей, человека, мышей и риса считается ядерное закоривание, в результате которого находящиеся в ядре протеасомы могут способствовать протеолизу функционально важных ядерных белков (Hirano et al., 2016).

У 26S-протеасом сперматозоидов асцидии *Halosynthia roretzi* был обнаружен специфичный процессинг 16 С-концевых аминокислотных остатков α -субъединицы (Yokota et al., 2011). Предполагается, что С-терминальная последовательность GLVPPVSG, уникальная у *H. roretzi* и *C. intestinalis*, может являться сигнальной последовательностью для транспорта протеасом в акросому и последующего выхода из клетки в ходе акросомной реакции (Yokota et al., 2011).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У протеасомы известно множество различных посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинирование, сукцинирование, миристилирование, гликозилирование, поли-АДФ-рибозилирование и другие, однако, для большинства посттрансляционных модификаций протеасом функциональная значимость до сих пор не определена. Тем не менее, попытки исследовать функциональное значение некоторых посттрансляционных модификаций предпринимались, и мы схематично представили на рис. 2 известные на сегодняшний день функции посттрансляционных модификаций протеасомы. Наиболее полно изучено влияние некоторых посттрансляционных модификаций отдельных субъединиц протеасомы на протеолитическую активность всего протеасом-

ного комплекса. К числу этих модификаций относятся фосфорилирование, убиквитинирование, ацетилирование, гликозилирование и даже АДФ-рибозилирование. Было показано, что фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинирование, гликозилирование, АДФ-рибозилирование протеасомных белков изменяют протеолитическую активность и субстратную специфичность протеасомы. На клеточную локализацию протеасом влияют фосфорилирование, СУМО-илирование, N^α-миристилирование. Сборку и поддержание стабильности протеасомного комплекса модулирует фосфорилирование. Наиболее изучены в функциональном отношении посттрансляционные модификации дрожжей из-за проработанности модельного объекта. Однако с развитием технологии геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9 нуклеазной системы, вероятно, будут предприняты попытки исследовать функциональное значение посттрансляционных модификаций протеасом у млекопитающих. Также следует отметить, что возможно в дальнейшем будут изучены и специфические посттрансляционные модификации субпопуляций протеасом, включая иммунопротеасомы и внеклеточные протеасомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-14-10343, вклад А.С. Цимохи) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-04-01168, вклад Е.Е. Дьяконова).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Артамонова Т.О., Ходорковский М.А., Цимоха А.С. 2014. Масс-спектрометрический анализ аффинно-очищенных протеасом из клеток миелогенной лейкемии человека линии K562. Биоорганическая химия. 40 (6) : 720–734. (Artamonova T.O., Khodorkovskii M.A., Tsimokha A.S. 2014. Mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes from the human myelogenous leukemia K562 cell line. Russ. J. Bioorg. Chem. 40 (6) : 664–678.)
- Зайкова Ю.Я., Евтеева И.Н., Цимоха А.С. 2013а. Протеасомы и их возможная роль во внеклеточном пространстве. Цитология. 55 (11) : 753–760. (Zaikova Yu.Ia., Evteeva I.N., Tsimokha A.S. 2013. Proteasomes and their role in the extracellular space. Tsitologiya. 55 (11) : 753–760.)
- Зайкова Ю.Я., Куличкова В.А., Ермолаева Ю.Б., Боттринл А., Барлев Н.А., Цимоха А.С. 2013б. Характеристика внеклеточных протеасом и ассоциированных с ними белков методом iTRAQ-масс-спектрометрии. Цитология. 55 (2) : 111–122. (Zaikova Y.Y., Kulichkova V.A., Ermolaeva Y.B., Bottrill A., Barlev N.A., Tsimokha A.S. 2013. Characterization of extracellular proteasomes and its interacting proteins by iTRAQ mass spectrometry. Cell Tissue Biol. 7(3): 253–265.)
- Моисеева Т.Н., Фёдорова О.А., Цимоха А.С., Миттенберг А.Г., Барлев Н.А. 2010. Влияние убиквитинилирования на пептидазные активности протеасом при генотоксическом стрессе. ДАН. Биохимия и биофизика 435 (2) : 267–271. (Moiseeva T.N., Fedorova O.A., Tsimokha A.S., Mittenberg A.G., Barlev N.A. 2010. Effect of ubiquitinylation on peptidase proteasome activities during genotoxic stress. Dokl. Biochem. Biophys. 435 (1): 307–311.)
- Селенина А.В., Цимоха А.С., Томилин А.Н. 2017. Протеасомы в регуляции белкового гомеостаза плюрипотентных стволовых клеток. Acta Naturae. 9 : 42–50. (Selenina A.V., Tsimokha A.S., Tomilin A.N. 2017. Proteasomes in protein homeostasis of pluripotent stem cells. Acta Naturae. 9 : 39–47.)
- Besche H.C., Sha Z., Kukushkin N.V., Peth A., Hock E.M., Kim W., Gygi S., Gutierrez J.A., Liao H., Dick L., Goldberg A.L. 2014. Autoubiquitination of the 26S proteasome on Rpn13 regulates breakdown of ubiquitin conjugates. EMBO J. 33 : 1159–1176.
- Bingol B., Wang C.F., Arnott D., Cheng D., Peng J., Sheng M. 2010. Autophosphorylated CaMKIIalpha acts as a scaffold to recruit proteasomes to dendritic spines. Cell. 140 : 567–578.
- Bose S., Stratford F.L., Broadfoot K.I., Mason G.G., Rivett A.J. 2004. Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. Biochem. J. 378 : 177–184.
- Budenholzer L., Cheng C.L., Li Y., Hochstrasser M. 2017. Proteasome structure and assembly. J. Mol. Biol. 429 : 3500–3524.
- Cho-Park P.F., Steller H. 2013. Proteasome regulation by ADP-ribosylation. Cell. 153: 614–627.
- Collins G.A., Tansey W.P. 2006. The proteasome: a utility tool for transcription? Curr. Opin. Genet. Develop. 16 : 197–202.
- Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. Annu. Rev. Biochem. 65 : 801–847.
- Dantuma N.P., Bott L.C. 2014. The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. Front. Mol. Neurosci. 7 : 70.
- Drewe O., Wildgruber R., Zong C., Sukop U., Nissim M., Weber G., Gomes A.V., Ping P. 2007. Mammalian proteasome subpopulations with distinct molecular compositions and proteolytic activities. Mol. Cell. Proteomics: MCP. 6 : 2021–2031.
- Ferdous A., Sikder D., Gillette T., Nalley K., Kodadek T., Johnston S.A. 2007. The role of the proteasomal ATPases and activator monoubiquitylation in regulating Gal4 binding to promoters. Genes Develop. 21 : 112–123.
- Ferrington D.A., Gregerson D.S. 2012. Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 109 : 75–112.
- Gersch M., Hackl M.W., Dubiella C., Dobrinevski A., Groll M., Sieber S.A. 2015. A mass spectrometry platform for a streamlined investigation of proteasome integrity, post-translational modifications, and inhibitor binding. Chem. Biol. 22 : 404–411.
- Glickman M.H., Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiol. Rev. 82 : 373–428.

- Glickman M.H., Rubin D.M., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Baumeister W., Fried V.A., Finley D. 1998. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*. 94 : 615–623.
- Groll M., Bajorek M., Kohler A., Moroder L., Rubin D.M., Huber R., Glickman M.H., Finley D. 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* 7 : 1062–1067.
- Groll M., Bochtler M., Brandstetter H., Clausen T., Huber R. 2005. Molecular machines for protein degradation. *ChemBioChem*. 6 : 222–256.
- Groll M., Ditzel L., Lowe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. 386 : 463–471.
- Guo D., Han J., Adam B.L., Colburn N.H., Wang M.H., Dong Z., Eizirik D.L., She J.X., Wang C.Y. 2005. Proteomic analysis of SUMO4 substrates in HEK293 cells under serum starvation-induced stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337 : 1308–1318.
- Guo X., Huang X., Chen M.J. 2017. Reversible phosphorylation of the 26S proteasome. *Protein Cell*. 8 : 255–272.
- Haass C., Kloetzel P.M. 1989. The *Drosophila* proteasome undergoes changes in its subunit pattern during development. *Exp. Cell Res.* 180 : 243–252.
- Hirano H., Kimura Y., Kimura A. 2016. Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. *J. Proteomics*. 134 : 37–46.
- Huber E.M., Groll M. 2012. Inhibitors for the immuno- and constitutive proteasome: current and future trends in drug development. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51 : 8708–8720.
- Isasa M., Katz E.J., Kim W., Yugo V., Gonzalez S., Kirkpatrick D.S., Thomson T.M., Finley D., Gygi S.P., Crosas B. 2010a. Monoubiquitination of RPN10 regulates substrate recruitment to the proteasome. *Mol. Cell*. 38 : 733–745.
- Iwafune Y., Kawasaki H., Hirano H. 2002. Electrophoretic analysis of phosphorylation of the yeast 20S proteasome. *Electrophoresis*. 23 : 329–338.
- Iwafune Y., Kawasaki H., Hirano H. 2004. Identification of three phosphorylation sites in the alpha7 subunit of the yeast 20S proteasome in vivo using mass spectrometry. *Arch. Biochem. Biophys.* 431 : 9–15.
- Jia W., Lu Z., Fu Y., Wang H.P., Wang L.H., Chi H., Yuan Z.F., Zheng Z.B., Song L.N., Han H.H., Liang Y.M., Wang J.L., Cai Y., Zhang Y.K., Deng Y.L., Ying W.T., He S.M., Qian X.H. 2009. A strategy for precise and large scale identification of core fucosylated glycoproteins. *Mol. Cell Proteomics: MCP*. 8 : 913–923.
- Jung T., Catalgol B., Grune T. 2009. The proteasomal system. *Mol. Aspects Med.* 30 : 191–296.
- Kikuchi J., Iwafune Y., Akiyama T., Okayama A., Nakamura H., Arakawa N., Kimura Y., Hirano H. 2010. Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast. *Proteomics*. 10 : 2769–2779.
- Kimura A., Kato Y., Hirano H. 2012. N-myristoylation of the Rpt2 subunit regulates intracellular localization of the yeast 26S proteasome. *Biochemistry*. 51 : 8856–8866.
- Kimura Y., Kurata Y., Ishikawa A., Okayama A., Kamita M., Hirano H. 2013. N-terminal methylation of proteasome subunit Rpt1 in yeast. *Proteomics*. 13 : 3167–3174.
- Kimura Y., Nagata K., Suzuki N., Yokoyama R., Yamanaka Y., Kitamura H., Hirano H., Ohara O. 2010. Characterization of multiple alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis. *Proteomics*. 10 : 3884–3895.
- Kimura Y., Saeki Y., Yokosawa H., Polevoda B., Sherman F., Hirano H. 2003. N-Terminal modifications of the 19S regulatory particle subunits of the yeast proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 409 : 341–348.
- Kimura Y., Takaoka M., Tanaka S., Sassa H., Tanaka K., Polevoda B., Sherman F., Hirano H. 2000. N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 275 : 4635–4639.
- Kloetzel P.M. 2004. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim. Biophys. Acta*. 1695 : 225–233.
- Konstantinova I.M., Tsimokha A.S., Mittenberg A.G. 2008. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 267 : 59–124.
- Kulichkova V.A., Artamonova T.O., Lyublinskaya O.G., Khodorkovskii M.A., Tomilin A.N., Tsimokha A.S. 2017. Proteomic analysis of affinity-purified extracellular proteasomes reveals exclusively 20S complexes. *Oncotarget*. 8 : 102134–102149.
- Lamoliatte F., McManus F.P., Maarifi G., Chelbi-Alix M.K., Thibault P. 2017. Uncovering the SUMOylation and ubiquitylation crosstalk in human cells using sequential peptide immunopurification. *Nat. Commun.* 8 : 14109.
- Li D., Dong Q., Tao Q., Gu J., Cui Y., Jiang X., Yuan J., Li W., Xu R., Jin Y., Li P., Weaver D.T., Ma Q., Liu X., Cao C. 2015. c-Abl regulates proteasome abundance by controlling the ubiquitin-proteasomal degradation of PSMA7 subunit. *Cell reports*. 10 : 484–496.
- Livneh I., Cohen-Kaplan V., Cohen-Rosenzweig C., Avni N., Ciechanover A. 2016. The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res.* 26 : 869–885.
- Lowe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W., Huber R. 1995. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*. 268 : 533–539.
- Lu H., Zong C., Wang Y., Young G.W., Deng N., Souda P., Li X., Whitelegge J., Drews O., Yang P.-Y., Ping P. 2008. Revealing the dynamics of the 20 S proteasome phosphoproteome: a combined CID and electron transfer dissociation approach. *Mol. Cell Proteomics: MCP*. 7 : 2073–2089.
- Maupin-Furlow J.A., Humbard M.A., Kirkland P.A., Li W., Reuter C.J., Wright A.J., Zhou G. 2006. Proteasomes from structure to function: perspectives from Archaea. *Curr. Top. Develop. Biol.* 75 : 125–169.
- Murata S., Takahama Y., Tanaka K. 2008. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr. Opin. Immunol.* 20 : 192–196.

- Pajonk F., McBride W.H. 2001. The proteasome in cancer biology and treatment. *Radiat. Res.* 156 : 447–459.
- Panse V.G., Hardeland U., Werner T., Kuster B., Hurt E. 2004. A proteome-wide approach identifies sumoylated substrate proteins in yeast. *J. Biol. Chem.* 279 : 41346–41351.
- Reed S.I. 2006. The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control. *Results Probl. Cell Differ.* 42 : 147–181.
- Rock K.L., Goldberg A.L. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17 : 739–779.
- Ryu H., Gygi S.P., Azuma Y., Arnaoutov A., Dasso M. 2014. SUMOylation of Psmd1 controls Adrm1 interaction with the proteasome. *Cell Rep.* 7 : 1842–1848.
- Satoh K., Sasajima H., Nyomura K.I., Yokosawa H., Sawada H. 2001. Assembly of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase subunit. *Biochemistry.* 40 : 314–319.
- Scruggs S.B., Zong N.C., Wang D., Stefani E., Ping P. 2012. Post-translational modification of cardiac proteasomes: functional delineation enabled by proteomics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303 : H9–18.
- Seemuller E., Lupas A., Stock D., Lowe J., Huber R., Baumeister W. 1995. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science.* 268 : 579–582.
- Sikder D., Johnston S.A., Kodadek T. 2006. Widespread, but non-identical, association of proteasomal 19 and 20S proteins with yeast chromatin. *J. Biol. Chem.* 281 : 27 346–27 355.
- Sixt S.U., Dahlmann B. 2008. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin – incidence and relevance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1782 : 817–823.
- Sumegi M., Hunyadi-Gulyas E., Medzihradzsky K.F., Udvardy A. 2003. 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 : 1284–1289.
- Tanaka K., Kasahara M. 1998. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol. Rev.* 163 : 161–176.
- Tatham M.H., Matic I., Mann M., Hay R.T. 2011. Comparative proteomic analysis identifies a role for SUMO in protein quality control. *Sci. Signal.* 4 : rs4.
- Tomita T., Hirayama S., Sakurai Y., Ohte Y., Yoshihara H., Saeki Y., Hamazaki J., Murata S. 2018. Specific modification of aged proteasomes revealed by tag-exchangeable knock-in mice. *Mol. Biol. Cell.* 39 : e00426–18.
- Tsimokha A.S., Mittenberg A.G., Kulichkova V.A., Kozhukharova I.V., Gause L.N., Konstantinova I.M. 2007. Changes in composition and activities of 26S proteasomes under the action of doxorubicin–apoptosis inductor of erythroleukemic K562 cells. *Cell Biol. Int.* 31 : 338–348.
- Tsimokha A.S., Zaykova J.J., Bottrill A., Barlev N.A. 2017. Extracellular proteasomes are deficient in 19S subunits as revealed by iTRAQ quantitative proteomics. *J. Cell Physiol.* 232 : 842–851.
- Uechi H., Hamazaki J., Murata S. 2014. Characterization of the testis-specific proteasome subunit alpha4s in mammals. *J. Biol. Chem.* 289 : 12365–12374.
- Ullrich O., Reinheckel T., Sitte N., Hass R., Grune T., Davies K.J. 1999. Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 : 6223–6228.
- Verma R., Aravind L., Oania R., McDonald W.H., Yates J.R., 3rd, Koonin E.V., Deshaies R.J. 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science.* 298 : 611–615.
- Wada M., Kosaka M., Saito S., Sano T., Tanaka K., Ichihara A. 1993. Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiological significance. *Transl. Res.* 121 : 215–223.
- Walsh C.T., Garneau-Tsodikova S., Gatto G.J., Jr. 2005. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem.* 44 : 7342–7372.
- Wang X., Chen C.F., Baker P.R., Chen P.L., Kaiser P., Huang L. 2007. Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex. *Biochemistry.* 46 : 3553–3565.
- Weinert B.T., Scholz C., Wagner S.A., Iesmantavicius V., Su D., Daniel J.A., Choudhary C. 2013. Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. *Cell Rep.* 4 : 842–851.
- Wojcik C., Bury M., Stoklosa T., Giermasz A., Feleszko W., Mlynarczyk I., Pleban E., Basak G., Omura S., Jakobisiak M. 2000. Lovastatin and simvastatin are modulators of the proteasome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32 : 957–965.
- Yao T., Cohen R.E. 2002. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature.* 419 : 403–407.
- Yokota N., Kataoka Y., Hashii N., Kawasaki N., Sawada H. 2011. Sperm-specific C-terminal processing of the proteasome PSMA1/alpha6 subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410 : 809–815.
- Zhang F., Su K., Yang X., Bowe D.B., Paterson A.J., Kudlow J.E. 2003. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell.* 115 : 715–725.
- Zoeger A., Blau M., Egerer K., Feist E., Dahlmann B. 2006. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clin. Chem.* 52 : 2079–2086.
- Zong C., Young G.W., Wang Y., Lu H., Deng N., Drews O., Ping P. 2008. Two-dimensional electrophoresis-based characterization of post-translational modifications of mammalian 20S proteasome complexes. *Proteomics.* 8 : 5025–5037.
- Zong N., Ping P., Lau E., Choi H.J., Ng D.C., Meyer D., Fang C., Li H., Wang D., Zelaya I.M., Yates J.R., 3rd, Lam M.P. 2014. Lysine ubiquitination and acetylation of human cardiac 20S proteasomes. *Proteomics Clin. Appl.* 8 : 590–594.

THE PROTEASOME POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS AND THEIR FUNCTIONAL SIGNIFICANCE

E. E. Diakonov^{a,*} and A. S. Tsimokha^{a,}**

^aInstitute of Cytology, RAS, Saint Petersburg, 194064, Russia

**E-mail: e.diakonov@incras.ru*

***E-mail: atsimokha@incras.ru*

The proteasome degrades most intracellular proteins in a ubiquitin-dependent manner and is considered a convenient and important eukaryotic model protein complex to study post-translational modifications. It is known that proteasome post-translational modifications regulate its proteolytic activity, substrate specificity, cell localization, assembly and maintenance of the complex stability. Phosphorylation and acetylation account for the largest number of the proteasome post-translational modifications, however, the functional significance for most of the known sites remains unexplored. It should be noted that no study of specific post-translational modifications of proteasome subpopulations, including immunoproteasomes and extracellular proteasomes, has yet been carried out. This review describes the proteasome post-translational modifications with known functional significance.

Keywords: proteasome, ubiquitin-proteasome system, post-translational modifications