

УДК 577.112.389.4

Химические и функциональные аспекты посттрансляционной модификации белков

Д. Г. Кнорре, Н.В. Кудряшова, Т.С. Годовикова*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8

*E-mail: godov@niboch.nsc.ru

РЕФЕРАТ В обзоре рассмотрены химические и функциональные аспекты посттрансляционной модификации белков, получаемые присоединением различных групп к боковым радикалам аминокислотных остатков полипептидного остова белков. Описаны основные простетические группы и на примере пиридоксалевого катализа показано взаимодействие этих групп и апофермента в каталитическом акте. Значительное внимание уделено участию посттрансляционной модификации белков в регуляции биохимических процессов в живых организмах, в особенности роль протеинкиназ и взаимосвязанных с ними фосфатаз. Описаны реакции метилирования и ацетилирования и их роль в «гистоновом коде», управляющем на стадии транскрипции экспрессией генома. Рассмотрены процессы модификации белков объемными гидрофобными радикалами и их значение для функционирования белков, связанных с мембранами. Большое внимание уделено процессам гликозилирования белков, ведущего к образованию гликопротеинов. Приведены основные процессы неферментативной модификации белков – гликирование, гомоцистеинилирование и дезамидирование остатков амидов дикарбоновых кислот.

Ключевые слова: белки, ферменты, посттрансляционная модификация, простетические группы, фосфорилирование, регуляция, передача сигналов, ацилирование, алкилирование, убиквитилирование, гистоновый код, неферментативная модификация.

Список сокращений: CoA – кофермент А, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, JNK – Jun N-terminal kinase (N-концевая киназа Jun), SAPK – Stress Activated Protein Kinase (протеинкиназа, активируемая стрессом), MAPK – мутаген-активируемая протеинкиназа, ИФ – инозитолтрифосфат, ДАГ – диацилглицерин, JAK – «Янус-киназы», STAT (от англ. Sinal Transducer and Activator of Transcription – переносчик сигнала и активатор транскрипции), Fyn, Lck – нерцепторные тирозинкиназы семейства Src, Ub – остаток убиквитина, УПБ – убиквитин-подобный белок, Ras, Rab, Rho – продукты протоонкогенов *ras*, *rab*, *rho*, участвующие в процессах роста и дифференцировки клеток, SAM – S-аденозилметионина, PARP – поли(ADP-рибозо)полимераза, VRAP – теломераза, обнаруженная в составе «vault»-частиц, GSH – глутатион, HIF – фактор, индуцируемый при гипоксии, Gla – γ -карбоксиглутаминовая кислота, AGE – advanced glycation end products (продукты конечного гликирования белков), CML – N_ϵ -карбоксиметил-лизин, CEL – N-карбоксиэтил-лизин, HSA – человеческий сывороточный альбумин, GFP – green fluorescent protein (зеленый флуоресцирующий белок), PIMT – протеинизоаспартил-O-метилтрансфераза, DNT – дермонекротический токсин.

ВВЕДЕНИЕ

Матричный биосинтез полипептидных цепей на рибосомах в большинстве случаев не приводит непосредственно к функционально значимому белку. Образовавшаяся полипептидная цепь должна претерпеть некоторые дополнительные химические превращения, в подавляющем большинстве случаев ферментативные, уже вне рибосомы. Так как эти превращения происходят после того, как считана информация, привнесенная матричной РНК (мРНК), т.е. закончена трансляция мРНК, то эти дополнительные процессы получили название посттрансляционной модификации.

Можно выделить две основные группы процессов посттрансляционной модификации белков. Одна из них – это протеолизические процессы, главным образом представляющие собой расщепление определенных пептидных связей, которое приводит к отщеплению части образовавшихся пептидных фрагментов. Вторая группа – это процессы, которые приводят к химической модификации боковых радикалов аминокислотных остатков, как правило, не затрагивающих полипептидного остова. Их химическая природа и функциональное значение весьма разнообразны. При этом каждый тип модификации характерен для определенных групп аминокислотных остатков. В результате этих процессов протеома клетки или организма по числу ее компонентов на порядки превосходит число генов, кодирующих белки протеомы. Настоящий обзор посвящен

именно второй группе процессов посттрансляционной модификации белков.

Существуют четыре основные группы функций белков, требующих посттрансляционной модификации боковых радикалов. Для проявления функциональной активности ряда белков необходимо наличие в их составе определенных ковалентно связанных с полипептидной цепью простетических групп, как правило, сложных органических молекул, непосредственно участвующих в проявлениях этой активности. К такому типу модификаций относится превращение каталитически неактивных апобелков в ферменты. Другая важная группа посттрансляционных модификаций обеспечивает регуляцию биохимических процессов, изменяя (в предельном случае включая или выключая) активность фермента. Еще одна большая группа модификаций вводит в белки метки, обеспечивающие определенную внутриклеточную локализацию белков, в т.ч. направление их в протеосомы для последующего переваривания. Наконец, некоторые процессы посттрансляционной модификации непосредственно или косвенно отвечают за формирование определенной пространственной структуры белка.

МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ ПУТЕМ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ПРОСТЕТИЧЕСКИХ ГРУПП

В некоторых случаях конечной стадией биосинтеза функционального активного белка является ковалентное присоединение простетической группы, участвующей в фор-

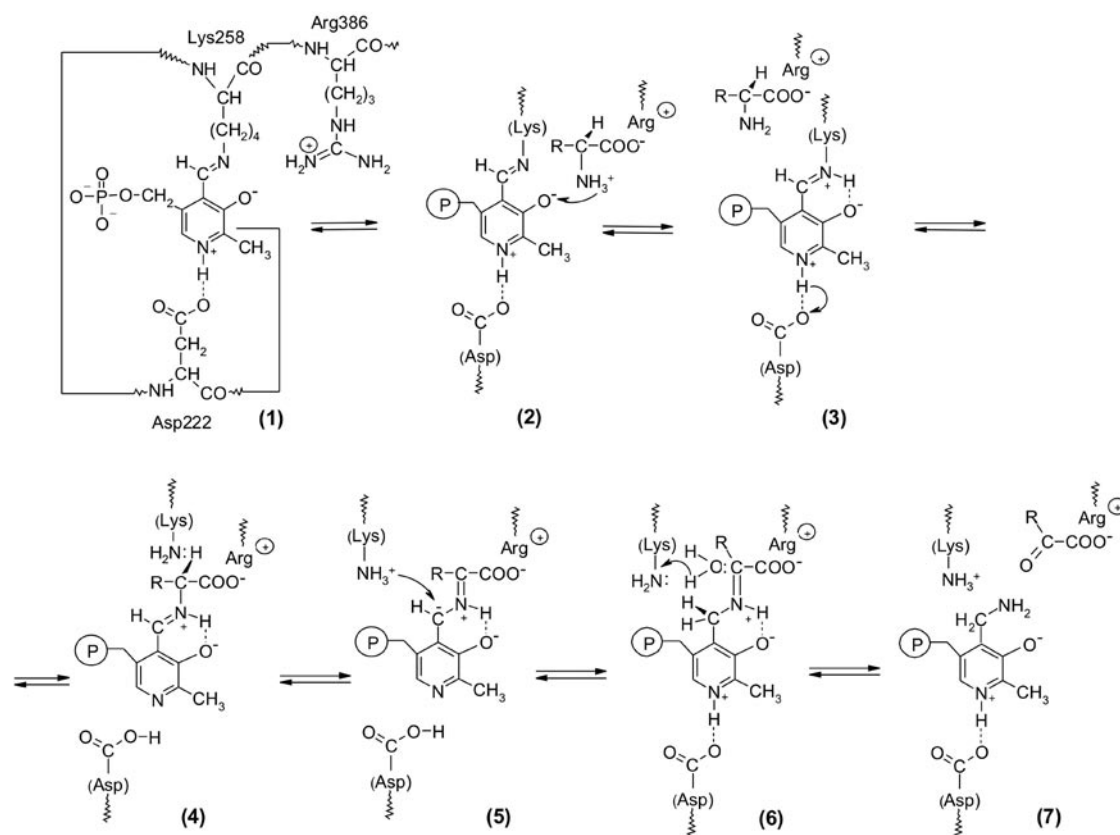


Рис. 1. Схема первой стадии реакции переаминирования, катализируемой аспарат аминотрансферазой

мировании активного центра фермента [1, 2]. В табл. 1 приведены структурные формулы продуктов модификации боковых радикалов аминокислот при ковалентном присоединении некоторых коферментов к белкам, а также тип реакций, в которых принимают участие соответствующие простетические группы.

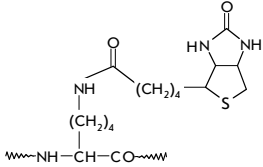
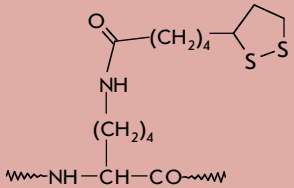
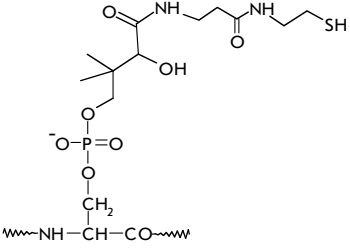
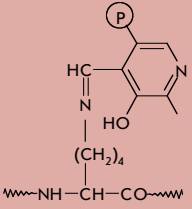
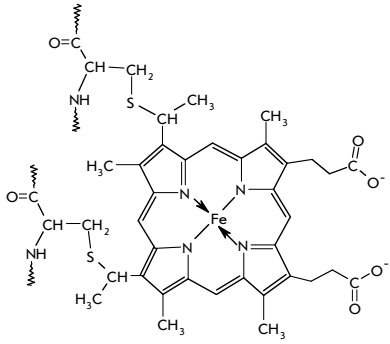
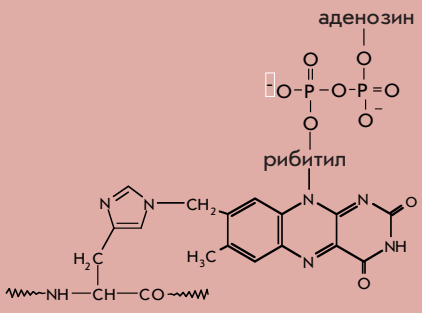
Большинство приведенных простетических групп остаются ковалентно связанными с апоферментом на протяжении всего каталитического процесса. Исключением являются лишь пиридоксальные ферменты, у которых при функционировании на определенном этапе происходит демодификация белка, а именно замена связи пиридоксальфосфата с аминогруппой лизина апофермента на связь кофермента с аминокислотой-субстратом. Динамическая модель процессов для реакций, катализируемых трансминазами, была предложена М.Я. Карпейским и В.И. Ивановым в 1969 г. [3]. Немного позднее авторами [4] была выдвинута интересная гипотеза, согласно которой фосфатная и метильная группы кофермента служат своего рода осью, вокруг которой пиридоксаль может поворачиваться, образуя или фермент-иминные или субстрат-иминные ковалентные структуры. Данные рентгеноструктурного анализа подтвердили и конкретизировали вывод о многоточечном характере связывания пиридоксальфосфата.

В качестве иллюстрации можно привести механизм действия пиридоксального фермента аспарат аминотрансферазы (К.Ф.2.6.1.1), катализирующей реакцию переаминирования между оксалоацетатом и глутаматом (рис. 1).

Кофермент в трансминазе присутствует не в виде свободного альдегида, а в виде внутреннего альдимины с боковой аминогруппой лизина (Lys-258). Связанный с ферментом имин обеспечивает более быстрый путь протекания реакции, чем свободный пиридоксальфосфат [2-4]. Именно структура определяет более высокую активность имино по сравнению с соответствующими альдегидами. Более основной азот иминов протонируется гораздо сильнее, чем кислород карбонильной группы (рис. 1, (3)). В результате переноса протона от α -NH₃⁺-группы субстрата на атом N-альдимины пиридоксальфосфата образуются требуемые для протекания реакции катионная форма кофермента и одновременно депротонированная аминокислота (3). Кроме того, иминный углерод более электрофилен, чем карбонильный, следовательно, он легче атакуется депротонированной аминогруппой α -аминокислоты (рис. 1, (4)). Увеличение электрофильности данного центра обеспечивается также через взаимодействие азота гетероцикла с остатком аспартата фермента (водородная связь с остатком Asp-222). Таким образом, промежуточный фермент-имин способствует быстрому образованию ковалентного промежуточного соединения между субстратом и коферментом.

На приведенном примере пиридоксального катализа видно, что наряду с простетической группой в каталитическом акте важную роль играет и апофермент, т.е. последний нельзя рассматривать только как носитель каталитической группы. Это, конечно, касается и других простетических групп.

Таблица 1. Основные простетические группы, участвующие в реакциях биокатализа

Название кофермента	Структура производного простетической группы	Классы ферментов. Тип реакции, в которой участвует простетическая группа
Биотин		Карбоксилазы. К.Ф. 6.4.1.2; 6.4.1.3. Карбоксилирование. Перенос одноуглеродного фрагмента в виде CO ₂ на ацетилСоА, пропионилСоА и другие органические молекулы.
Липоат		Ацилтрансферазы. К.Ф. 2.3.1.12. Окисление-восстановление. Перенос углеродных фрагментов на СоА через восстановительное ацилирование липоамида в процессах окислительного декарбоксилирования α-кетокислот.
Пантотенат		Ацилтрансферазы. К.Ф. 2.3.1.85. Трансацелирование. Перенос ацильного фрагмента от одного фермента мультферментного комплекса к другому.
Пиридоксаль фосфат		Аминотрансферазы. К.Ф.2.6.1. Трансаминирование аминокислот.
Гем		Цитохром с оксидаза. К.Ф. 1.9.3.1. Окисление-восстановление. Перенос электронов в мембране митохондрий при окислительном фосфорилировании.
FAD		Оксидоредуктазы. К.Ф. 1.3.99.1. Окисление-восстановление. Окисление группы -CH ₂ -CH ₂ - до транс-CH=CH-

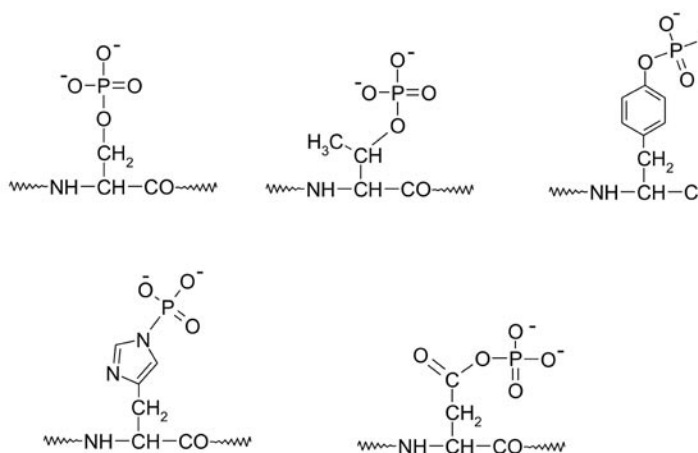


Рис. 2. Структура фосфорилированных аминокислотных фрагментов

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ФОСФОРИРОВАНИЕМ

Главную роль в осуществлении реакций, которые отвечают за перестройку всех процессов внутри клетки, приводящих, в конце концов, к ее делению или гибели, играет большая группа специальных ферментов – протеинкиназ (подкласс фосфотрансфераз, К.Ф. 2.7.), присоединяющих фосфатные группы к боковым радикалам аминокислот различных белков [5–12]. Донором фосфата во всех таких реакциях является γ -фосфат АТФ. Различают киназы, присоединяющие фосфат к аминокислоте тирозину (тирозинкиназы, К.Ф. 2.7.10.2) или к аминокислотам треонину и серину (серин-треонинкиназы, К.Ф. 2.7.11.1) [5]. У бактерий, растений и грибов широко распространены гистидиновые киназы, которые работают как часть двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции [13]. Остаток неорганического фосфата, присоединенный к собственному остатку гистидина, затем переносится на остаток аспартата белка-мишени. Фосфорилирование аспартата приводит к дальнейшей передаче сигнала [13]. На рис. 2 приведены структуры продуктов фосфорилирования аминокислотных остатков в белках [1].

Согласованная регуляция взаимодействия многоклеточного организма осуществляется путем высвобождения специальных молекул (гормонов, цитокинов и т.п.), которые вызывают сигнальный каскад в клетках-мишенях. В тех случаях, когда сигнал вызывает изменение уровня экспрессии определенных генов, конечным звеном каскада оказываются факторы транскрипции [14–18]. Клетки-мишени отличают соответствующую сигнальную молекулу от множества других молекул благодаря наличию на клетке-мишени соответствующего белка-рецептора со специфическим центром связывания с сигнальной молекулой. Одни рецепторы располагаются на поверхности клеточной мембраны, другие, внутриклеточные, локализованы в цитозоле или ядре клетки. На схеме (рис. 3) представлены основные этапы передачи, например, гормональных сигналов через мембранные рецепторы, на отдельных стадиях которых активность ферментов регулируется через их модификацию путем фосфорилирования.



Рис. 3. Основные этапы передачи сигналов с помощью фосфорилирования белков. ИФ – инозитолтрифосфат, ДАГ – диацилглицерин

В структуре мембранных рецепторов можно выделить три функционально разных участка. Первый домен (домен узнавания) расположен в N-концевой части полипептидной цепи на внешней стороне клеточной мембраны; он содержит гликозилированные участки и обеспечивает узнавание и связывание сигнальной молекулы. Второй домен – трансмембранный. У рецепторов одного типа, сопряженных с G-белками, он состоит из 7 плотно упакованных α -спиральных полипептидных последовательностей. У рецепторов другого типа трансмембранный домен включает только одну α -спирализованную полипептидную цепь. Третий (цитоплазматический) домен создает химический сигнал в клетке, который сопрягает узнавание и связывание сигнальной молекулы с определенным внутриклеточным ответом.

Цитоплазматический участок ряда рецепторов на внутренней стороне мембраны обладает тирозинкиназной активностью. Например, связывание гормона инсулина с мембранным рецептором, который является тирозинкиназой и имеет центр фосфорилирования, инициирует ауто-

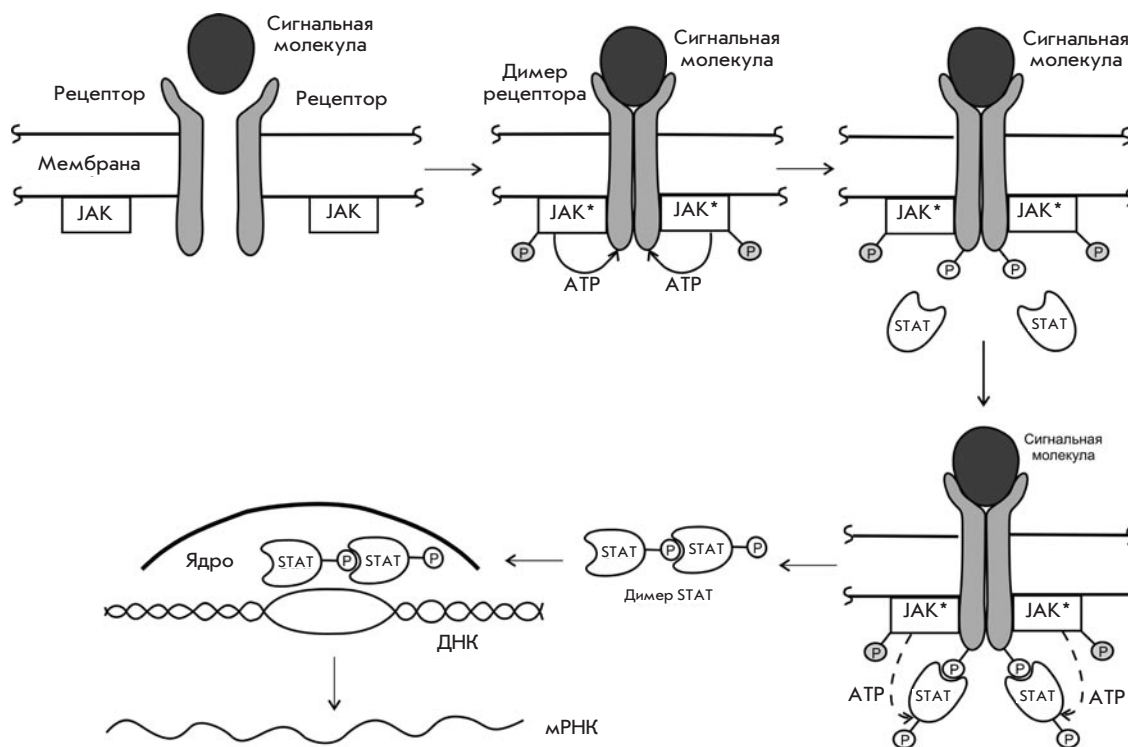


Рис. 4. Схема передачи сигнала через мембранные рецепторы, ассоциированные с JAK

фосфорилирование и последующее фосфорилирование субстратов рецептора и других белков [10]. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) относится к семейству рецепторов фактора роста, которые связывают внеклеточные белковые лиганды и обладают также тирозинкиназными активностями [14]. После связывания лиганда рецептор димеризуется, происходит самофосфорилирование по пяти остаткам тирозина на С-конце рецептора, и белок приобретает внутриклеточную тирозинкиназную активность. Последующая активность EGFR связана с инициацией каскада сигнальной трансдукции, при которой активируются митоген-активируемые протеинкиназы, протеинкиназа B, JNK (Jun N-terminal kinase) или Stress Activated Protein Kinase (SAPK) – семейство MAP-киназ. Это приводит к синтезу ДНК и пролиферации [11, 12, 18–20].

Цитоплазматические участки других рецепторов (гормона роста, пролактина, цитокинов и др.) сами не проявляют тирозинкиназную активность, а ассоциируются с другими цитоплазматическими протеинкиназами (т.н. «Янус-киназами», или киназами семейства JAK), которые их фосфорилируют и, таким образом, активируют [11, 18]. Отличительной чертой семейства Янус-киназ среди всех тирозинкиназ млекопитающих является существование тандема киназного (JH1) и псевдокиназного (JH2) доменов. Наличие последнего и определяет название Янус-киназ, поскольку они среди всех тирозинкиназ млекопитающих имеют псевдокиназный домен, т.е. как двуликий Янус эти киназы также имеют «два лица». В псевдокиназном домене, хотя он и имеет полное сходство с киназными доменами, полностью отсутствуют остатки, отвечающие за фосфотрансферную активность. Функция данного домена, по-видимому, заключается в регуляции каталитической активности.

Связывание сигнальных молекул с рецепторами, как предполагают, приводит к запуску сигнализации посредством гомо- или гетеродимеризации субъединиц рецептора, которые устанавливаются напротив Янус-киназ, что вызывает аутофосфорилирование последних и приводит к повышению их каталитической активности. После активации Янус-киназ они фосфорилируют субъединицы рецептора по остаткам тирозина, в результате чего рецептор связывается с другими белками, например с переносчиками сигнала и активаторами транскрипции STAT (от англ. Signal Transducer and Activator of Transcription). Эти белки (STAT) затем фосфорилируются с помощью Янус-киназ, образуют димеры, транспортируются в ядро, связываясь со специфическими участками ДНК, участвуют в регуляции транскрипции (рис. 4).

Митоген-активируемые киназы (МАРК, К.Ф. 2.7.11.24) отвечают на внеклеточные стимулы (митогены) и регулируют многие клеточные процессы (экспрессию генов, деление, дифференцировку и апоптоз) [11, 17–20]. Такой сигнальный MAP-каскад консервативен для эукариот от дрожжей до млекопитающих.

Активность серин/треонин протеинкиназ регулируется несколькими событиями, например, повреждениями ДНК, а также некоторыми химическими сигналами, в т.ч. сAMP, сGMP, диацилглицеролом, Ca²⁺ кальмодулином [5, 8, 21–24]. Данные протеинкиназы фосфорилируют остатки серина или треонина в консенсусных последовательностях, которые образуют фосфоакцепторный сайт. Эта последовательность остатков аминокислот в молекуле субстрата позволяет осуществлять контакт каталитической щели протеинкиназы с фосфорилируемой областью, что делает киназу специфичной не к какому-либо определенному

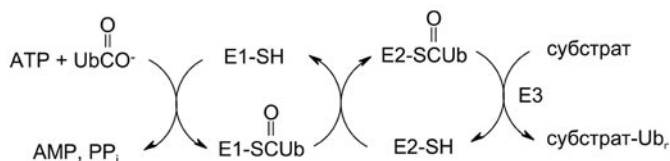


Рис. 5. Схема введения остатка (остатков) убиквитина в белок-субстрат. E1-SH – убиквитин-активирующий фермент, E2-SH – убиквитин-переносящий белок, E3 – убиквитин-протеин лигаза. Ub – остаток убиквитина

субстрату, а к специфичному семейству белков с одинаковыми консенсусными последовательностями. В то время как каталитические домены этих протеинкиназ высококонсервативны, последовательности узнавания отличаются, обуславливая узнавание разных субстратов. К протеинкиназам, регулируемым вторичными посредниками гормонального сигнала, относятся протеинкиназы A, B, C, G, кальмодулинзависимые протеинкиназы и др.

Реакция фосфорилирования может происходить не по одному положению в молекуле белка, а по множеству сайтов, при этом фосфорилированию подвергаются функциональные группы различных остатков аминокислот [25–28]. Множественное фосфорилирование характерно, например, для РНК-полимеразы II эукариот (К.Ф. 2.7.7.6) [28]. У этого фермента С-концевой домен большой субъединицы содержит большое количество (у млекопитающих 52 копии, у дрожжей – 26–27 копий) повторяющихся гептапептидных последовательностей консенсусного состава Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Множественное фосфорилирование этих повторов по остаткам серина и треонина способствует связыванию с ферментом большого числа транскрипционных факторов элонгации и ассоциированных с ними белков, что необходимо для перехода фермента из преиницирующего транскрипционного комплекса в устойчивый элонгирующий комплекс [29], обеспечивающий движение РНК-полимеразы по ДНК в составе хроматина.

АЦЕТИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Одним из широко представленных видов посттрансляционной модификации белков, имеющих важное регуляторное значение, является ацетилирование [30–38]. Реакция проходит по ε-аминогруппам остатков лизина, донором ацильных групп является ацилкофермент А. При этом исчезает положительный заряд, что приводит к перераспределению заряда всей белковой молекулы, увеличению гидрофобности и размера боковой цепи модифицированной аминокислоты. Это, в частности, служит сигналом связывания с гистонами транскрипционных факторов и ассоциированных белков, т.е. инициации процесса транскрипции. Существенную роль в этом связывании играет наличие в ацетилируемых белках т.н. бромодомена, консервативно-модуля из 110 аминокислотных остатков [30, 31].

Процесс наиболее полно изучен на примере гистонов [32–38]. Селективное ацетилирование некоторых остатков лизина обеспечивает специфичное средство хроматина к определенным факторам транскрипции и, таким образом, предопределяет, какие гены будут экспрессироваться.

Поэтому распределение точек ацетилирования по гистонам и по их аминокислотным остаткам является важным фактором регуляции транскрипции хроматина, и обычно рассматривается один из элементов «гистонового кода», регулирующего этот процесс. В целом под «гистоновым кодом» подразумевается весь набор модификаций аминокислотных остатков в N- и С-концевых последовательностях гистонов (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, ADP-рибозилирование), определяющий функциональное состояние гена в отношении процессов репликации и транскрипции [33–38].

Разные формы гистон-ацетилтрансферазы (К.Ф. 2.3.1.48) катализируют ацетилирование остатков лизина, расположенных в строго специфических позициях в составе белка. Так, в октамерном ядре нуклеосомы, содержащем по две копии гистонов H2A, H2B, H3 и H4, существует 30 консервативных остатков лизина в N-концевой части белка, способных ацетилироваться (остатки в положениях 5, 9 в H2A, остатки 5, 12, 15, 20 в H2B, остатки 9, 14, 18, 23, 27 в H3, и остатки 5, 8, 12, 16) [39]. В зависимости от количества и места расположения модифицированной аминокислоты получается огромное число комбинаций распределения ацетилированных остатков, что играет важную роль в функционировании хроматина. Например, ацетилирование остатка Lys-18 в гистоне H3 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* является основным признаком активной транскрипции хроматина – с этим модифицированным остатком связывается наибольшее количество транскрипционных факторов. Для активации транскрипции генов интерферона β в клетках человека необходимо ацетилирование Lys-8 в гистоне H4 и Lys-14 в гистоне H3 [39].

Найдено, что ацетилирование остатков лизина в С-концевых участках белков защищает белок от модификации убиквитином, увеличивая время жизни и функционирования данного белка [40].

АЦИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ ОСТАТКАМИ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Из процессов модификации остатками высших жирных кислот чаще всего встречаются миристоилирование – введение остатка $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CO}-$ по аминогруппе N-концевого глицина [1, 41, 42] и пальмитоилирование – введение остатка $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CO}-$ по SH-группе остатка цистеина [1, 43, 44]. В обоих случаях ацилирование осуществляется соответствующим ацилкоферментом А, образующимся в качестве промежуточного продукта при окислительной деструкции более длинных жирных кислот.

N-концевой остаток глицина [42, 45] появляется в белке после отщепления N-концевого остатка метионина, с которого начинается трансляция. Введение миристильной группы катализируется миристоилCoA:протеин N-миристоилтрансферазой (К.Ф. 2.3.1.97) [46, 47]. Образование амидной связи между остатками глицина и миристана является необратимым процессом. Введение остатка миристоила изменяет липофильность белковой молекулы и способствует слабому и обратимому взаимодействию белка с фосфолипидными мембранами или гидрофобными доменами других белков. Подобное взаимодействие необходимо для участия в процессах сигнализации, апоптозе, внеклеточном транспорте белков. Примерами миристили-

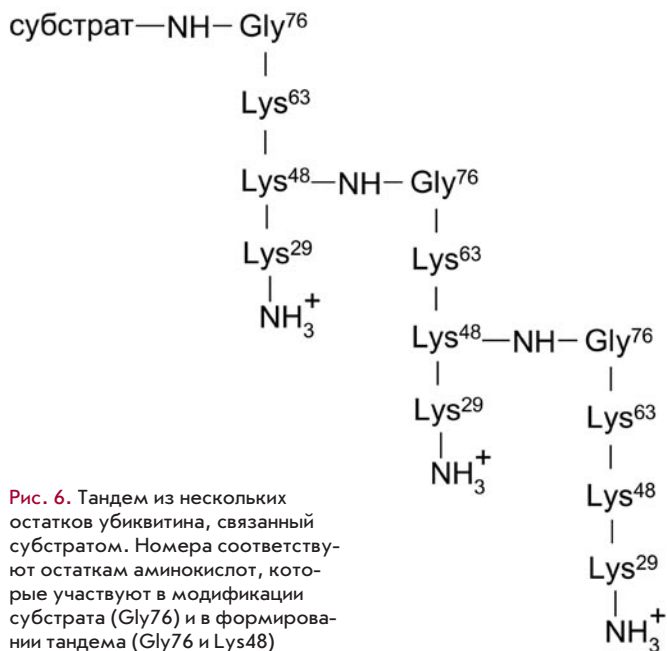


Рис. 6. Тандем из нескольких остатков убиквитина, связанный субстратом. Номера соответствуют остаткам аминокислот, которые участвуют в модификации субстрата (Gly⁷⁶) и в формировании тандема (Gly⁷⁶ и Lys⁴⁸)

рованных белков могут служить протеинкиназа A и один из основных структурных белков вируса иммунодефицита человека – GAG [45, 48]. Как правило, модификация миристиновой кислотой действует в комплексе с другими механизмами регуляции функционирования белков.

Достаточно часто вслед за модификацией миристалом по N-концевому глицину имеет место присоединение остатка пальмитиновой кислоты по остатку цистеина с образованием тиоэфирной связи [1, 43, 45, 49]. Эта модификация в отличие от миристилирования является обратимой – существуют ферментативные системы, катализирующие как пальмитирование остатков цистеина, так и их депальмитирование [50].

Результаты введения остатка пальмитиновой кислоты те же, что и при модификации глицина миристалом – увеличение липофильности белковой молекулы. Это облегчает взаимодействие с мембранами и прохождение через них, а наличие обратной реакции депальмитоилирования делает возможным участие в регуляции активности белка на различных стадиях развития клетки и проведения сигнала в клетку. Пальмитоилированию подвергаются в основном белки, участвующие в сигнализации: G-белки (малые G-белки семейства Ras, α-субъединица гетеротримерных G-белков), нерецепторные тирозинкиназы семейства Src (Fyn, Lck) [43, 45, 47, 51].

УБИКВИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Важное биологическое значение имеет ацилирование белков активированной C-концевой карбоксильной группой остатка глицина убиквитина (8 кДа), состоящего из 76 аминокислотных остатков [52–59]. Главная, хотя и не единственная функция этого процесса заключается во введении метки в белки, подлежащие уничтожению. К ним относятся различные поврежденные белки и нормальные белки, которые должны выполнять свою функцию в определенной

фазе развития клетки, и присутствие их за пределами этой фазы нежелательно.

Конъюгация белка-мишени с убиквитином включает три стадии. Первая стадия представляет собой активацию карбоксильной группы убиквитина с помощью убиквитин-активирующего фермента E1 и АТФ с образованием убиквитил-АМР. На второй стадии остаток убиквитина переносится на SH-группу убиквитин-переносящего белка E2. На третьей стадии убиквитин-протеин лигаза E3 катализирует перенос убиквитильного остатка на белковый субстрат с образованием амидной связи между C-концевым остатком глицина убиквитина G76 и остатком лизина белка-мишени (субстрата). Модифицированный остатком убиквитина белок подвергается протеолизу в протеасомах или лизосомах [57].

Если E1 представлен в клетке единственным ферментом, то фермент E2 в клетках млекопитающих имеет уже 20–40 изоформ, а для E3 фермента существуют сотни изоферментов, различающихся природой белкового субстрата. Часто для узнавания ферментом E3 необходима предварительная модификация белка-мишени различными способами: фосфорилирование (Ser/Thr, Tyr), гидроксилирование (Pro), гликозилирование (Asn), аминокислотное N-конца [54].

На молекулу белка-мишени может переноситься как один остаток убиквитина, так и несколько. На схеме (рис. 5) такой продукт обозначен как субстрат-Ub_n. При полиубиквителировании субстрата фрагмент убиквитин, непосредственно связанный с белком-мишенью, ацилируется по остаткам Lys-29, Lys-48 или Lys-63 C-концевым остатком глицина следующей молекулы убиквитина [53, 60–63]. При образовании ковалентного аддукта у присоединенного фрагмента убиквитина сохраняется способность к конъюгированию вышеназванных лизинов со следующего остатком убиквитина, что, в конечном итоге, приводит к полиубиквителированию белка-субстрата (рис. 6).

Степень убиквителирования конъюгата влияет на его биологические функции. Так, для эффективной деградации белков в протеасомах необходимо тетраубиквителирование по Lys29 или Lys48 в зависимости от белка-мишени. Неправильно свернутые белки и большинство коротко живущих белков формируют тандем остатков убиквитина со связями по Lys48 [59]. Моноубиквителирование протекает в основном по многочисленным остаткам лизина в белке-мишени случайным образом. Оно, например, происходит при переходе от анафазы к метафазе во время митоза, когда необходимо «выключить» белки, участвующие в анафазе [59]. Моноубиквителирование гистона H2В человека требуется для метилирования гистона H3, что, в свою очередь, является важным для перестройки структуры хроматина и активации транскрипции «молчащих» генов [35]. Образование тандемов из нескольких остатков убиквитина по Lys63, связанных с фактором процессивности ДНК-полимеразы PCNA (ядерном антигене клеточной пролиферации), существенно для пострепликативной репарации ДНК [59, 61].

Сейчас известно несколько убиквитин-подобных белков (УПБ), которые были объединены в семейство убиквитина: сам убиквитин, Nedd8, Sumo, Fat10, ISG15, Urm1,

Рис. 7. Структуры алкилированных боковых радикалов аминокислот белка

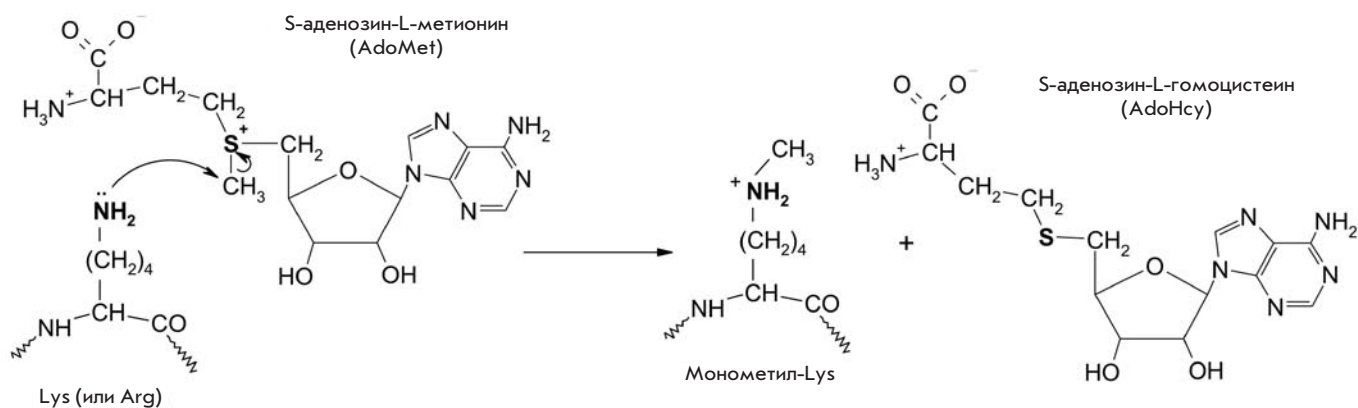
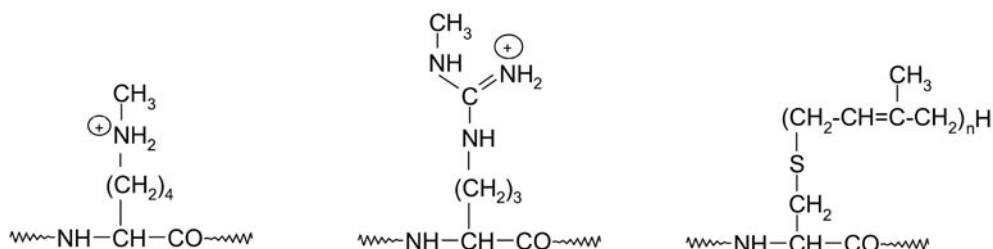


Рис. 8. Метилирование остатков лизина метилтрансферазами

Hub1 и др. [53, 56–59, 62, 64] Эти белки в разной степени гомологичны убиквитину по аминокислотной последовательности и обладают подобной пространственной структурой. Наличие в клетке большого числа УПБ отражает их включение в различные чрезвычайно разнородные процессы, протекающие в клетке. Так, Sumo участвует в транспорте веществ в ядро, в регуляции транскрипции, сегрегации хромосом; ISG15 функционирует в системе иммунного ответа; Nedd8 – в переходе клетки от мейоза к митозу; Urm1 – в росте клеток при высоких температурах [59].

Шапероны, взаимодействуя с синтезированными и не получившими правильной пространственной структуры полипептидами, выступают кофакторами ферментов убиквитилирования, т.к. содержат убиквитин-узнающий домен. После модификации белка-мишени убиквитином они эскортируют убиквитилированный белок в протеасому, где шапероны диссоциируют из комплекса, происходит высвобождение цепей убиквитина, АТФ-зависимая денатурация белка-мишени и деградация его протеазами внутри протеасомы до мелких пептидов.

АЛКИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Распространенной группой посттрансляционной модификации является алкилирование. К этому типу модификации относятся метилирование по остаткам лизина и аргинина [26, 30, 33–38, 39, 65–72] и изопренилирование (введение по боковому радикалу цистеина остатков фарнезила и геранилгеранила) [47, 73–80] (рис. 7).

Метилирование белков в живых организмах происходит путем переноса CH_3 -групп от *S*-аденозилметионина по реакции (рис. 8) и катализируется ферментами метилтрансферазами [1, 65, 67].

В случае лизина в реакциях, катализируемых различными метилтрансферазами, возможно образование моно-, ди-, триметиллизинов, в случае аргинина – моно- и диметиларгининов [65]. Полученные соединения отличаются размерами модифицированного остатка и степенью гидрофобности.

Метилирование белков наиболее изучено на примере модификации гистонов. Гистон-метилтрансферазы обладают высокой специфичностью по отношению к природе аминокислотного остатка (гистон-лизинметилтрансферазы (К.Ф. 2.1.1.43) и гистон-аргининметилтрансферазы (К.Ф. 2.1.1.125) и положению остатка в полипептидной цепи [1, 65]. Метилирование остатков лизина в гистонах играет важную роль в упомянутом выше «гистоновом коде» [33–36, 38]. Наиболее охарактеризованные положения метилирования в гистонах – это Lys4 и Lys9 в гистоне H3. Кроме указанных остатков, в гистоне H3 могут метилироваться выступающие над поверхностью нуклеосомы Lys27, Lys36, Arg2, Arg17 и Arg26, а в гистоне H4 – Arg3 [33, 34, 67, 70].

Было показано, что в гистоне H3 триметилированный Lys4 необходим для активации процесса транскрипции, а диметилированный Lys4 обнаружен как в активном, так и в неактивном гене [33, 34, 70]. Так, гетерохроматинный белок 1 (HP1), взаимодействуя с триметилированным Lys9 в гистоне H3 через свой хромодомен (домен, узнающий алкилированные аминокислотные остатки), вызывает

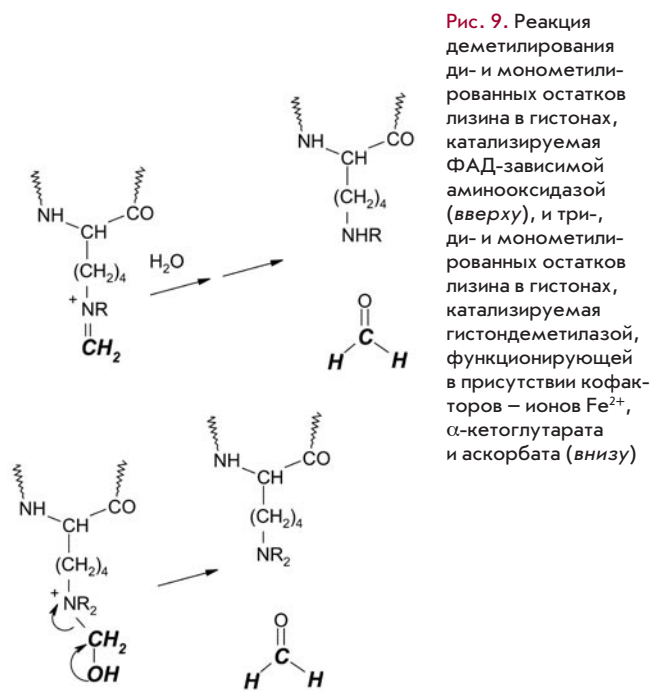
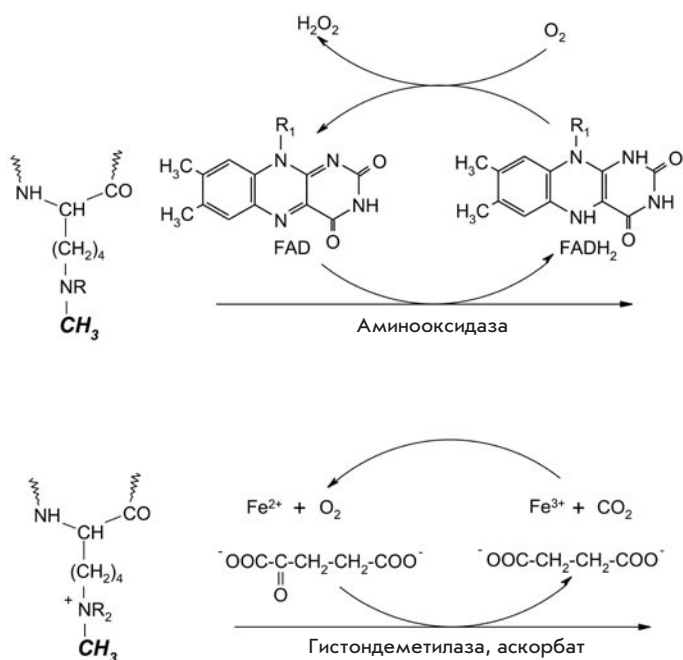


Рис. 9. Реакция деметилирования ди- и монометилированных остатков лизина в гистонах, катализируемая ФАД-зависимой аминоксидазой (вверху), и три-, ди- и монометилированных остатков лизина в гистонах, катализируемая гистондеметиلاзой, функционирующей в присутствии кофакторов – ионов Fe²⁺, α-кетоглутарата и аскорбата (внизу)

локальную конденсацию хроматина и привлекает к сборке активного транскрипционного комплекса другие белковые факторы [26, 30, 33, 67, 70].

До самого последнего времени считалось, что метилирование остатков лизина является необратимым процессом [1]. Но совсем недавно были выделены ферменты, катализирующие удаление метильных групп с остатков лизина и аргинина, т.е. установлено, что и эта посттрансляционная модификация является динамичной. Деметилирование лизина является окислительным процессом и может катализоваться или ФАД-зависимой полиаминоксидазой, или лизин-специфичной деметилазой, функционирующей как диоксигеназа в присутствии кофакторов – ионов Fe²⁺, α-кетоглутарата и аскорбата (К.Ф. 1.5.3.4) [37, 65, 66, 82, 83]. Схема процесса приведена на рис. 9.

Деметилирование остатка модифицированного аргинина осуществляет ядерная пептидиларгинин деиминаза (К.Ф. 3.5.3.15), превращающая метилированный аргинин в цитруллин [66] (рис. 10).

Таким образом, метилирование-деметилирование наряду с ацетилированием-деацетилированием определенных аминокислотных остатков в гистонах является одним из основных факторов регуляции активации или репрессии генов.

ИЗОПРЕНИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Некоторые случаи посттрансляционной модификации представляют собой введение по функциональной группе цистеина остатков изопреноидов – олигомеров, построенных из остатков изопрена – фарнезила и геранилгеранила (рис. 11). Модификация белков этими радикалами катализируется соответственно протенифарнезил- и протеингеранилгеранил трансферазами, соответственно К.Ф. 2.5.1.58 и К.Ф. 2.5.1.59 или К.Ф. 2.5.1.60 (геранилгеранилтрансферазы

I и II типа). Ферменты I типа катализируют перенос геранилгеранильного остатка на остаток цистеина в С-концевой последовательности белка Cys-A-A-X, а II типа – на последовательности Cys-Cys-X-X, X-X-Cys-Cys или X-Cys-X-Cys [47, 73–80], где А – остаток небольшой алифатической аминокислоты, X – различные аминокислоты.

Изопренилированию подвергаются белки семейств Ras, Rab, Rho (продукты протоонкогенов *ras*, *rab*, *rho*, участвующие в процессах роста и дифференцировки клеток), центромерные белки, γ-субъединицы гетеротримерных G-белков, шапероны, тирозинфосфатазы [47, 73, 75, 78, 79, 81]. В С-концевой последовательности белков семейства Ras обнаружен мотив Cys-A-A-X, где X – аминокислотный остаток, определяющий специфичность фермента: Leu, Phe, Met – в случае геранилгеранилтрансферазы I типа; Ala, Gln, Ser, Met, Phe – в случае фарнезилтрансферазы [47, 74, 78, 79]. Ферменты, переносящие изопренильные остатки, являются металлоэнзимами, содержащими один ион Zn²⁺ на димерную молекулу фермента. Ион цинка активирует тиольную группу цистеина для нуклеофильной атаки изопренильной группы [73]. Введением изопренильной

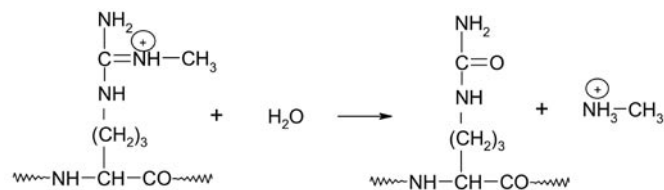
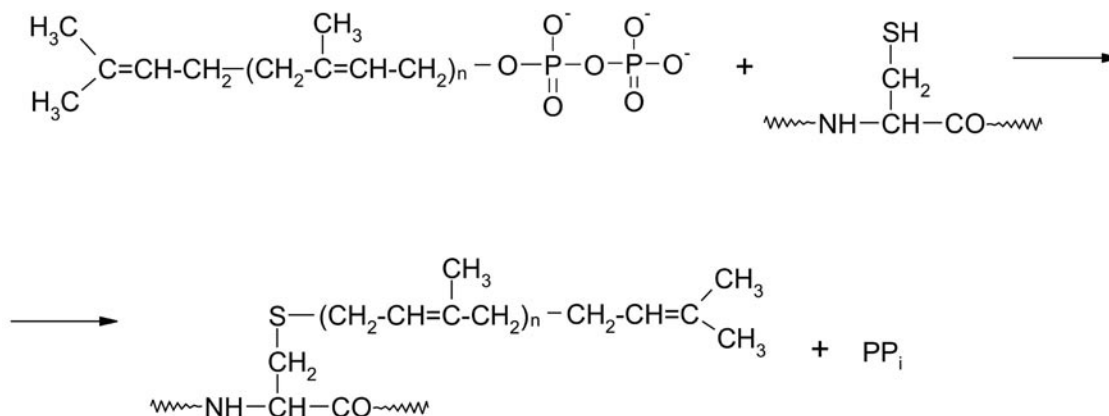


Рис. 10. Реакция деметилирования модифицированных остатков аргинина, катализируемая ядерной пептидиларгинин деиминазой (PAD4) [58]

Рис. 11. Реакция переноса остатка изопреноида от пирофосфата на остаток цистеина апобелка. n = 2 – остаток фарнезила, n = 3 – остаток геранилгеранила



группы по остатку цистеина в мотиве Cys-A-A-X, как правило, не заканчивается модификация белка-мишени (Ras, Rho), а наблюдается дальнейший процессинг: протеолитическое удаление Cys-A-A-X-протеазой трипептида A-A-X с C-конца и карбоксиметилирование остатка изопренилцистеина ферментом изопренилцистеинкарбоксиметилтрансферазой (К.Ф. 2.1.1.100) [84–87] (рис. 12).

В случае GTPаз семейства Rab, вблизи C-конца обнаружен мотив Cys-Cys-X-X, оба цистеиновых остатка которого могут подвергаться дальнейшей модификации остатками геранилгеранила с помощью протеин-геранилгеранилтрансферазы II типа, что вводит в молекулу белка два липидных якоря [74, 75]. Такой белок, обладая большим сродством к липидным мембранам, служит уникальным местом опознавания для определенных белок-белковых взаимодействий.

Белки семейства Rab участвуют во внутриклеточном везикулярном транспорте, циркулируя между мембраной клетки и цитозолем. Обратимая ассоциация белка с клеточной мембраной в строго определенном месте осуществляется как раз за счет изопренильных остатков, введенных в эти белки [75, 84].

Поскольку 20–30 % случаев онкологических заболеваний человека связано с мутациями белков семейства Ras, ферменты, модифицирующие эти белки изопренильными остатками, могут служить мишенями для противоопухолевых препаратов [73, 79].

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Важную роль для функционирования эукариот играет процесс гликозилирования белков, который протекает по OH-группам остатков серина или треонина (O-гликозилирование) и функциональной группе бокового радикала аспарагина (N-гликозилирование) (рис. 13).

N-гликозилирование белков происходит по карбоксимидному атому азота остатка аспарагина в последовательности Asn-X-Ser/Thr. Образование N-гликозидов начинается в эндоплазматическом ретикулуме с катализируемого олигосахарилтрансферазой (К.Ф. 2.4.1.119) переноса на белок разветвленного тетрадекасахаридного фрагмента (Glc₃Man₉(GlcNAc)₂), донором которого служит углеводсодержащий долихолпирофосфат.

Огромное многообразие гликопротеинов обеспечивается последующим процессингом связанного с белком тетра-

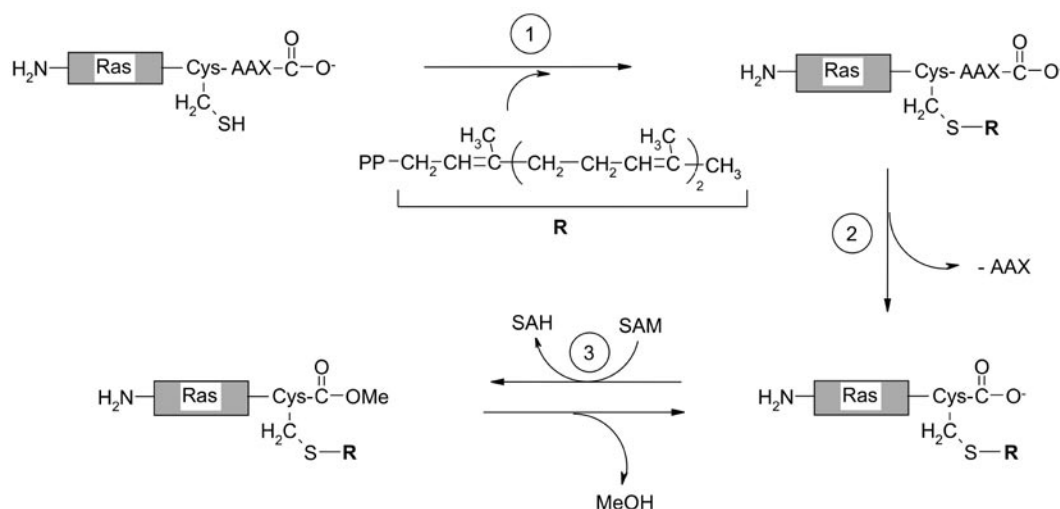


Рис. 12. Изопренилирование белка Ras: 1 – введение остатка фарнезила по остатку цистеина в последовательности Cys-A-A-X (A – небольшой алифатический аминокислотный остаток, а X – Leu, Phe, Met); 2 – удаление трипептида A-A-X с помощью Ras-конвертирующего фермента, представляющего собой CysAAX-эндопептидазу; 3 – карбоксиметилирование остатка изопренилцистеина с помощью изопренилцистеинкарбоксиметилтрансферазы [86]

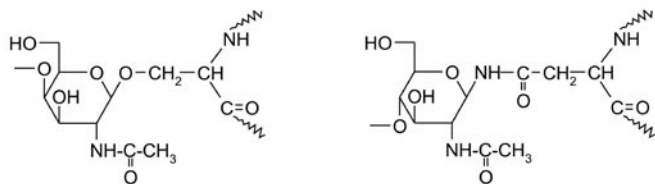


Рис. 13. Структуры продуктов присоединения *N*-ацетилглюкозамина по боковым радикалам серина и аспарагина белков

декасахаридного остатка, который обусловлен действием ряда гликозидаз и гликозилтрансфераз.

На рис. 15 представлена структура связанного тетрадекасахарида и продуктов первых стадий процессинга, катализируемого гликозидазами I и II (К.Ф. 3.2.1.106), приводящими к отщеплению двух остатков глюкозы, и маннозидазами (К.Ф. 3.2.1.130), приводящими к отщеплению шести остатков маннозы. Образовавшийся после удаления двух остатков глюкозы гликопротеин, содержащий *N*-связанный додекасахаридный остаток, служит местом опознавания белками-шаперонами: калнексином и калретигулином, помогающими гликопротеину принять правильную пространственную структуру во время его перемещения от места синтеза на мембрансвязанных рибосомах во внутреннюю часть эндоплазматического ретикулума [1, 88, 89, 90–93]. После отщепления третьего остатка глюкозы гликозидазой эндоплазматического ретикулума шапероны теряют сродство к ундекасахариду и диссоциируют из комплекса с гликопротеином. UDP-глюкоза:гликопротеин гликозилтрансфераза (К.Ф. 2.7.8.19) переносит назад остаток глюкозы на ундекасахарид, что заставляет калнексин и калретигулин вступить в следующий этап рефолдинга гликопротеина. Таким образом, осуществляется контроль за поддержанием функционально значимой структурной организации секретируемых гликопротеинов.

Если гликопротеин не будет свернут правильным образом в течение нескольких циклов дегликозилирования-регликозилирования, он переносится в цитозоль, где подвергается полиубиквитилированию с помощью E3-лигазы, являющейся составной частью системы деградации неправильно свернутых белков в эндоплазматическом ретикулуме, и гидролизует в протеосомах [1, 88, 89, 90–94].

Правильно свернутый $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2\text{N}$ -гликопротеин с помощью маннозидаз эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи теряет шесть остатков маннозы с образованием связанного с белком корового пентасахаарида $\text{Man}_3(\text{GlcNAc})_2$. Последний может присоединять с помощью различных гликозилтрансфераз, разнообразие которых характерно для эндоплазматического ретикулума и аппа-

рата Гольджи, всевозможные моносахариды, в результате чего число различных гликопротеинов измеряется десятками тысяч [1, 88, 89, 95].

O-гликозидные цепи в гликопротеинах гораздо короче и проще, чем *N*-гликозидные. Многие белки, включая транскрипционные факторы, белки ядерных пор, онкопротеины, содержат моносахаридный остаток *N*-ацетилглюкозамина, который вводится в белок с помощью *O*-GlcNAc-трансферазы (К.Ф. 2.4.1.94) и отщепляется соответствующей гидролазой [1, 88, 89, 96, 97–100]. Встречаются и *O*-гликозиды, содержащие ди-, три- или тетрагликозидный фрагмент.

Короткие *O*-гликозидные цепи в *O*-гликопротеинах, важные для проявления транскрипционной активности, могут служить элементом узнавания при взаимодействии с мембранными клеточными рецепторами, принимающими участие в проведении сигнала в клетку [1, 88, 89, 100–102].

СУЛЬФИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

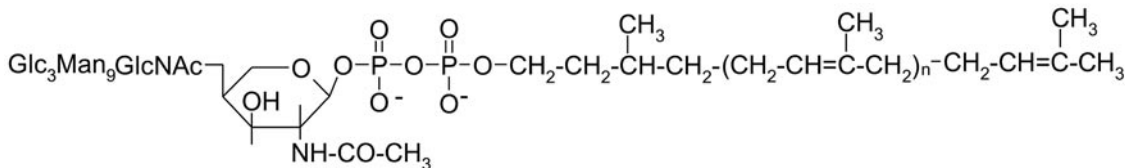
Еще одной посттрансляционной модификацией белков является введение остатка сульфата по OH-группам тирозина. Донором сульфата является фосфоаденозил-фосфо-сульфат (рис. 16). Реакция катализируется сульфотрансферазой (К.Ф. 2.8.2.20) [103, 104].

Так, например, в *N*-концевой части мембранного клеточного рецептора хемокина человека (регулятора противовоспалительных иммунных реакций), имеющего большое значение для эмбрионального развития и иммунного ответа, три остатка тирозина Tyr7, Tyr12, Tyr21 подвергаются посттрансляционному сульфированию в аппарате Гольджи, что увеличивает сродство рецептора к своему лиганду – хемокину SDF-1 α . Соответственно в лизосомах обнаружены ферменты, катализирующие гидролиз сульфозэфиров – сульфатазы (К.Ф. 3.1.5.6) [103, 105, 106].

МОНО- И ПОЛИ(ADP-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЕ

Во многих клеточных процессах, таких как репарация ДНК, апоптоз и функции веретена при делении клетки, обратимое моно- и поли(ADP-рибозил)ирование белков используется в качестве важного механизма регуляции [107]. Многие патогенные бактерии секретируют токсины, которые ADP-рибозилируют белки человека, вызывая различные тяжелые болезни: холеру, дифтерию, коклюш, ботулизм [108–111].

Донором ADP-рибозильного остатка является NAD^+ . Положительно заряженная никотинамидная группа отщепляется под действием ADP-рибозилтрансферазы (К.Ф. 2.4.2.31) и образуется рибооксокарбеновый катион, который, взаимодействуя с различными нуклеофильными группами в активных центрах белков, приводит к их (ADP-рибозил)ированию (рис. 17) [108, 109].



$n = 9 - 22$

Рис. 14. Структура углеводсодержащего долихолпирофосфата

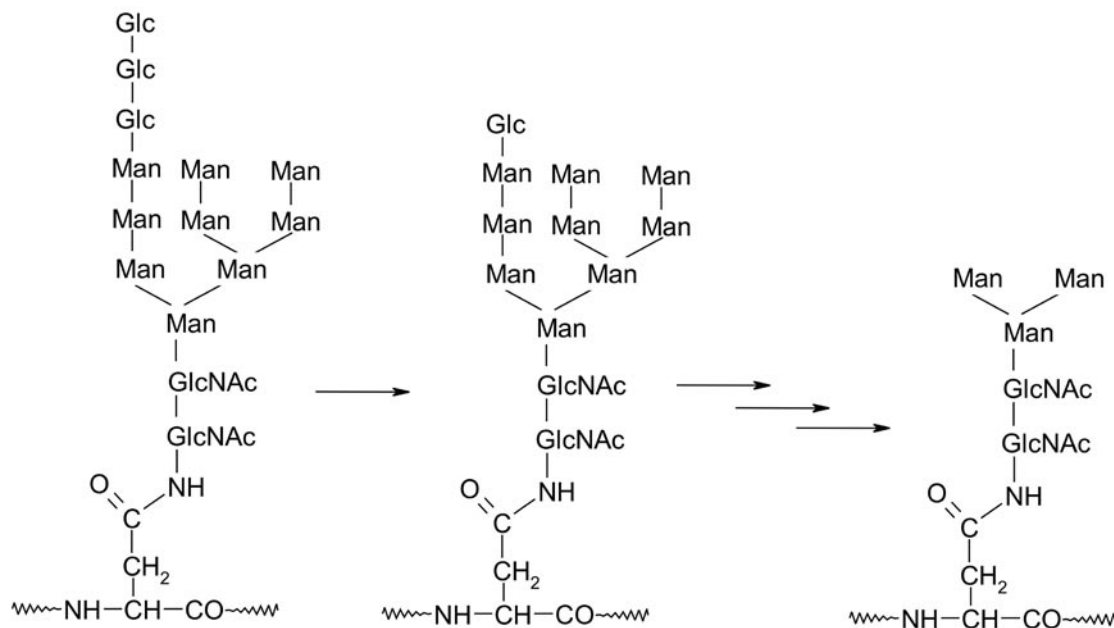


Рис. 15. Структура и первые стадии процессинга олигосахаридного фрагмента $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ в составе гликопротеина. Моносахариды Glc – глюкоза, GlcNAc – N-ацетилглюкозамин, Man – манноза

Так, например, коклюшный токсин переносит образовавшийся катион на тиолатную цепь остатка цистеина в активном центре α -субъединицы G_i -белка человека, регулирующего образование вторичного посредника cAMP [1, 111, 112]. Холерный токсин осуществляет перенос остатка ADP-рибозила на гуанидиниевую группу остатка аргинина α -субъединицы G_s -белка человека ([1, 111, 113]. ADP-рибозильный остаток может переноситься С3 токсином *Clostridium botulinum* на нуклеофильный остаток Asn41 малой ГТРаза суперсемейства белков Rho человека, что приводит к деполимеризации актина

и нарушению обменных процессов в хозяйской клетке [1, 111].

Дифтерийный токсин ADP-рибозилирует His715 в структуре фактора элонгации eEF-2, блокируя транслокацию пептидов на рибосомах, а значит и весь процесс трансляции белка в клетке человека [114].

В действительности His715 подвергается сложной модификации: сначала происходят перенос от S-аденозилметионина (SAM) аминокарбоксипропильного остатка, далее SAM-зависимое N,N,N-триметилирование, глутамин-опосредованное амидирование карбоксильной

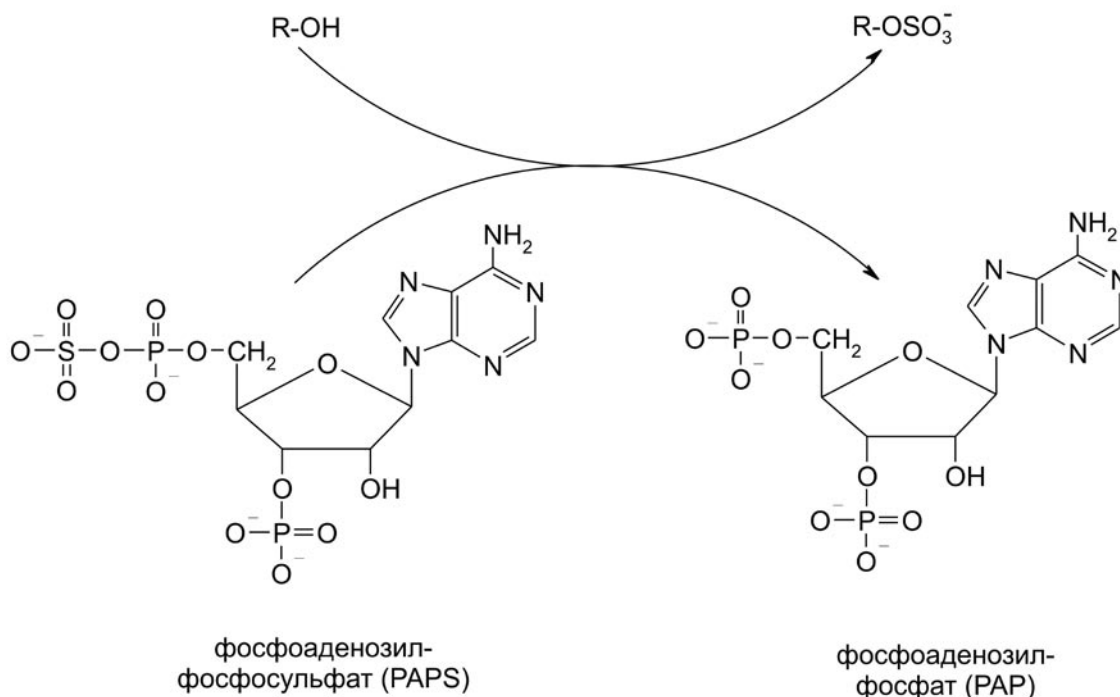


Рис. 16. Реакция сульфирования, катализируемая сульфотрансферазой

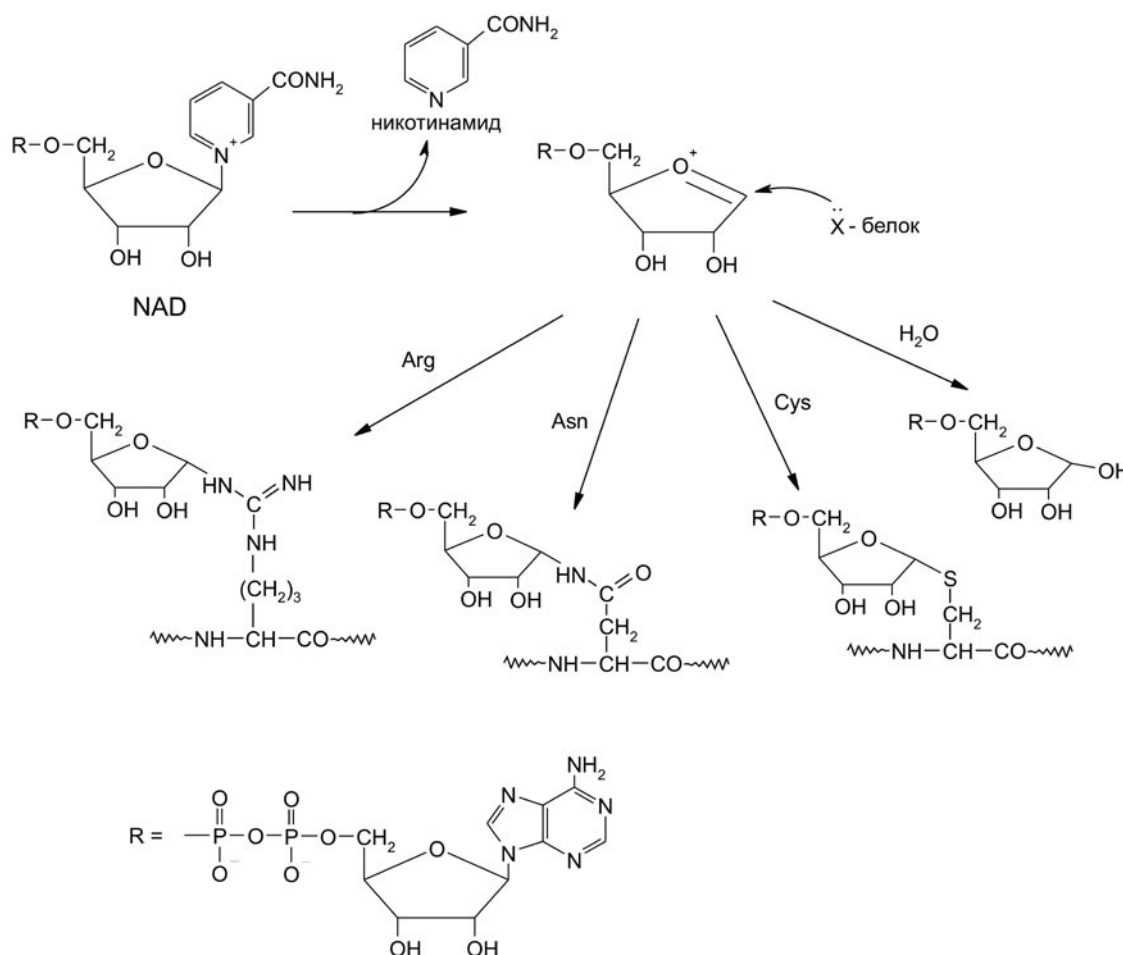


Рис. 17. (ADP-рибозил)ирование нуклеофильных аминокислотных остатков (X) в составе белка: цистеина, аргинина, аспарагина [1]

группы с образованием дифтаמידного остатка, а затем только токсин ADP-рибозилирует дифтаמידный остаток по N3 имидазольного кольца (рис. 18) [115–117].

В процессе жизнедеятельности организма геном постоянно подвергается воздействию генотоксических агентов, как экзогенного, так и эндогенного происхождения [118]. Ориентировочная оценка выявила, что в течение дня в геноме клеток человека возникает до 104–106 повреждений [119]. В этих условиях сохранение целостности генома клетки является одним из наиболее важных факторов, обеспечивающих выживание многоклеточного организма, поскольку неисправленные повреждения в ДНК могут способствовать развитию мутаторного фенотипа клетки [120]. Синтез поли(ADP-рибозы) (PAR) является одной из незамедлительных реакций в эукариотической клетке в ответ на образование разрывов ДНК под действием ионизирующей радиации, алкилирующих или окисляющих реагентов [121, 122]. Данный процесс катализируют ферменты – поли(ADP-рибозо)полимеразы (PARPs), которые постоянно и в большом количестве экспрессируются в клетке [123]. При образовании разрывов ДНК PARPs активируются и осуществляют посттрансляционную модификацию ряда ДНК-связывающих белков за счет ковалентного присоединения полимера – поли(ADP-рибозы) к карбоксильной

группе аминокислотных остатков глутаминовой и аспарагиновой кислоты в составе белка-акцептора [124]. На сегодняшний день идентифицировано порядка 30 ядерных белков, которые поли(ADP-рибозил)ируются *in vivo* и *in vitro* [123, 125]. Все эти белки обладают ДНК-связывающей активностью и участвуют в метаболизме ДНК (репликация, транскрипция, репарация) или в формировании структуры хроматина (гистоны). В клетках эукариот идентифицировано несколько ферментов класса поли(ADP-рибозо)полимеразы, в т.ч. PARP1, PARP2 и PARP3, присутствующие в ядре, танкиразы 1 и 2, которые взаимодействуют с теломерными белками и, вероятно, участвуют в регуляции теломерных функций, VRAP (193 кДа), обнаруженная в цитоплазматических, рибонуклеопротеидных “vault”-частицах [126], sPARP – укороченная форма PARP1, для активации которой не требуется разрывов ДНК [127], макро PARPs (BAL/PARP-9, PARP14, PARP15), связанные с эпигенетической модификацией хроматина [124, 128]. Синтез поли(ADP-рибозы) в ядре практически на 90 % обусловлен активностью PARP1 [129]. Уровень экспрессии этого белка не меняется на протяжении клеточного цикла, и на одну клетку приходится порядка $1.0 \cdot 10^6$ молекул этого белка, что соответствует одной молекуле белка на 6000 пар нуклеотидных оснований [130]. Каталитически неактивный

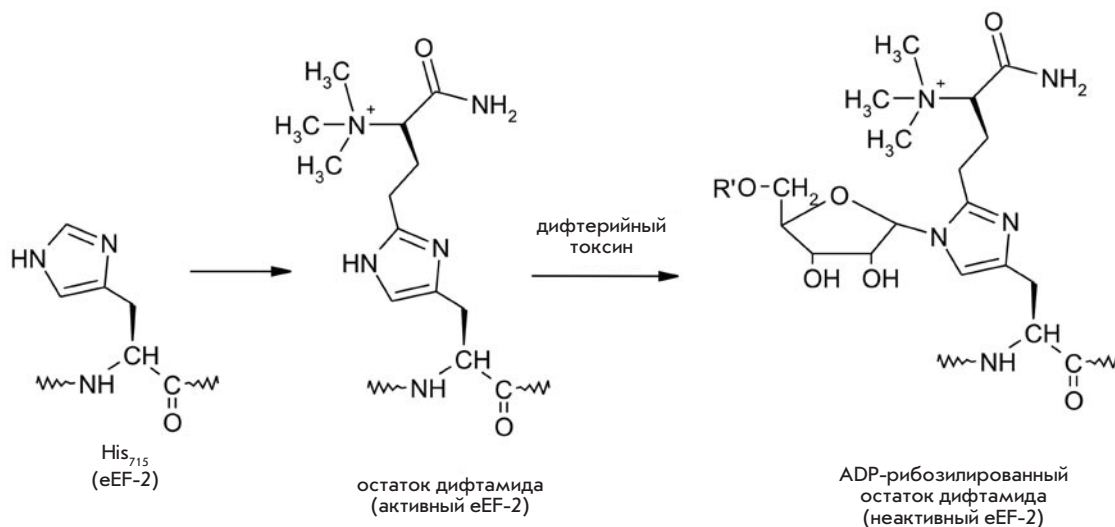


Рис. 18. Модификация His₇₁₅ в структуре фактора элонгации eEF-2 человека, приводящая к блокированию синтеза белка в клетках человека

PARP1 находится в нуклеоплазме и при появлении разрыва в ДНК связывается с областью повреждения и катализирует синтез PAR [128]. Синтез поли(ADP)-рибозы PARP1 осуществляется в три стадии: инициация, элонгация и разветвление полимера (рис. 19).

На первой стадии образуется сложноэфирная связь между ADP-рибозой и карбоксильной группой остатка глутамата в белке-акцепторе [131, 132]. На второй стадии за счет образования O-гликозидной связи между C2' и C1'' атомами молекул ADP-рибозы синтезируется линейная цепь полимера [133, 134]; на третьей стадии за счет образования гликозидной связи между C2'' и C1''' атомами ADP-рибозы происходит формирование разветвлений в структуре полимера [135, 136] (рис. 19).

В процессе синтеза поли(ADP-рибозы) скорость реакции на стадии моно(ADP-рибозилирования) примерно в 200 раз ниже, чем на стадии элонгации цепи [137]. На основании измерения кинетических параметров реакции поли(ADP-рибозилирования) PARP *in vitro* авторы [138] предположили, что данная реакция является межмолекулярной, т.е. на сайте разрыва ДНК PARP1 функционирует как гомодимер. С разрывом ДНК взаимодействует сразу две молекулы PARP1, и в процессе реакции обе молекулы одновременно осуществляют синтез поли(ADP-рибозы) и выступают в роли ее акцептора. Ковалентная модификация PARP1 за счет присоединения отрицательно заряженной поли(ADP-рибозы) приводит к изменению физико-химических свойств данного белка и диссоциации ее комплекса с ДНК [139]. Таким образом, через самомодификацию может осуществляться регуляция ДНК-связывающей активности PARP1 [140].

Обнаружение поли(ADP-рибозилирования) белков, обеспечивающих конденсацию и релаксацию хроматина, гистонов *in vivo* и топоизомеразы *in vitro*, предполагает участие PARP1 в модуляции структуры хроматина при репарации ДНК [123, 133, 141]. Было показано, что кинетические параметры процесса репарации ДНК зависят от присутствия гистонов на поврежденной ДНК [123].

При повреждении ДНК поли(ADP-рибозилирование) *in vivo* гистона H1 и гистонов, образующих нуклеосомный кор, может играть важную роль в ходе репарации ДНК, особенно когда она структурирована в виде хроматина, поскольку модификация гистонов может приводить к их диссоциации с ДНК, обеспечивая доступ ферментов репарации к сайту повреждения [123, 140].

Таким образом, к настоящему времени сложилось представление о том, что клеточный ответ на повреждение ДНК может модулироваться за счет функциональной активности PARP1. С одной стороны, PARP1 активирует репарационные процессы, тем самым способствуя выживанию клетки, с другой стороны, когда повреждение ДНК невозможно восстановить и имеется высокая вероятность появления мутаторного фенотипа, «сверхактивация» PARP1 индуцирует гибель клетки [142]. Поэтому синтез поли(ADP-рибозы), катализируемый PARP1 в процессе взаимодействия с разрывами в ДНК, можно рассматривать как сигнал об уровне повреждения в ДНК для определения дальнейшей стратегии функционирования клетки.

ОКИСЛЕНИЕ СУЛЬФИДРИЛЬНОЙ ГРУППЫ ОСТАТКА ЦИСТЕИНА БЕЛКОВ

Для большого числа белков характерно образование дисульфидных связей в результате реакции между остатками цистеинов как внутри одной полипептидной цепи, так и между разными полипептидными цепями; в этом случае они выполняют структурную роль и служат для поддержания третичной и четвертичной структур белка, что необходимо для участия белка в метаболических реакциях, протекающих в организме. Эта модификация также существенна для регуляции окислительно-восстановительного статуса клетки, что влияет на многие аспекты клеточного гомеостаза, регулируя ряд клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференцировка и апоптоз, путем изменения функций белков с помощью обратимой модификации остатков цистеина [143–147].

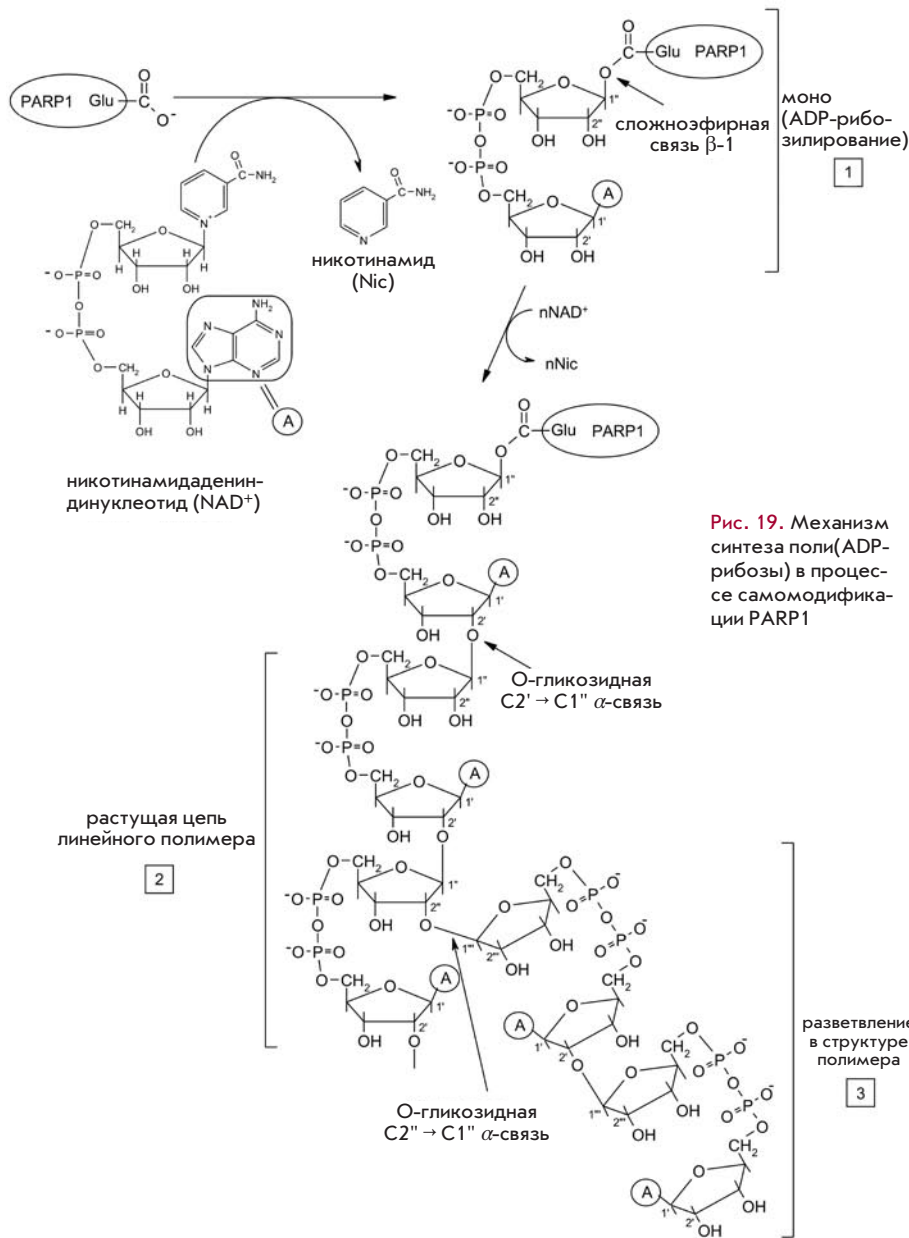


Рис. 19. Механизм синтеза поли(ADP-рибозы) в процессе самомодификации PARP1

Окисление остатков цистеина включает следующие процессы: формирование дисульфидной связи, образование сульфи- и сульфокислот, связывание глутатиона [145]. Образование дисульфидной связи происходит через окисление электрон-богатой сульфгидрильной группы (или тиолатного аниона, образующегося из нее при диссоциации протона) боковой цепи остатка цистеина. Одноэлектронное окисление сульфгидрильной группы приводит к образованию радикала тиола, который может димеризоваться с образованием дисульфида [147].

В физиологических условиях в клетке большинство сульфгидрильных групп существует в окисленной форме в виде дисульфидных связей. Восстановление дисульфидной связи в клетке осуществляется с помощью трипептида глутатиона γ-Glu-Cys-Gly (GSH), который при этом превращается в окисленный глутатион (GSSG). При высоких уровнях NAD(P)H и ферментов глутатионредуктазы (К.Ф. 1.8.1.7) и тиоредоксинредуктазы (К.Ф. 1.8.1.9) происходит восстановление окисленного глутатиона [143–147] (рис. 20). При прохождении белков по секреторным путям эукариотической клетки происходит уменьшение уровня глутатиона и NAD(P)H, поэтому белки находятся предпочтительно в структурах, стабилизированных дисульфидными связями [148].

Окислители (пероксид водорода, гидроксильный радикал) могут окислять сульфгидрильную группу цистеина в цистеинсульфеновую кислоту (-SOH) [147]. Взаимодействие остатка цистеинсульфеновой кислоты с ближайшим остатком Cys-S- также приводит к образованию дисульфидной связи.

Восстановление дисульфидной связи может происходить и путем тиол-дисульфидного обмена с глутатионом или тиоредоксином (TSH), низкомолекулярным (12 кДа) белком, содержащим в активном центре каталитически активные сульфгидрильные группы: Cys-Gly-Pro-Cys – и играющим центральную роль в контроле окислительно-восстановительного статуса дисульфидных связей в белках, что регулирует ряд клеточных процессов. Окисленные формы последних соединений восстанавливаются NAD(P)H и глутатионредуктазой / тиоредоксинредуктазой [146–149].

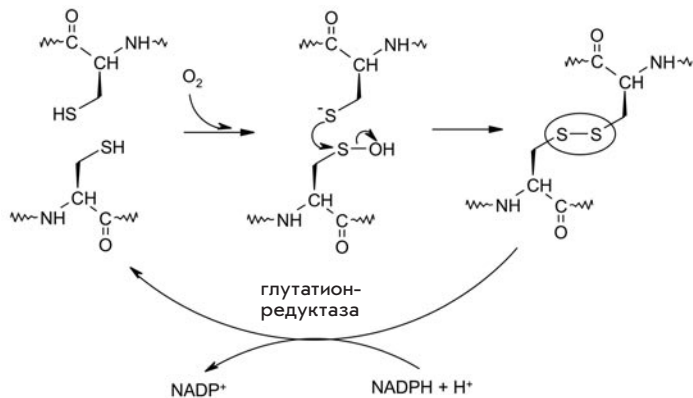


Рис. 20. Окисление сульфгидрильной группы остатка цистеина с образованием дисульфидной связи, которая может восстанавливаться обратно в тиольную группу с помощью NAD(P)H и глутатионредуктазы [147]

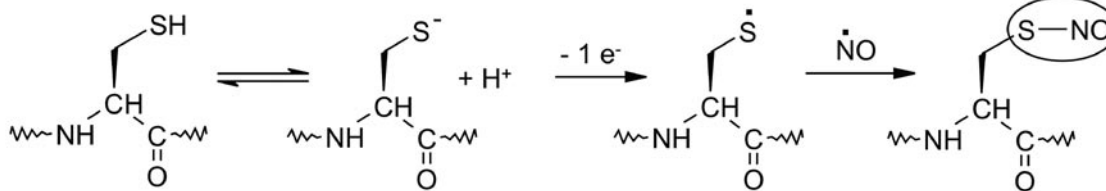


Рис. 21. Окисление тиолатного аниона в присутствии оксида азота с образованием цистеинилнитроксида [154]

Как тиолатный анион, так и тиильный радикал способны взаимодействовать с другими окислителями и радикалами (например, NO[•]) (рис. 21).

Образующееся соединение CysSNO участвует в окислительной сигнализации в клетке [150–154].

ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП БЕЛКОВ

Одним из видов пост-трансляционной модификации является окислительная реакция гидроксилирования. Реакция происходит по остаткам аминокислот, не являющимся нуклеофилами: СН₂-группам пролина, лизина и аспарагина с образованием соответственно 3-гидроксипролина, 4-гидроксипролина, 5-гидроксилизина и 3-гидроксиаспарагина и катализируется железосодержащими монооксигеназами подподкласса К.Ф. 1.14.16 [155, 156, 157] (рис. 22).

Окисленные остатки пролина и лизина играют важную роль в образовании водородных связей в трехнитевой пространственной структуре белка соединительной ткани коллагена. Окисление происходит в последовательностях Pro-Gly и Lys-Gly. 4-гидроксипролин встречается на порядок чаще, чем 3-гидроксипролин [155–160].

Помимо этого гидроксилирование определенных аминокислотных остатков играет роль в функционировании индуцированного гипоксией транскрипционного фактора HIF (hypoxia inducible factor) [156, 159–161]. Этот белок активируется в условиях недостатка кислорода. Он индуцирует транскрипцию большого количества генов, в т.ч. гена, кодирующего белок эритропоэтин, стимулирующий образование эритроцитов из клеток-предшественников, усиливая перенос кислорода к клеткам, страдающим от гипоксии [160].

α-Субъединица гетеродимера HIFαβ человека пост-трансляционно гидроксилируется в центральной части

молекулы по двум остаткам пролина: Pro402 и Pro564 с образованием 4-ОН-Pro и в С-концевой части – по Asn803 с образованием 3-ОН-Asn [156]. Фактор, содержащий гидроксильные остатки пролина, подвергается убиквитилированию с помощью E3-лигазы, и время жизни HIF определяется скоростью гидроксилирования, убиквитилирования и протеолиза в протеасомах. При низком давлении O₂ реакция гидроксилирования пролина протекает медленно. При высоком давлении кислорода Pro-гидроксилаза достаточно быстро гидроксилирует остатки Pro, что приводит к увеличению сродства к E3-лигазе в 1000 раз, быстрому убиквитилированию и разрушению в протеасомах, при низком давлении кислорода HIF достаточно устойчив и существует долгое время [162, 163].

Реакция гидроксилирования боковых цепей пролина и аспарагина катализируется семейством монооксигеназ, содержащих негемовое железо [163]. В активном центре фермента (рис. 23) содержится два остатка гистидина и один остаток аспартата, занимающие три из шести координационных мест вокруг иона Fe²⁺, два места заняты кобубстратом α-кетоглутаратом и шестое место – кислородом. Взаимодействие α-кетоглутарата и кислорода приводит к окислительному декарбокислированию до CO₂ и сукцината, в который внедряется один из атомов молекулярного кислорода. Второй атом кислорода участвует в генерировании высоковалентного комплекса Fe⁴⁺=O. Последнее соединение является эффективным окислителем, разрывающим неактивированную С–Н связь при С3 или С4 пролина, С5 лизина и С3 аспарагина с образованием радикалов •С–Н и Fe³⁺–ОН.

Перенос гидроксильного радикала •ОН от Fe³⁺–ОН к •С–Н приводит к гидроксилированию боковой цепи аминокислотного остатка, которая не является электрондонорной и не выступает в качестве нуклеофила.

Рис. 22. Структура монооксигенированных остатков пролина, лизина и аспарагина

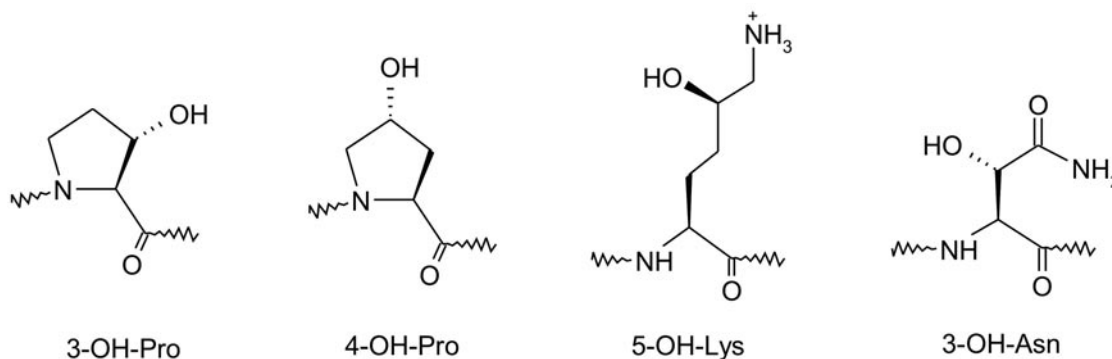
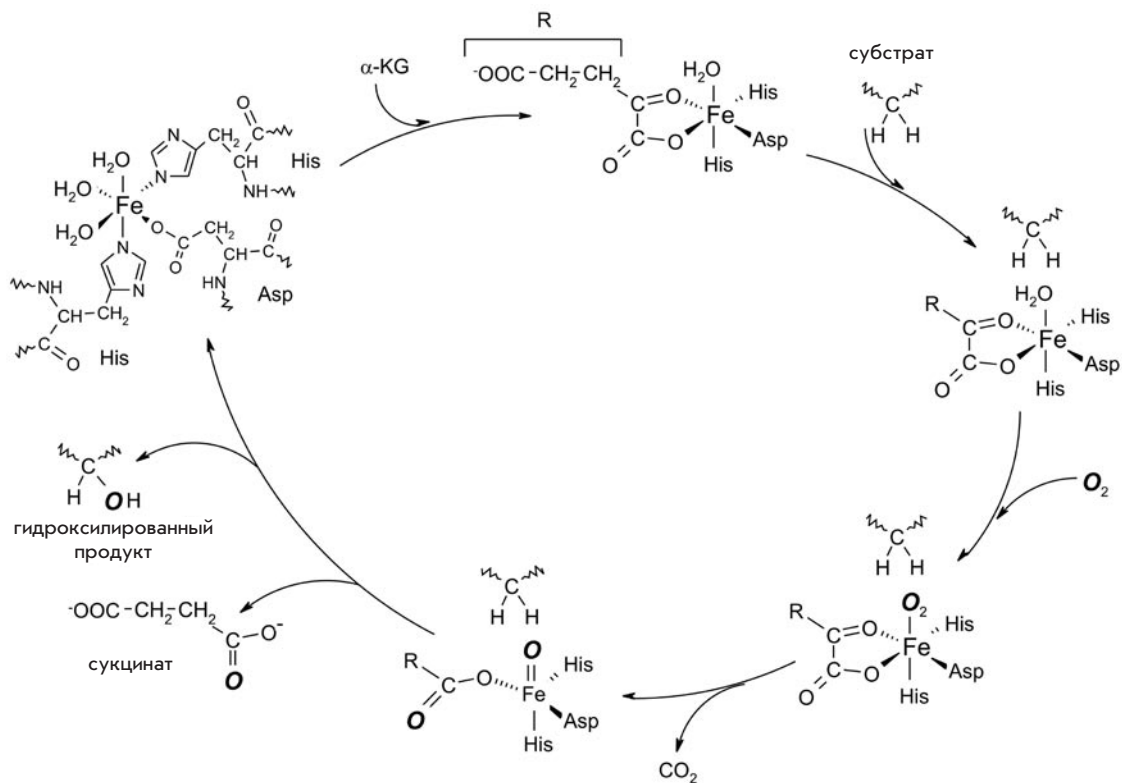


Рис. 23. Механизм реакции гидроксирования



Моноксигеназы, катализирующие реакцию гидроксирования, присоединяют гидроксильный радикал стереоспецифически.

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЕ КАРБОКСИЛИРОВАНИЕ ОСТАТКА ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Большинство белковых факторов, участвующих в процессе свертывания крови у млекопитающих, содержат несколько остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты (Gla). Этот оста-

ток появляется в факторах свертывания крови в результате посттрансляционной модификации, заключающейся в фиксации CO_2 γ -метиленовым углеродным атомом глутаминовой кислоты (Glu), во время прохождения факторов по секреторным выводящим путям [164–166]. Боковая цепь остатка Gla, содержащая две отрицательно заряженные карбоксильные группы, способна образовывать хелатные комплексы с двухвалентными катионами, что особенно важно для взаимодействия с ионом Ca^{2+} [164].

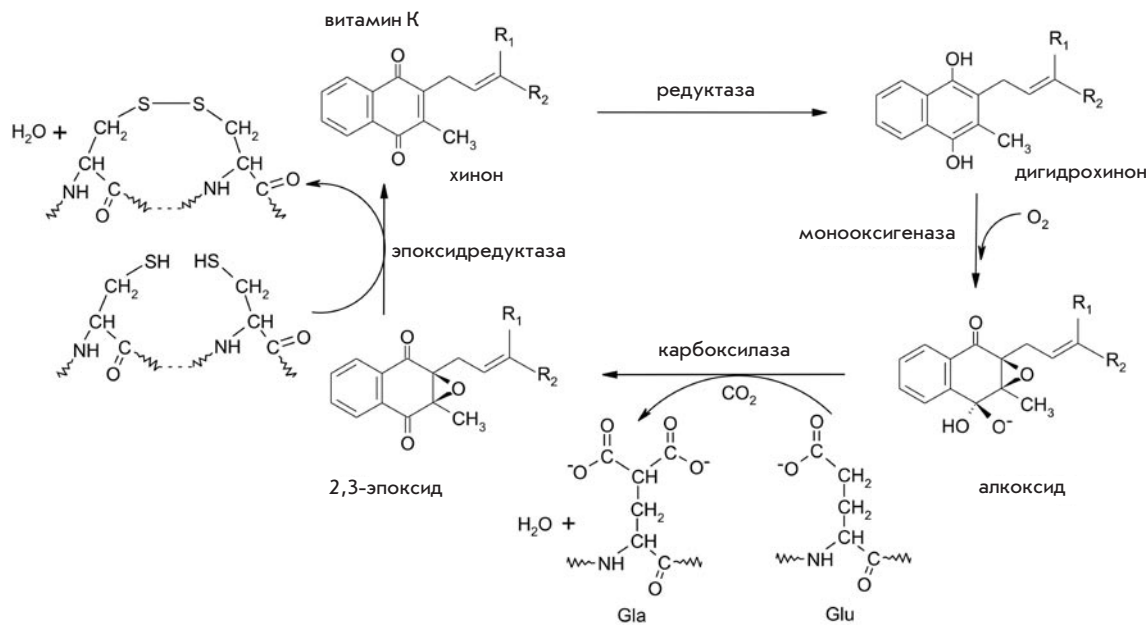


Рис. 24. Витамин К-зависимое карбоксилирование остатка глутаминовой кислоты, катализируемое γ -глутамилкарбоксилазой. 2,3-эпоксид витамина К восстанавливается 2,3-эпоксид витамина К редуктазой

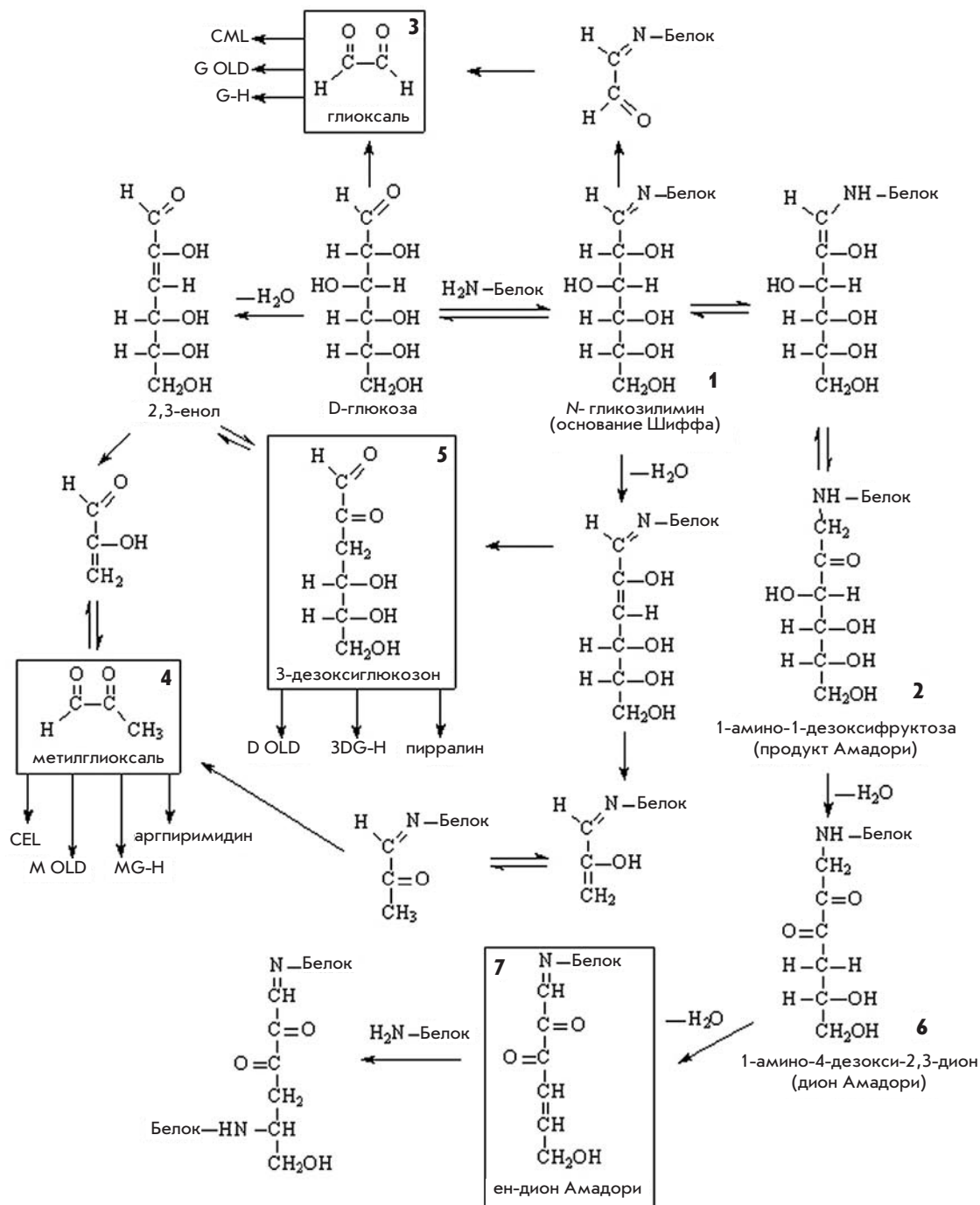


Рис. 25. Схема гликирования белков в присутствии D-глюкозы. В рамке показаны основные предшественники продуктов AGE, образующиеся в результате гликирования

К белкам, содержащим остатки Glu, относятся протромбин, факторы свертываемости крови IX и X, которые представляют собой проферментные формы протеаз [164]. Карбоксилирование 10–12 остатков Glu в N-концевой части проферментов в последовательности, содержащей до 40 аминокислотных остатков, приводит к связыванию нескольких ионов Ca^{2+} и изменению конформации факторов свертываемости, которые становятся способными ассоциировать на поверхности тромбоцитов вблизи от протеаз, активирующих факторы

частичным протеолизом и запускающих каскад свертывания крови [164–166].

Карбоксилирование остатка глутаминовой кислоты катализируется γ -глутамилкарбоксилазой (К.Ф. 1.14.99.20), использующей в качестве кофактора восстановленную (дигидронафтохинольную) форму витамина К (рис. 24) [1, 164–166]. В результате реакции окисления восстановленной формы витамина К кислородом образуется гидропероксидный аддукт витамина К, который, циклизуясь в алкоксидный анион 2,3-эпоксида витамина К, генерирует

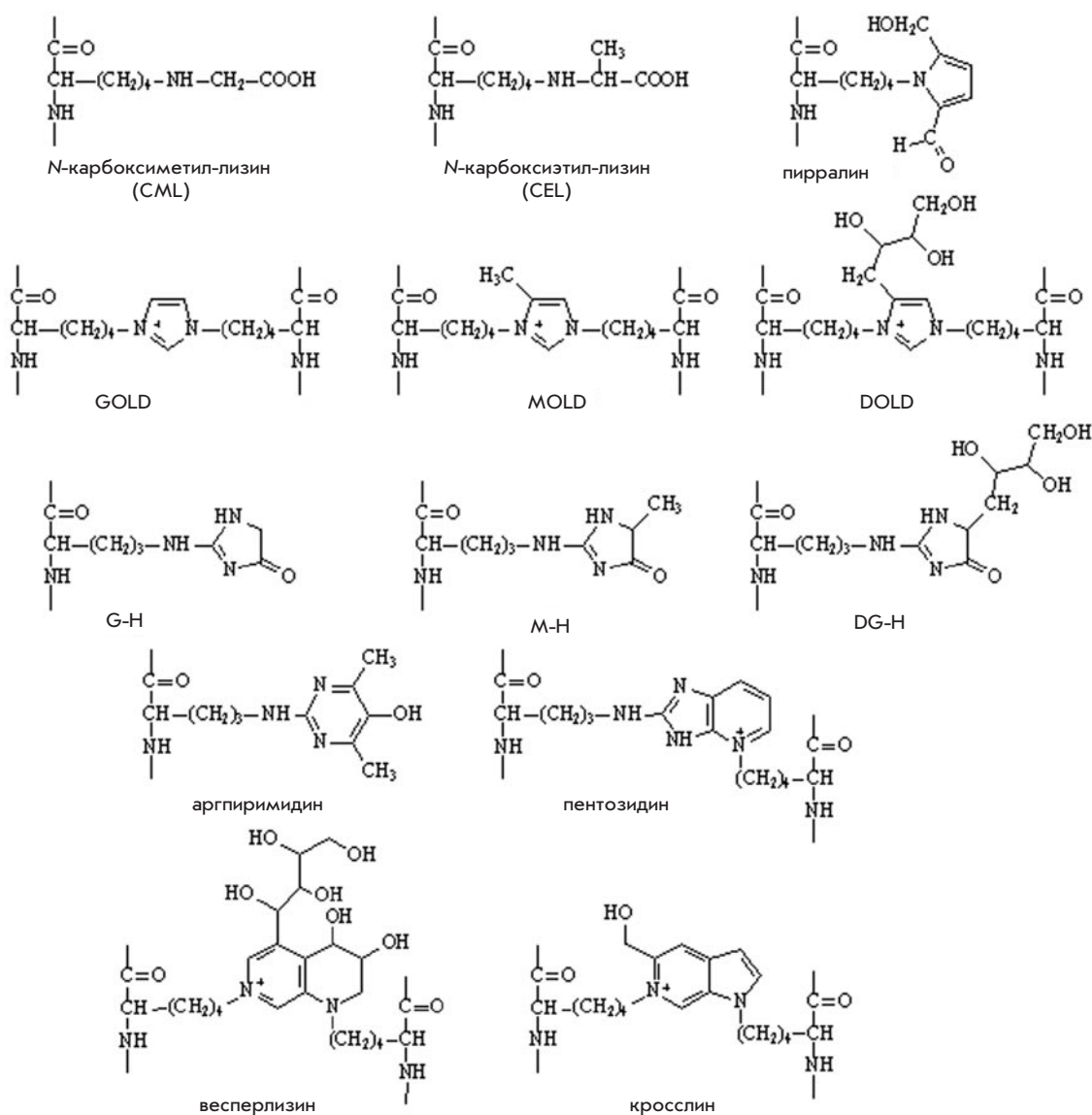


Рис. 26. Структуры некоторых AGEs, образующихся при модификации белков D глюкозой *in vivo*

сильное основание, отщепляющее протон от γ -метиленового углеродного атома глутаминовой кислоты. Образовавшийся карбанион атакует углеродный атом CO_2 с образованием новой C-C связи в малониловой боковой цепи остатка Glu. Восстановление 2,3-эпоксида витамина K в исходную форму происходит под действием 2,3-эпоксидредуктазы (К.Ф. 1.1.4.1), ассоциированной в эндоплазматическом ретикулуме в комплекс с протеиндисульфидизомеразой (К.Ф. 1.8.4.2) [167].

НЕФЕРМЕНТАТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП БЕЛКОВ

ГЛИКИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Гликирование белков представляет собой эндогенное неферментативное присоединение остатков восстанавливающих сахаров, присутствующих в крови, к боковым радика-

лам лизина или аргинина в составе белка. Схема процесса гликирования, который можно условно разделить на раннюю и позднюю стадии, представлена на рис. 25. На первой стадии гликирования происходит нуклеофильная атака карбонильной группы глюкозы ϵ -аминогруппой лизина или гуанидиниевой группировкой аргинина, в результате которой образуется лабильное основание Шиффа – N-гликозиллимин (1). Образование основания Шиффа – процесс относительно быстрый и обратимый [168]. Далее происходит перегруппировка N-гликозиллимина с образованием продукта Амандори – 1-амино-1-дезоксифруктозы (2). Скорость этого процесса ниже, чем скорость образования гликозиллимина, но существенно выше, чем скорость гидролиза основания Шиффа, поэтому белки, содержащие остатки 1-амино-1-дезоксифруктозы, накапливаются в крови. Модификации остатков лизина в белках на ранней стадии гликирования, по-видимому, способствует наличие

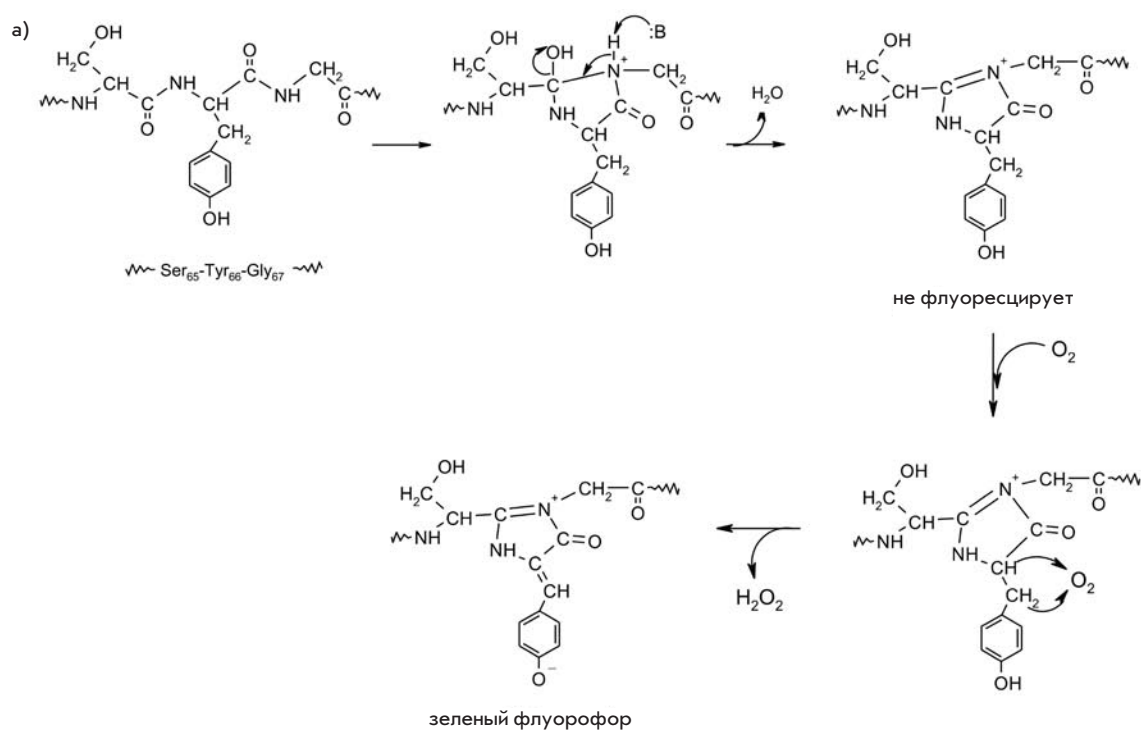
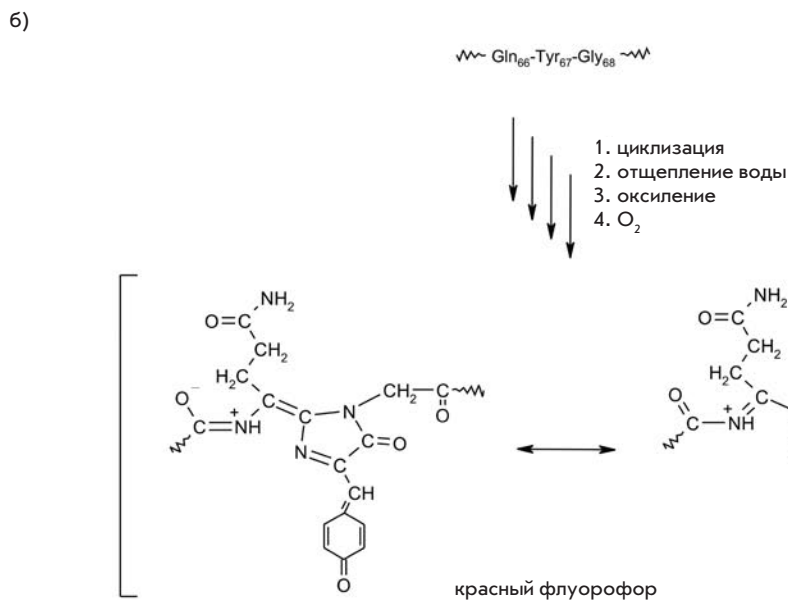


Рис. 27. Схема образования зеленого (а) и красного (б) хромофоров из трипептидов в белках путем внутренней пост-трансляционной автокаталитической циклизации



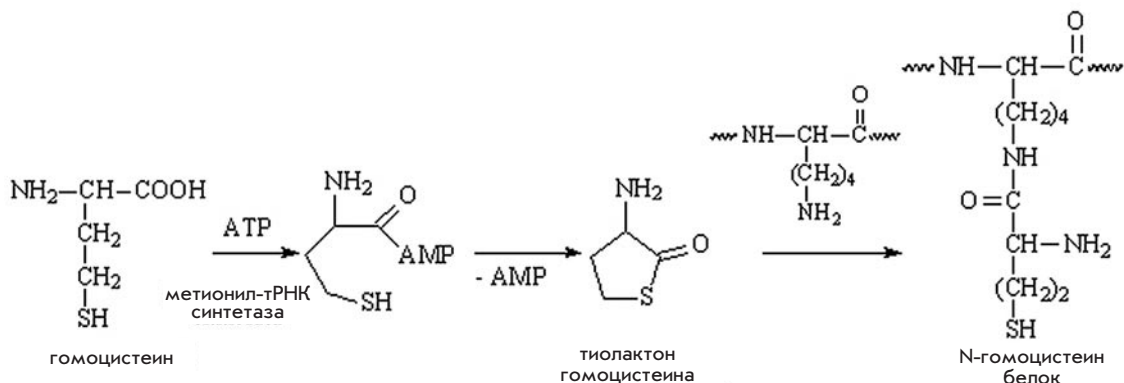
в непосредственной близости от реагирующей аминогруппы остатков гистидина или лизина, которые осуществляют катализ процесса [169].

Поздняя стадия гликирования, включающая дальнейшие превращения *N*-гликозилимины и продукта Амадори, – более медленный и менее изученный процесс, приводящий к образованию стабильных продуктов конечного гликирования (AGEs) (рис. 26). В литературе [170] опубликованы данные о непосредственном участии в формировании AGEs α -дикарбонильных соединений (глиоксала (3),

метилглиоксала (4), 3-дезоксиглюкозона (5)), образующихся *in vivo* как при деградации глюкозы, так и в результате превращений основания Шиффа при модификации лизина в составе белков глюкозой (рис. 25).

Реакции α -дикарбонильных соединений с ϵ -аминогруппами остатков лизина или гуанидиниевыми группировками остатков аргинина в белках приводят к образованию белковых сшивок, которые ответственны за осложнения, вызванные гликированием белков, при диабете и других заболеваниях. Кроме того, в результате последовательной

Рис. 28. N-гомоцистеинилирование белков тиолактоном гомоцистеина



дегидратации продукта Амандори при C4 и C5 образуются 1-амино-4-дезоксидион (6) и ендиион (7) (рис. 25), которые также могут участвовать в образовании внутримолекулярных и межмолекулярных белковых сшивок [170].

Среди AGEs охарактеризованы N_ϵ -карбоксиметил-лизин (CML) и N_ϵ -карбоксиэтил-лизин (CEL) [171], бис(лизил)имидазольные аддукты (GOLD, MOLD и DOLD) [172], имидазолы (G-H, MG-H и ZDG-H) [173, 174], пирралин [175], аргпиримидин [176], пентозидин [177], кросслин [178] и весперлизин [179] (рис. 26). Среди них пентозидин, кросслин и весперлизин являются флуорофорами, причем максимум испускания их флуоресценции ($\lambda_{исп} = 440$ нм) сдвинут в более длинноволновую область относительно флуоресценции остатков триптофана в белках [180]. Это свойство AGEs дает возможность наблюдать за ходом реакции гликирования белков путем измерения флуоресценции при возбуждении на длине волны, характеристической для образующихся в процессе гликирования флуорофоров (глюкофоров).

ВНУТРЕННЯЯ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ АВТОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ЦИКЛИЗАЦИЯ

Один из впечатляющих типов посттрансляционной модификации – это автокаталитическая перестройка пептидного остова в свернутом белке при созревании зеленого флуоресцирующего белка (GFP, green fluorescent protein). Этот белок кодируется одним геном, его хромофор образуется из трех аминокислотных остатков Ser65-Tyr66-Gly67 путем внутренней посттрансляционной автокаталитической циклизации, которая не требует каких бы то ни было кофакторов или субстратов [181–183].

Для образования хромофора необходимо превращение предшественника в структуру β -цилиндра. В свернутом

бесцветном GFP-предшественнике трипептид Ser65-Tyr66-Gly67 находится в пространственно сжатом состоянии, в котором амид Gln-67 может атаковать соседний пептидный карбонил с образованием пятичленного тетраэдрического аддукта (рис. 27, а). Далее аддукт дегидратируется, и образовавшийся стабильный циклический интермедиат медленно автоокисляется с образованием двойной связи, сопряженной с фенольным кольцом Tyr-66. Эта последняя окислительная стадия и генерирует хромофор с максимумом поглощения при 506 нм.

Зеленый флуоресцирующий белок используется в качестве прижизненного маркера, позволяющего исследовать многообразные процессы, происходящие внутри живых клеток и организмов [184–186]. Белки слияния на основе GFP используются для поиска новых лекарств [187, 188], для детекции апоптоза [189], для визуализации динамики хромосом [190] и решения ряда других задач [191, 192]. GFP посвящены отдельные тома в Methods in Enzymology [193] и Methods in Cell Biology [194]. За открытие флуоресцирующих генетических маркеров в 2008 г. была присуждена Нобелевская премия.

В последнее десятилетие быстро растет число исследований с другими цветными белками, подобными GFP, но выделенными из кораллов [195–197]. Недостатком этих белков является ярко выраженная склонность к агрегации, которую, однако, можно преодолеть путем мутагенеза [198]. Схема формирования красного флуорофора из трипептида Gln66-Tyr67-Gly68 в белке представлена на рис. 27, б.

ГОМОЦИСТЕИНИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

В живых организмах подавляющее число процессов метилирования осуществляется S-аденозилметионином, с об-

Рис. 29. S-гомоцистеинилирование белков

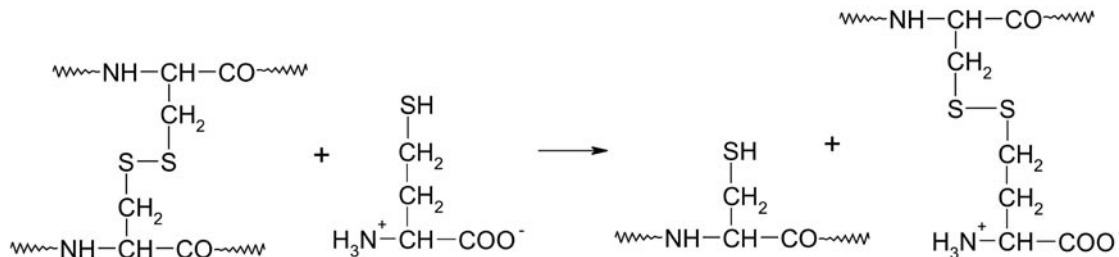
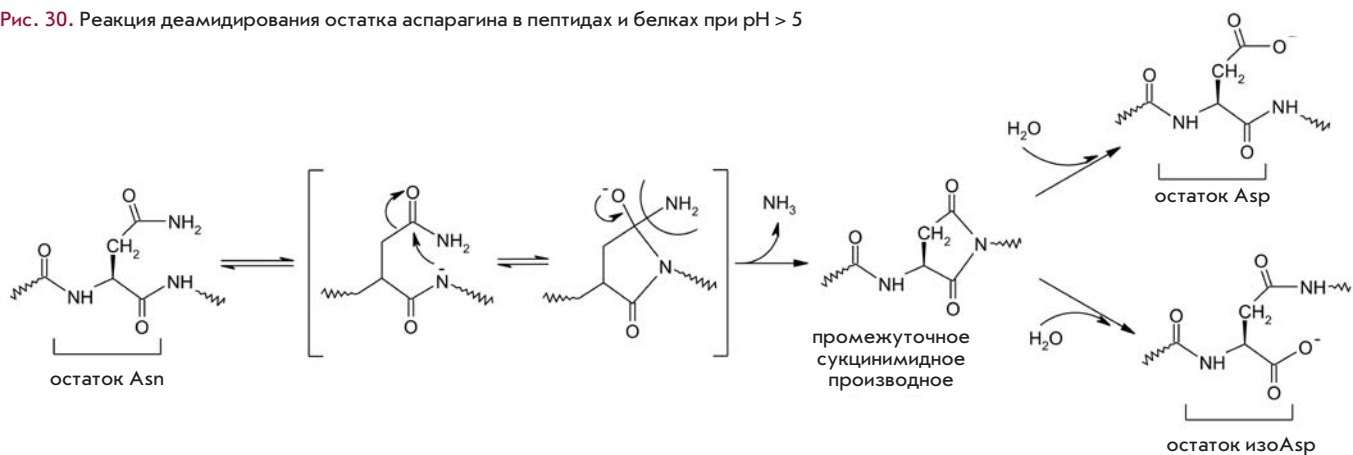


Рис. 30. Реакция деамидирования остатка аспарагина в пептидах и белках при pH > 5



разованием S-аденозилгомоцистеина. Последний гидролизуется ферментом аденозилгомоцистеиназой (К.Ф. 3.3.1.1) до аденозина и гомоцистеина. В реакции, катализируемой метионил-тРНК-синтетазой (КФ 6.1.1.1), гомоцистеин превращается в тиолактон (побочная реакция этого фермента) [199]. Тиолактон гомоцистеина является ацилирующим агентом и может реагировать с функциональной группой остатков лизина [200–203]. При этом происходит нуклеофильная атака ε-аминогруппой лизина карбонильного атома углерода тиолактона, приводящая к раскрытию лактона и образованию дополнительной сульфгидрильной группы (рис. 28).

Такой тип модификации характерен для белков крови (альбумин, гемоглобин, трансферрин, глобулины) [204–207]. В человеческой плазме крови 90 % связанного с белками гомоцистеина входит в состав N-гомоцистеинилированного сывороточного альбумина [201]. Известно, что как *in vitro*, так и *in vivo* основным сайтом гомоцистеинилирования HSA является Lys-525 [208]. Кроме того, идентифицированы два дополнительных сайта модификации альбумина – Lys-4 и Lys-12 [209].

Гомоцистеин может вступать в реакцию дисульфидного обмена с S-S мостиками в белках с образованием S-гомоцистеинилированных белков (рис. 29) [200, 202, 206, 207, 210].

Гомоцистеинилирование белков существенно влияет на их биологическую активность, в т.ч. к повышению чувствительности к окислению, способности к олигомеризации, денатурации и осаждению белков. Введение 8–9 остатков гомоцистеина в метионил-тРНК-синтетазу и 11–12 в трипсин полностью инактивируют эти белки [207]. N-гомоцистеинилирование человеческого сывороточного альбумина существенно снижает его РНК-гидролизующую активность [205]. Множественное гомоцистеинилирование клеточных белков может приводить, в конечном счете, к апоптозу клетки [200, 201, 203, 206, 210].

ДЕАМИДИРОВАНИЕ И ТРАНСАМИДИРОВАНИЕ

Одним из видов посттрансляционной модификации, играющей важную роль в функционировании клетки, является деамидирование амидов дикарбоновых аминокислот. Реакция представляет собой, по мнению многих авторов, нефер-

ментативное отщепление аммиака от амидной группы аспарагина или глутамина через образование промежуточного продукта – циклического имида (рис. 30) [211–215]. Скорость образования этого продукта определяется локальным аминокислотным окружением, свойствами раствора (рН и составом) [213, 214]. Остаток аспарагина в белках подвергается деамидированию в 40 раз чаще, чем остаток глутамина, при этом скорость деамидирования аспарагина в 100 раз быстрее скорости деамидирования глутамина [214].

Циклический имид может распадаться с образованием или остатка аспартата, который образуется в большем количестве (3:1), или остатка изоаспартата, в котором в образовании пептидной связи участвует β-карбоксильная группа боковой цепи аспартата [216, 217]. В последнем случае длина белка увеличивается на одну метиленовую группу (CH₂), что может влиять на структуру и функции белка, в т.ч. и его стабильность [214, 216, 217].

Реакция деамидирования приводит к появлению дополнительной ионизируемой карбоксильной группы, имеющей

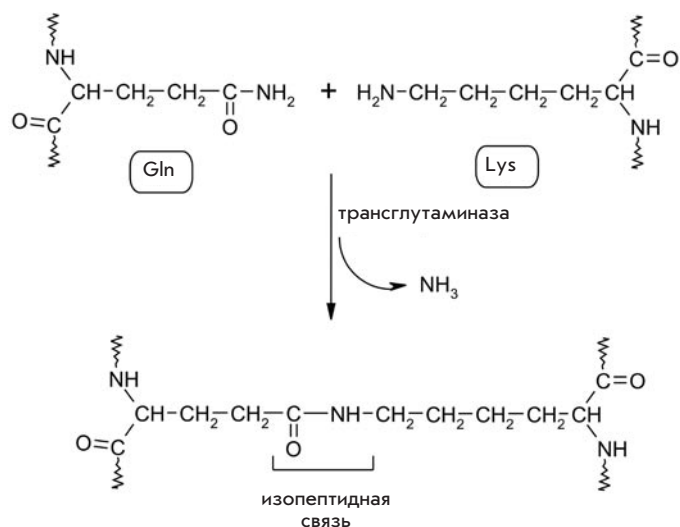


Рис. 31. Реакция трансамидирования, катализируемая трансглутаминой (К.Ф. 2.3.2.13)

при физиологических значениях pH отрицательный заряд, что меняет общий заряд белка, его пространственную структуру [214].

β -Изопептидная связь, образованная боковыми цепями остатков лизина и глутамина и воспринимаемая организмом как отклонение от нормальной пептидной связи, в образовании которой участвуют α -аминогруппы и карбоксильные группы аминокислот, корректируется с помощью протеинизоаспартил-О-метилтрансферазы (PIMT) (К.Ф. 2.1.1.77), широко распространенного клеточного фермента [211, 212, 216]. Реакция деаμίдирования Asn/Gln и дефицит PIMT вызывают серьезные заболевания у человека: катаракту [218], болезнь Альцгеймера [219], аутоиммунные заболевания [220], прион-зависимые энцефалопатии [214, 221, 222].

По гипотезе Робинсона нестабильность аспарагинового и глутаминового остатков в составе клеточных белков в физиологических условиях определяет их важнейшую биологическую функцию, а именно служит программируемыми молекулярными часами, определяющими время жизни белков и пептидов [212, 223, 224].

Деаμίдирование, как и ADP-рибозилирование, может вызываться также бактериальными токсинами. Цитотоксический некротический фактор 1 из *Escherichia coli* (CNF1) и дермонекротический токсин *Bordetella* (DNT) деа-

мидируют малые GТразы человека: Rho A (Gln63), Rac1 и Cdc42 (Gln61), что приводит к блокированию гидролиза GTP и нарушению регуляции перестроек цитоскелета клетки [225–228].

Деаμίдирование довольно часто сопряжено с последующим трансамидированием (взаимодействием ϵ -аминогруппы остатка лизина в белке с боковой цепью остатка глутамина в том же белке), представляющим собой один из видов шивок, характерных для посттрансляционной модификации (рис. 31) [228–232].

В результате образуются многочисленные связи между остатками глутамина и лизина в молекулах белка, что приводит к образованию белкового агрегата с большой молекулярной массой, субъединицы которого связаны поперечными шивками. Это имеет важное значение в метаболизме кожных и волосных покровов, тромбообразовании и заживлении ран [233]. ●

Работа по влиянию химической модификации человеческого сывороточного альбумина на РНК-гидролизующую активность белка выполнена при поддержке Междисциплинарного интеграционного проекта фундаментальных исследований СО РАН № 88 и гранта РФФИ 09-04-01483а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Walsh C.T., Garneau-Tsodikova S., Gatto G.J. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005. V. 44. № 45. P. 7342–7372.
- Lehninger A. *Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company. 2008.
- Karpeyev M.Y., Ivanov V.I. *Nature*. 1966. V. 210. № 30. P. 493–496.
- Lowe J.N., Ingraham L.L. *An Introduction to Biochemical Reactions Mechanisms*. Chap. 3. *Foundation of Molecular Biology Series*. New Jersey: Prentice-Hall, Englewood Cliffs. 1974.
- Hubbard S.R.. *Handbook of Cell Signaling*. 2009. ch. 58. P. 413–418.
- Hubbard S.R., Miller W.T. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007. V. 19. № 2. P. 117–123.
- Ubersax J.A., Ferrell J.E.Jr. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. № 7. P. 530–541.
- Beene D.L., Scott J.D. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007. V. 19. № 2. P. 192–198.
- Aleman R., Perona J.S., Sanchez-Dominguez J.M., Montero E., Canizares J., Escriba P.V. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1768. № 4. P. 964–975.
- Saltiel A.R., Pessin J.E. *Trends Cell Biol.* 2002. V. 12. № 2. P. 65–71.
- Maures T.J., Kurzer J.H., Carter-Su C. *Trends Endocrinol. Metab.* 2007. V. 18. № 1. P. 38–45.
- Patwardhan P., Miller W.T. *Cell. Signal.* 2007. V. 19. № 11. P. 2218–2226.
- Lieser S.A., Aubol B.E., Wong L., Jennings P.A., Adams J.A. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1754. № 1–2. P. 191–199.
- Bublil E.M., Yarden Y. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007. V. 19. № 2. P. 124–134.
- Dorsam R.T., Gutkind J.S. *Nat. Rev. Cancer.* 2007. V. 7. № 2. P. 79–94.
- Viallard J.F., Lacombe F., Belloc F., Pellegrin J.L., Reiffers J. *Cancer Radiother.* 2001. V. 5. № 2. P. 109–129.
- Syeed A.S., Vohra H., Gupta A., Ganguly N. *Curr. Science.* 2001. V. 80. № 3. P. 349–360.
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H. *Trends Plant Sci.* 2005. V. 10. № 7. P. 339–346.
- Chau B.N., Wang J.Y.J. *Nat. Rev. Cancer.* 2003. V. 3. P. 130–138.
- Johnson L.N., Lewis R.J. *Chem. Rev.* 2001. V. 101. № 8. P. 2209–2242.
- Birnbaumer L. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1768. № 4. P. 756–771.
- Cooper D.M.F., Crossthwaite A.J. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006. V. 27. № 8. P. 26–431.
- Willoughby D., Cooper D.M.F. *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. P. 965–1010.
- Deng X., Mercer P.F., Scotton C.J., Gilchrist A., Chambers R.C. *Mol. Biol. Cell.* 2008. V. 19. № 6. P. 2520–2533.
- Xu Y. *Cell Death Differ.* 2003. V. 10. № 4. P. 400–403.
- Lindner H.H. *Electrophoresis.* 2008. V. 29. № 12. P. 2516–2532.
- Sarg B., Chwatal S., Talasz H., Lindner H.H. *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 6. P. 3610–3618.
- Dahmus M.E. *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 32. P. 19009–19012.
- Lee T.I., Young R.A. *Annu. Rev. Genet.* 2000. 34. P. 77–137
- Bottomley M.J. *EMBO Rep.* 2004. V. 5. № 5. P. 464–469.
- Owen D.J., Ornaghi P., Yang J.-C., Lowe N., Evans P.R., Ballario P., Neuhaus D., Filetici P., Travers A.A. *EMBO J.* 2000. V. 19. № 22. P. 6141–6149.
- Mukherjee S., Hao Y.-H., Orth K. *Trends Biochem. Sci.* 2007. V. 32. № 5. P. 210–216.
- Margueron R., Trojer P., Reinberg D. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 2005. V. 15. № 2. P. 163–176.
- Shen S., Casaccia-Bonnel P. *J. Mol. Neurosci.* 2008. V. 35. № 1. P. 13–22.
- Iizuka M., Smith M.M. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 2003. V. 13. № 2. P. 154–160.
- Couture J.F., Trievel R.C. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2006. V. 16. № 6. P. 753–760.
- Cole P.A. *Nat. Chem. Biol.* 2008. V. 4. № 10. P. 590–597.
- Strahl B.D., Allis C.D. *Nature.* 2004. V. 430. № 6765. P. 41–45.
- Khorasanizadeh S. *Cell.* 2004. V. 116. № 2. P. 259–272.
- Feng L., Lin T., Uranishi H., Gu W., Xu Y. *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. № 13. P. 5389–5395.
- Desmeules P., Penney S.-E., Desbat B., Saless C. *Biophys. J.* 2007. V. 93. № 6. P. 2069–2082.
- Farazi T.A., Waksman G., Gordon J.I. *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 43. P. 39501–39504.
- Smotryz J.E., Linder M.E. *Annu. Rev. Biochem.* 2004. V. 73. P. 559–587.
- Tanimura N., Saitoh S., Kawano S., Kosugi A., Miyake K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 341. № 4. P. 1177–1183.
- Resh M.D. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1451. № 1. P. 1–16.
- Adams J.A. *Chem. Rev.* 2001. V. 101. № 2. P. 2271–2290.
- Pechlivanis M., Kuhlmann J. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1764. № 12. P. 1914–1931.
- Selvakumar P., Lakshmiikuttyamma A., Shrivastava A., Das S.B., Dimmock J.R., Sharma R.K. *Progr. Lipid Res.* 2007. V. 46. № 1. P. 1–36.
- Dietrich L.E.P., Ungermann C. *EMBO Rep.* 2004. V. 5. № 11. P. 1053–1057.
- Drisdell R.C., Alexander J.C., Sayeed A., Green W.N. *Methods.* 2006. V. 40. № 2. P. 127–134.
- Hemsley P. A., Grierson C.S. *Trends Plant Sci.* 2008. V. 13. № 6. P. 295–302.
- Pickart C.M. *Annu. Rev. Biochem.* 2001. V. 70. P. 503–533.
- Glickman M.H., Ciechanover A. *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. № 2. P. 373–428.
- Pickart C.M. *Cell.* 2004. V. 116. № 2. P. 181–190.
- Finley D., Ciechanover A., Varshavsky A. *Cell.* 2004. V. 116. 2 Suppl. P. S29–S32.
- Capili A.D., Lima C.D. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2007. V. 17. № 6. P. 726–735.
- Pickart C. M., Eddins M. J. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. V. 1695. № 1–3. P. 55–72.
- Herrmann J., Lerman L.O., Lerman A. *Circ. Res.* 2007. V. 100. № 9. P. 1276–1291.
- Schwartz D.C., Hochstrasser M. *Trends Biochem. Sci.* 2003. V. 28. № 6. P. 321–328.
- Li W., Ye Y. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. № 15. P. 2397–2406.
- Pickart C.M., Fushman D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004. V. 8. № 6. P. 610–616.
- Aguilar R.C., Wendland B. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003. V. 15. № 2. P. 184–190.
- Pickart C.M. *Mol. Cell.* 2001. V. 8. № 3. P. 499–504.
- Gill G. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005. V. 15. № 5. P. 536–541.
- Smith B.C., Denu J.M. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1789. № 1. P. 45–57.
- Scoumanne A., Chen X. *Histol. Histopathol.* 2008. V. 23. № 9. P. 1143–1149.
- Marmorstein R., Trievel R.C. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1789. № 1. P. 58–68.
- Berger S.L. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002. V. 12. № 2. P. 142–148.

69. Loyola A., Almouzni G. *Trends Biochem. Sci.* 2007. V. 32. № 9. P. 425–433.
70. Lachner M., Jenuwein T. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002. V. 14. № 3. P. 286–298.
71. de La Roche Saint-André C. *Biochimie*. 2005. V. 87. № 7. P. 603–612.
72. Kiefer J.C. *Develop. Dynamics*. 2007. V. 236. № 4. P. 1144–1156.
73. Lane K.T., Beese L.S. *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. № 4. P. 681–699.
74. Leung K.F., Baron R., Seabra M.C. *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. № 3. P. 467–475.
75. Pylypenko O., Rak A., Durek T., Kushnir S., Dursina B.E., Thome N.H., Constantinescu A.T., Brunsfeld L., Watzke A., Waldmann H., Goody R.S., Alexandrov K. *EMBO J.* 2006. V. 25. № 1. P. 13–23.
76. Lu J.-Y., Hofmann S.L. *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. № 7. P. 1352–1357.
77. Kinsella B.T., Erdman R.A., Maltese W.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. № 20. P. 8934–8938.
78. Maltese W.A. *FASEB J.* 1990. V. 4. № 15. P. 3319–3328.
79. Basso A.D., Kirschmeier P., Bishop W.R. *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. № 1. P. 15–31.
80. Magee T., Seabra M.C. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005. V. 17. № 2. P. 190–196.
81. Lan F., Nottke A.C., Shi Y. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008. V. 20. № 3. P. 316–325.
82. Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J.R., Cole P.A., Casero R.A. *Cell.* 2004. V. 119. № 7. P. 941–953.
83. Tsvakada Y., Fang J., Erdjument-Bromage H., Warren M. E., Borchers C.H., Tempst P., Zhang Y. *Nature*. 2006. V. 439. № 7078. P. 811–816.
84. Baron R.A., Seabra M.C. *Biochem. J.* 2008. V. 415. № 1. P. 67–75.
85. Roberts P.J., Mitin N., Keller P.J., Chenette E.J., Madigan J.P., Currin R.O., Cox A.D., Wilson O., Kirschmeier P., Der C.J. *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 37. P. 25150–25163.
86. Wright L.P., Phillips M.R. *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. № 5. P. 883–891.
87. Leung K.F., Baron R., Ali B.R., Magee A.I., Seabra M.C. *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 2. P. 1487–1497.
88. Lehle L., Strahl S., Tanner W. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006. V. 45. № 41. P. 6802–6818.
89. Lowe J.B., Marth J.D. *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 643–691.
90. Parodi A.J. *Annu. Rev. Biochem.* 2000. V. 69. P. 69–93.
91. Parodi A.J. *Biochem. J.* 2000. V. 348. Pt. 1. P. 1–13.
92. Caramelo J.J., Parodi A. *J. Semin. Cell. Dev. Biol.* 2007. V. 18. № 6. P. 732–742.
93. Deprez P., Gautschi M., Helenius A. *Mol. Cell.* 2005. V. 19. № 2. P. 183–195.
94. Dejgaard S., Nicolay J., Taheri M., Thomas D.Y., Bergeron J.J.D. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2004. V. 6. № 1. P. 29–42.
95. Roth J. *Chem. Rev.* 2002. V. 102. № 2. P. 285–303.
96. Lis H., Sharon N. *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 218. № 1. P. 1–27.
97. Zachara N.E., Hart G.W. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1761. № 5–6. P. 599–617.
98. Wells L., Whelan S.A., Hart G.W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 302. № 3. P. 435–441.
99. Goto M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007. V. 71. № 6. P. 1415–1427.
100. Gerken T.A., Gilmore M., Zhang J. *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 10. P. 7736–7751.
101. Ohtsubo K., Marth J.D. *Cell.* 2006. V. 126. № 5. P. 855–867.
102. Haines N., Irvine K.D. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 4. № 10. P. 786–797.
103. Bojarova P., Williams S.J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008. V. 12. № 5. P. 573–581.
104. Chapman E., Best M.D., Hanson S.R., Wong C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004. V. 43. № 27. P. 3526–3548.
105. Ghosh D. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007. V. 64. № 15. P. 2013–2022.
106. Hanson S.R., Best M.D., Wong C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004. V. 43. № 43. P. 5736–5763.
107. Koch-Nolte F., Adriouch S., Bannas P., Krebs C., Scheuplein F., Seman M., Haag F. *Ann. Med.* 2006. V. 38. № 3. P. 188–199.
108. Sakurai J., Nagahama M., Hisatsune J., Katunuma N., Tsuge H. *Advan. Enzyme Regul.* 2003. V. 43. P. 361–377.
109. Tsuge H., Nagahama M., Nishimura H., Hisatsune J., Sakaguchi Y., Itogawa Y., Katunuma N., Sakurai J. *J. Mol. Biol.* 2003. V. 325. № 3. P. 471–483.
110. Holbourn K.P., Sutton J.M., Evans H.E., Shone C.C., Acharya K.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 15. P. 5357–5362.
111. Krueger K.M., Barbieri J.T. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995. V. 8. № 1. P. 34–47.
112. Kaslow H.R., Lim L.K., Moss J., Lesikar D.D. *Biochemistry*. 1987. V. 26. № 1. P. 123–127.
113. Spangler B.D. *Microbiol. Rev.* 1992. V. 56. № 4. P. 622–647.
114. Collier R.J. *Bacteriol. Rev.* 1975. V. 39. № 1. P. 54–85.
115. Jorgensen R., Merrill A.R., Andersen G.R. *Biochem. Soc. Trans.* 2006. V. 34. Pt. 1. P. 1–6.
116. Jorgensen R., Merrill A.R., Yates S.P., Marquez V.E., Schwan A.L., Boesen T., Andersen G.R. *Nature*. 2005. V. 436. № 7053. P. 979–984.
117. Yates S.P., Jorgensen R., Andersen G.R., Merrill A.R. *Trends Biochem. Sci.* 2006. V. 31. № 2. P. 123–133.
118. Lindahl T. *Nature*. 1993. V. 362. № 6422. P. 709–715.
119. Sharer O.D. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003. V. 42. P. 2946–2974.
120. Bernstein C., Bernstein H., Payne C.M., Garewal H. *Mutat. Res.* 2002. V. 511. № 2. P. 145–178.
121. Althaus F.R., Kleczowska H.E., Malanga M., Muntener C.R., Pleschke J.M., Ebner M., Auer B. *Mol. Cell. Biochem.* 1999. V. 193. № 1–2. P. 5–11.
122. Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M., Hottiger M.O. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006. V. 70. № 3. P. 789–829.
123. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. *Biochem. J.* 1999. V. 342. Pt. 2. P. 249–268.
124. Nguewa P.A., Fuertes M.A., Valladares B., Alonso C., Perez J.M. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2005. V. 88. № 1. P. 143–172.
125. Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G. *Natl. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 7. № 7. P. 517–528.
126. Fan J., Wilson D.M. *Free Radic. Biol. Med.* 2005. V. 38. № 9. P. 1121–1138.
127. Sallmann F.R., Vodenicharov M.D., Wang Z.Q., Poirier G.G. *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 20. P. 15504–15511.
128. Ame J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. *BioEssays*. 2004. V. 26. № 8. P. 882–893.
129. Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. *Genes Dev.* 2005. V. 19. № 17. P. 1951–1967.
130. Yamanaka H., Penning C.A., Willis E.H., Wasson D.B., Carson D.A. *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 8. P. 3879–3883.
131. Ikejima M., Marsischky G., Gill D.M. *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 36. P. 17641–17650.
132. Kawauchi M., Ueda K., Hayaishi O. *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 3. P. 816–819.
133. Ueda K., Kawauchi M., Okayama H., Hayaishi O. *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. № 3. P. 679–687.
134. Alvarez-Conzalez R. *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 33. P. 17690–17696.
135. Rolli V., O'Farrell M., Menissier de Murcia J., de Murcia G. *Biochemistry*. 1997. V. 36. № 40. P. 12147–12154.
136. Miwa M., Saikawa N., Yamaizumi Z., Nishimura S., Sugimura T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. № 2. P. 595–599.
137. Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Conzalez R. *Biochemistry*. 1987. V. 26. № 11. P. 3218–3224.
138. Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Conzalez R. *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 30. P. 22575–22580.
139. Zahradka P., Ebisuzaki K. *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 2. P. 986–995.
140. Lindahl T. *Mutat. Res.* 2000. V. 462. № 2–3. P. 129–135.
141. Tanuma S., Yagi T., Johnson G.S. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985. V. 237. № 1. P. 38–42.
142. Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M., Hottiger M.O. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006. V. 70. № 3. P. 789–829.
143. Ying J., Clavreul N., Sethuraman M., Adachi T., Cohen R.A. *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 43. № 8. P. 1099–1108.
144. Giles N.M., Giles G.I., Jacob C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 300. № 1. P. 1–4.
145. Jones D.P., Go Y.-M., Anderson C.L., Ziegler T.R., Kinkade J.M., Kirilov W.G. *FASEB J.* 2004. V. 18. № 11. P. 1246–1248.
146. Go Y.-M., Jones D.P. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1780. № 11. P. 1273–1290.
147. Jacob C., Giles G.I., Giles N.M., Sies H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003. V. 42. № 39. P. 4742–4758.
148. Giles N.M., Watts A.B., Giles G.I., Fry F.H., Littlechild J.A., Jacob C. *Chem. Biol.* 2003. V. 10. № 8. P. 677–693.
149. Kemp M., Go Y.-M., Jones D.P. *Free Radic. Biol. Med.* 2008. V. 44. № 6. P. 921–937.
150. Iwakiri Y., Satoh A., Chatterjee S., Toomre D.K., Chalouni C.M., Fulton D., Grossmann R.J., Shah V.H., Sessa W.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 52. P. 19777–19782.
151. Yang Y., Loscalzo J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 1. P. 117–122.
152. Doctor A., Platt R., Sheram M.L., Eischeid A., McMahon T., Maxey T., Doherty J., Axelrod M., Kline J., Gurka M., Gow A., Gaston B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 16. P. 5709–5714.
153. Torta F., Usueli V., Malgaroli A., Bachi A. *Proteomics*. 2008. V. 8. № 21. P. 4484–4494.
154. Stamler J.S., Lamas S., Fang F.C. *Cell.* 2001. V. 106. № 6. P. 675–683.143.
155. Myllyharju J., Kivirikko K.I. *Trends Gen.* 2004. V. 20. № 1. P. 33–43.
156. Koivunen P., Hirsila M., Gunzler V., Kivirikko K.I., Myllyharju J. *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 11. P. 9899–9904.
157. Lando D., Peet D.J., Whelan D.A., Gorman J.J., Whitelaw M.L. *Science*. 2002. V. 295. № 5556. P. 858–861.
158. Clifton L.J., Hsueh L.C., Baldwin J.E., Harlos K., Schofield C.J. *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. № 24. P. 6625–6636.
159. Bruick R.K., McKnight S.L. *Science*. 2001. V. 294. № 5545. P. 1337–1340.
160. Ratcliffe P.J. *Blood. Purif.* 2002. V. 20. № 5. P. 445–450.
161. Marxsen J.H., Stengel P., Doege K., Heikinen P., Jokilehto T., Wagner T., Jekmann W., Jaakkola P., Metzner E. *Biochem. J.* 2004. V. 381. Pt. 3. P. 761–767.
162. Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 14. P. 7987–7992.
163. Kallio P.J., Wilson W.J., O'Brien S., Makino Y., Poellinger L. *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 10. P. 6519–6525.
164. Furie B., Bouchard B.A., Furie B.C. *Blood*. 1999. V. 93. № 6. P. 1798–1808.
165. Bandyopadhyay P.K. *Vitam. Horm.* 2008. V. 78. P. 157–184.
166. Stafford D.W. *J. Thromb. Haemost.* 2005. V. 3. № 8. P. 1873–1878.
167. Wajih N., Hutson S.M., Wallin R. *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 4. P. 2626–2635.
168. Ulrich P., Cerami A. *Recent Prog. Horm. Res.* 2001. V. 56. P. 1–21.
169. Acosta J., Hettinga J., Fluckiger R., Krumrei N., Goldfine A., Angarita L., Halperin J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 10. P. 5450–5455.
170. Thornalley P.J., Langborg A., Minhas H.S. *Biochem. J.* 1999. V. 344. № 1. P. 109–116.
171. Ramirez P., Del Razo L.M., Gutierrez-Ruiz M.C., Gonshebbat M.E. *Carcinogenesis*. 2000. V. 21. № 4. P. 701–706.
172. Frye E.B., Degenhardt T.P., Thorpe S.R., Baynes J.W. *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 30. P. 18714–18719.
173. Paul R.G., Avery N.C., Slatter D.A., Sims T.J., Bailey A.J. *Biochem. J.* 1998. V. 330. № 3. P. 1241–1248.
174. Niwa T., Katsuzaki T., Ishizaki Y., Hayase F., Miyazaki T., Uematsu T., Tatemichi N., Takei Y. *FEBS Lett.* 1997. V. 407. № 3. P. 297–302.
175. Hayase F., Nagaraj R.H., Miyata S., Njoroge F.G., Monnier V.M. *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 7. P. 3758–3764.
176. Wilker S.C., Chellan P., Arnold B.M., Nagaraj R.H. *Anal. Biochem.* 2001. V. 290. № 2. P. 353–358.

177. Sell D.R., Monnier V.M. *J. Clin. Invest.* 1990. V. 85. P. 380–384.
178. Obayashi H., Nakano K., Shigeta H., Yamaguchi M., Yoshimori K., Fukui M., Fujii M., Kitagawa Y., Nakamura N., Nakazawa Y., Ienaga K., Ohta M., Nishimura M., Fukui I., Kondo M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 226. № 1. P. 37–41.
179. Tessier F., Obrenovich M., Monnier V.M. *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 30. P. 20796–20804.
180. Schmitt A., Schmitt J., Muench G., Gasic-Milencovich J. *Anal. Biochem.* 2005. V. 338. P. 201–215.
181. Tsien R. *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 509–544.
182. Зубова Н.Н., Булавина А.Ю., Савицкий А.П. *Успехи биол. химии.* 2003. Т. 43. С. 163–224.
183. Zimmer M. *Chem. Rev.* 2002. V. 103. № 3. P. 759–781.
184. Wouters F.S., Verveer P.J., Bastiaens P.I. *Trends Cell. Biol.* 2001. V. 11. № 5. P. 203–211.
185. Toomre D., Manstein D.J. *Trends Cell. Biol.* 2001. V. 11. № 7. P. 298–303.
186. Зубова Н.Н., Савицкий А.П. *Успехи биол. химии.* 2005. Т. 45. С. 391–454.
187. Kain S.R. *Drug. Discov. Today.* 1999. V. 4. № 7. P. 304–312.
188. Taylor D.I., Woo E.S., Giuliano K.A. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. V. 12. № 1. P. 75–81.
189. Shinbrot E., Spencer C., Natale V., Kain S.R. *Meth. Enzymol.* 2000. V. 327. P. 513–522.
190. Belmont A.S. *Trends Cell. Biol.* 2001. V. 11. № 6. P. 250–257.
191. Matus A. *Trends Cell. Biol.* 1999. V. 9. № 2. P. 43.
192. Matus A. *Trends Cell. Biol.* 2001. V. 11. № 5. P. 183.
193. *Green Fluorescent Protein in Methods in Enzymology* (Conn P.M., ed.) 1999. Academic Press, New York. V. 302. P. 11–449.
194. *Green Fluorescent Protein in Methods in Cell Biology* (Sullivan K.F., Kay S.A., eds.) 1999. Academic Press, New York/ V. 58. P. 1–367.
195. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zarsisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. *Nat. Biotechnol.* 1999/ V. 17. P. 969–973.
196. Lukyanov K.A., Fradkov A.F., Gurskaya N.G., Matz M.V., Labas Y.A., Savitsky A.P., Markelov M.L., Zarsisky A.G., Zhao X., Fang Y., Tan W., Lukyanov S.A. *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 25879–25882.
197. Verkhusha V.V., Lukyanov K.A. *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 289–296.
198. Yanushevich Y.G., Staroverov D.B., Savitsky A.P., Fradkov A.F., Gurskaya N.G., Bulina M.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. *FEBS Lett.* 2002. V. 511. P. 11–14.
199. Jakubowski H. *J. Nutr.* 2000. V. 130. 2S Suppl. P. 377S–381S.
200. Perla-Kajan J., Twardowski T., Jakubowski H. *Amino Acids.* 2007. V. 32. № 4. P. 561–572.
201. Jakubowski H. *J. Nutr.* 2006. V. 136. 6S Suppl. P. 1741S–1749S.
202. Jakubowski H. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004. V. 61. № 4. P. 470–487.
203. Jakubowski H. *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 34. P. 30425–30428.
204. Jakubowski H. *J. Clin. Chem. Lab. Med.* 2005. V. 41. № 10. P. 1011–1014.
205. Gerasimova Y.V., Knorre D.G., Shakirov M.M., Godovikova T.S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. V. 18. №16. P. 5396–5398.
206. Jakubowski H., Zhang L., Bardegué A., Aviv A. *Circ. Res.* 2000. V. 87. № 1. P. 45–51.
207. Jakubowski H. *FASEB J.* 1999. V. 13. №15. P. 2277–2283.
208. Glowacki R., Jakubowski H. *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 2. P. 10864–10871.
209. Sikora M., Marczak L., Stobiecki M., Twardowski T., Jakubowski H. *FEBS J.* 2007. V. 274. (supplement 1) P. 295.
210. Glushchenko A. V., Jacobsen D. W. *Antioxid. Redox Signal.* 2007. V. 9. P. 1883–1898.
211. Wright H.T. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1991. V. 26. №1. P. 1–52.
212. Robinson N.E., Robinson A.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 22. P. 12409–12413.
213. Wakankar A. A., Borchardt R.T. *J. Pharm. Sci.* 2006. V. 95. P. 2321–2336.
214. Powell B.S., Enama J.T., Ribot W.J., Webster W., Little S., Hoover T., Adamovicz J.J., Andrews G.P. *Proteins.* 2007. V. 68. № 2. P. 458–479.
215. Catak S., Monard G., Aviyente V., Ruiz-Lopez M.F. *J. Phys. Chem. A.* 2006. V. 110. № 27. P. 8354–8365.
216. Reissner K.J., Aswad D.W. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003. V. 60. № 7. P. 1281–1295.
217. Aswad D.W., Paranandi M.V., Schurter B.T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000. V. 21. № 6. P. 1129–1136.
218. Takata T., Oxford J.T., Brandon T.R., Lampi K.J. *Biochemistry.* 2007. V. 46. № 30. P. 8861–8871.
219. Hasegawa M., Morishima-Kawashima M., Takio K., Suzuki M., Titani K., Ihara Y. *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 24. P. 17047–17054.
220. Doyle H.A., Gee R.J., Mamula M.J. *J. Immunol.* 2003. V. 171. № 6. P. 2840–2847.
221. Weber D.J., McFadden P.N., Caughy B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 246. № 3. P. 606–608.
222. Sandmeier E., Hunziker P., Kunz B., Sack R., Christen P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 261. № 3. P. 578–583.
223. Robinson A.B., McKerrow J.H., Cary P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1970. V. 66. № 3. P. 753–757.
224. Robinson N.E., Robinson A.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 3. P. 944–949.
225. Schmidt G., Sehr P., Wilm M., Selzer J., Mann M., Aktories K. *Nature.* 1997. V. 387. № 6634. P. 725–729.
226. Hoffmann C., Schmidt G. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2004. V. 152. P. 49–63.
227. McNichol B.A., Rasmussen S.B., Carvalho H.M., Meysick K.C., O'Brien A.D. *Infect. Immun.* 2007. V. 75. № 11. P. 5095–5104.
228. Jank T., Pack U., Giesemann T., Schmidt G., Aktories K. *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 28. P. 19527–19535.
229. Stammaes J., Fleckenstein B., Sollid L.M. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1784. № 11. P. 1804–1811.
230. Caputo I., D'Amato A., Troncone R., Auricchio S., Esposito C. *Amino Acids.* 2004. V. 26. № 4. P. 381–386.
231. Cardamone J.M. *Int. J. Biol. Macromol.* 2008. V. 42. № 5. P. 413–419.
232. Greenberg C.S., Birckbichler P.J., Rice R.H. *FASEB J.* 1991. V. 5. № 15. P. 3071–3077.
233. Griffin M., Cassadio R., Bergamini C.M. *Biochem. J.* 2002. V. 368. Pt. 2. P. 377–396.