

На правах рукописи

Моисеева

Татьяна Николаевна

**РОЛЬ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ В РЕГУЛЯЦИИ
АКТИВНОСТЕЙ ПРОТЕАСОМ ПРИ ГЕНОТОКСИЧЕСКОМ СТРЕССЕ
В КЛЕТКАХ K562**

03.01.03. – молекулярная биология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Научные руководители: доктор биологических наук
Барлев Николай Анатольевич,
Институт цитологии РАН,

кандидат биологических наук
Миттенберг Алексей Георгиевич
Институт цитологии РАН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Корнилова Елена Сергеевна,
Институт цитологии РАН,

доктор биологических наук, профессор
Перевозчиков Андрей Петрович,
НИИ экспериментальной медицины РАМН,

Ведущая организация: Санкт-Петербургский государственный Университет,
биолого-почвенный факультет

Защита диссертации состоится «22» октября 2010 года в 14 часов на заседании
Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу:
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4
e-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru
Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>
Факс: 8(812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан «20» сентября 2010 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В.Каминская

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы.

Регуляторы протеолитических активностей протеасом получили широкое применение в медицине в качестве противоопухолевых препаратов. Для лечения онкологических заболеваний используются различные ингибиторы протеасом: бортезомиб, эпоксимицин, лактацистин, салиноспорамиды, сириngoлин и другие (Moore et al., 2008). Данные препараты способны специфически подавлять одну или несколько пептидазных активностей протеасом, изменяя спектр расщепляемых ими белковых субстратов. Однако в природе протеолитические активности протеасом также подвергаются тонкому регулированию при различных изменениях физиологического состояния клетки или стрессовых воздействиях. В этих случаях изменяется как субъединичный состав протеасом, так и спектр их посттрансляционных модификаций.

Наиболее известным примером протеасомы с изменённым субъединичным составом может служить иммунопротеасома, в которой каталитические субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ заменены их индуцибельными аналогами $\beta 1i$, $\beta 2i$ и $\beta 5i$, соответственно. Содержание в клетке таких протеасом увеличивается под воздействием иммуномодулятора гамма-интерферона. Пептидазные активности иммунопротеасомы существенно отличаются от таковых для обычной протеасомы, что приводит к более эффективному образованию пептидов для представления на молекулах главного комплекса гистосовместимости класса 1 (Tanaka and Kasahara, 1998). Кроме того, недавно появились данные о существовании тканеспецифичной субъединицы $\beta 5t$, экспрессирующейся исключительно в тимоцитах. При включении такого белка вместо субъединицы $\beta 5$ трипсиноподобная активность протеасом существенно снижается, что позволяет говорить о специфической регуляции пептидазных активностей через изменение субъединичного состава протеасом (Murata et al., 2008).

Другим важнейшим способом регуляции активностей белков являются различные посттрансляционные модификации. Большое количество протеомных исследований протеасом привело к выявлению множества сайтов фосфорилирования субъединиц 20S протеасом и 19S регуляторных комплексов (Claverol et al., 2002; Beausoleil et al., 2004; Rush et al., 2005; Wang et al., 2007). Кроме того, были обнаружены такие модификации компонентов протеасом, как ацетилирование

субъединиц по лизинам (Choudhary et al., 2009) и N-концам (Claverol et al., 2002), гликозилирование (Zachara and Hart, 2004), 4-гидрокси-2-ноненил-алкилирование (Bulteau et al., 2001), миристилирование (Kimura et al., 2003) и окисление серосодержащих аминокислот (Schmidt et al., 2006). Спектр модификаций изменялся при нейродегенеративных заболеваниях (Diaz-Hernandez et al., 2003; Gillardon et al., 2007), закупорке/реперфузии коронарных сосудов у крыс (Bulteau et al., 2001), возрастной атрофии мышц (Husom et al., 2004) и старении сетчатки у человека (Ethen et al., 2007), что может говорить о специфической регуляции функций протеасом с помощью посттрансляционных модификаций. Кроме того, дефосфорилирование $\alpha 3$ и $\alpha 7$ субъединиц протеасом приводило к снижению двух пептидазных активностей протеасом (Mason et al., 1996), что тоже свидетельствует в пользу этой гипотезы.

Кроме перечисленных выше модификаций, субъединицы протеасом также могут подвергаться убиквитинилированию. На сегодняшний день существует только две публикации о наличии на протеасомных субъединицах остатков убиквитина (Denis et al., 2007; Meierhofer et al., 2008). Данные модификации были обнаружены в результате глобального скрининга убиквитинилированных белков, поэтому биологические функции этой модификации совершенно не исследованы. Между тем, убиквитинилирование способно не только направлять белки на расщепление по убиквитин-зависимому механизму (Glickman and Ciechanover, 2002), но и регулировать каталитические активности некоторых белков (Bienko et al., 2010; Yin et al., 2010), а также их внутриклеточную локализацию (Chen et al., 2009) и белок-белковые взаимодействия (Mosesson and Yarden 2006). Соответственно, необходимым представляется тщательное изучение роли убиквитинилирования субъединиц протеасом в регуляции их способности к расщеплению белковых субстратов и других функций в клетке.

ДНК-повреждающий агент доксорубин является противораковым препаратом антрациклиновой группы, широко применяемым при лечении различных онкологических заболеваний. Главным недостатком доксорубина является кардиотоксичность, механизм которой до конца не исследован (Minotti et al., 2004). В связи с этим изучение воздействия доксорубина на клетки представляет большую практическую ценность.

Известно, что под действием доксорубицина происходит активация убиквитин-протеасомной системы расщепления белков на нескольких уровнях (Liu et al., 2008). В частности, повышаются пептидазные активности протеасом. Однако механизм регуляции данных активностей при действии на клетки доксорубицина остаётся неизученным. Исходя из этого, существенный интерес представляет исследование изменения спектра посттрансляционных модификаций субъединиц протеасом при повреждении ДНК доксорубицином и возможной связи этого изменения с регуляцией каталитических активностей протеасом.

Цели и задачи исследования.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния посттрансляционных модификаций на активности протеасом при воздействии на клетки доксорубицина. Исходя из этого, были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ посттрансляционных модификаций субъединиц протеасом до и после индукции генотоксического стресса в клетках K562 доксорубицином.
2. Исследовать влияние генотоксического стресса, вызванного доксорубицином, на пептидазные активности протеасом из ядер и цитоплазмы клеток K562.
3. Исследовать влияние убиквитинилирования *in vitro* на пептидазные активности протеасом.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Субъединицы $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ и $\beta 1$ подвергаются убиквитинилированию в клетках K562.
2. При индукции повреждений ДНК в клетках K562 доксорубицином происходит изменение статусов фосфорилирования и убиквитинилирования субъединиц цитоплазматических протеасом.
3. При генотоксическом стрессе в клетках K562 происходит повышение пептидазных активностей протеасом.
4. Убиквитинилирование *in vitro* способно изменять пептидазные активности протеасом.

Научная новизна полученных результатов.

В настоящей работе впервые показано, что субъединицы $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ и $\beta 1$ подвергаются убиквитинилированию в клетках проэритролейкемии человека линии K562.

Впервые выявлены изменения статусов фосфорилирования и убиквитинилирования цитоплазматических протеасом при индукции генотоксического стресса в клетках K562.

Впервые показано влияние убиквитинилирования субъединиц на пептидазные активности протеасом. Полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы о специфической регуляции активностей протеасом с помощью посттрансляционных модификаций.

Теоретическое и практическое значение работы.

Полученные результаты свидетельствуют об изменении пептидазных активностей и спектра посттрансляционных модификаций протеасом при индукции доксорубицином генотоксического стресса в клетках K562. Кроме того, показано участие убиквитинилирования в регуляции каталитических активностей протеасом, что является важным результатом для дальнейшего исследования регуляции протеолитических активностей протеасом с помощью посттрансляционных модификаций. Данные об изменениях свойств протеасом при индукции повреждений ДНК в раковых клетках с помощью противоракового препарата (доксорубицина) могут использоваться в разработке новых подходов к лечению онкологических заболеваний с применением специфических ингибиторов протеасом и других терапевтических агентов.

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 6 статей в рецензируемых журналах.

Апробация работы.

Материалы диссертации были представлены на Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия 2008» (Казань, 2008), Политехнических симпозиумах «Молодые учёные – промышленности Северо-Западного региона» 2009 и 2010 года (Санкт-Петербург),

Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2009» (Москва, 2009), 13-й и 14-й Международных Пушчинских школах-конференциях молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2009 и 2010), 34-м и 35-м конгрессах Европейского биохимического сообщества (Прага, 2009; Гётеборг, 2010) и 2-й конференции молодых учёных ИНЦ РАН (Санкт-Петербург, 2010).

Финансовая поддержка работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты №08-04-00834 и №10-04-01234) и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на ___ страницах машинописного текста, иллюстративный материал содержит 1 таблицу и __ рисунков.

Материалы и методы исследований.

Клетки проэритролейкемии человека линии K562 (Lozzio, Lozzio, 1975), полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН), культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Для индукции генотоксического стресса в культуральную жидкость добавляли доксорубин (ДР) в концентрации 4 мкМ (Anand et al., 1995) и инкубировали клетки в течение 24 ч.

Выделение протеасом. Ядра и цитозоль выделяли согласно методу, описанному Константиновой и соавторами (1995). 26S протеасомы выделяли из постмитохондриального супернатанта цитозоля клеток или из ядерного экстракта с помощью центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы (15-30%) и ионообменной хроматографии на DE целлюлозе (Hough et al., 1987).

Пептидазную активность протеасом трипсиноподобного типа определяли по степени гидролиза флуорогенного пептида Ac-Arg-Leu-Arg-AMC (BioMol, Великобритания), химотрипсиноподобного типа - по гидролизу N-Succinyl-Lue-Leu-Val-Tyr-AMC (BioMol, Великобритания), а каспазоподобного типа – по

гидролизу Z-Leu-Leu-Glu-AMC. Для этого 0.05 мкмоль субстрата инкубировали с 5 мкг протеасом в течение 45 мин при температуре 37 °С в буферном растворе, содержащем 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 5 мМ MgCl₂, 40 мМ KCl, 1 мМ DTT, 0.5 мМ АТФ. Реакцию останавливали, добавляя равный объем раствора, содержащего 70 мМ уксусной кислоты, 100 мМ хлорацетата натрия и 30 мМ ацетата натрия (Barret, 1980). Концентрацию продукта гидролиза (7-амино-4-метилкумарина) определяли на флуориметре (Туроверов и др., 1998), измеряя экстинкцию и эмиссию при длинах волн 365 и 440 нм соответственно (Barret, 1980).

Двухмерный электрофорез белков. Двухмерный электрофорез (2-ДЭ) белков проводили согласно инструкциям фирмы-готовителя (GE Healthcare, США). Электрофорез во втором направлении проводили в 12%-ном ПААГ в стандартной системе Лэммли (Laemmli, 1970). Белки визуализировали при помощи окрашивания Coomassie.

Концентрацию белка в очищенных препаратах 26S протеасом определяли спектрофотометрически методом Брэдфорд (Bradford, 1976) и уравнивали пробы по количеству белка для дальнейших экспериментов. Вестерн-блоттинг проводили по стандартным методикам. Белки выявляли методом усиленной хемилюминесценции (ECL), согласно инструкции фирмы-изготовителя SuperSignal Elisa Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, США). В качестве специфических антител использовали антитела к субъединицам протеасом $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 1$ (все BioMol, Великобритания). В качестве вторичных антител были использованы кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши (Sigma, США).

Убиквитинилирование *in vitro* проводили с помощью набора для убиквитинилирования согласно инструкциям производителя (BioMol, Великобритания).

Масс-спектрометрия. Пятна, содержащие исследуемые белки, были вырезаны из геля и отмыты от Coomassie. Трипсинолиз белков в геле (Speicher et al., 2000) проводили с помощью автомата Multiprobe II Plus EX (Perkin Elmer, Великобритания). Перед масс-спектрометрией (MS) проводилась жидкостная хроматография (LC) на обратно-фазовой колонке, содержащей среду Acclaim PepMap (Dionex, Великобритания), а затем на обратно-фазовой колонке, содержащей Waters Symmetry C18 100E (Waters, Великобритания). Полученные фракции распылялись

непосредственно в масс-спектрометр 4000 Q-Trap (Applied Biosystems, Великобритания). Спектр ионов, полученный в результате LC-MS/MS, обрабатывали с помощью поисковой программы MASCOT (Perkins et al., 1999) и базы данных UniProtKB/Swiss-Prot (The UniProt Consortium, 2009) с использованием соответствующих параметров. Рассматривались только те белки, для которых было обнаружено 3 и более пептида с $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение.

Работа выполнена на модели генотоксического стресса в клетках проэритролейкемии человека линии K562. Повреждения ДНК вызывались добавлением в культуральную среду доксорубицина - противоопухолевого препарата антрациклинового ряда. Данный агент оказывает на клетки целый ряд воздействий: интеркаляция в ДНК с последующим подавлением репликации, образование свободных радикалов, приводящее к повреждению ДНК и окислению липидов, образование межнитевых сшивок в ДНК и алкилирование нуклеотидов, ингибирование ДНК топоизомеразы II, приводящее к повреждению ДНК, и другие (обзор Gewirtz, 1999). Точный механизм терапевтического действия доксорубицина пока до конца не известен, поэтому изучение регуляции различных клеточных процессов имеет важное прикладное значение, в том числе и для борьбы с побочными эффектами при лечении онкологических заболеваний.

Для сравнения посттрансляционных модификаций субъединиц протеасом до и после индукции генотоксического стресса, изучаемые белки были разделены с помощью двухмерного электрофореза (рис. 1). Пятна, соответствующие субъединицам 20S протеасомы, были вырезаны из геля и проанализированы с помощью масс-спектрометрии.

Исследование показало, что субъединицы $\alpha 5$, $\alpha 6$ и $\alpha 7$ подвергаются фосфорилированию в клетках K562 (табл. 1). Согласно литературным данным, фосфорилирование влияет на присоединение регуляторных комплексов к 20S протеасоме и на её протеолитические активности. В частности, дефосфорилирование субъединицы C8 ($\alpha 7$) при воздействии на клетки гамма-интерферона приводило к снижению концентрации 26S протеасом и повышению количества иммунопротеасом (Bose et al., 2004). Такие данные говорят о возможном участии фосфорилирования в

регуляции спектра расщепляемых белковых субстратов через изменение предпочтительных регуляторных комплексов, ассоциирующихся с протеасомой.

При воздействии доксорубина происходило дефосфорилирование сайта Ser250 субъединицы $\alpha 7$ ядерных протеасом, однако появлялась дополнительная модификация - фосфорилирование одного аминокислотного остатка в N-концевой области. Перенос заряда с C-конца белка на его N-конец может оказывать существенное воздействие на белок-белковые взаимодействия, что свидетельствует как о регуляции присоединения регуляторных комплексов, так и о возможном влиянии на доступ белковых субстратов в протеасому.

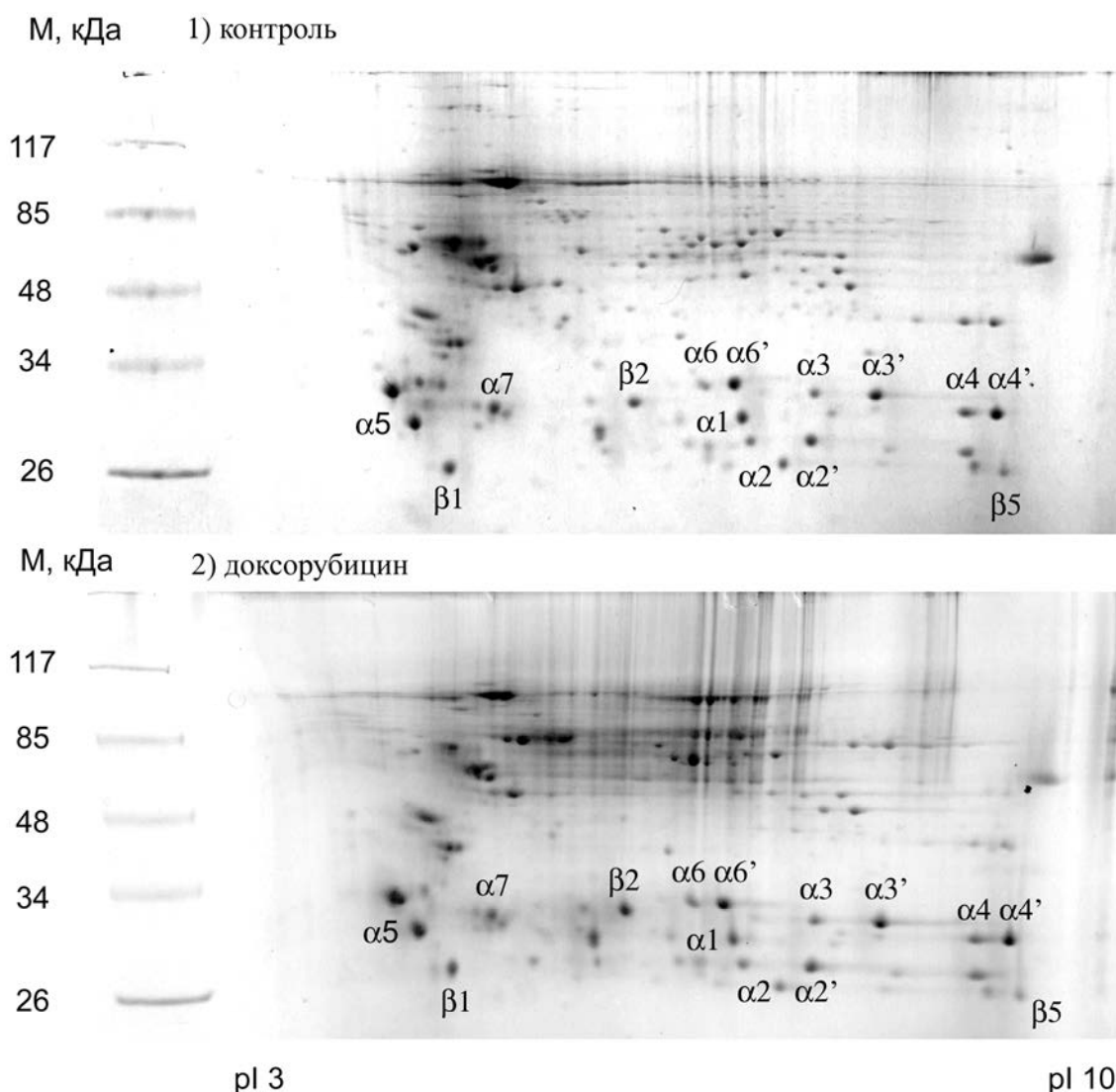


Рис. 1. Двухмерный электрофорез субъединиц протеасом, выделенных из цитоплазмы контрольных клеток (1) и клеток, обработанных доксорубином (2). Подписаны пятна, экстракты из которых были исследованы с помощью масс-спектрометрии.

Субъединица $\alpha 7$, согласно литературным данным (Orlowski and Wilk, 2003), является ключевым элементом в процессе убиквитин-независимого расщепления

протеасомой некоторых белков, поэтому изменение статуса её фосфорилирования также может приводить к изменению спектра субстратов, узнаваемых протеасомой по убиквитин-независимому механизму.

Индукция генотоксического стресса в клетках K562 также приводила к фосфорилированию субъединицы $\alpha 5$ как цитоплазматических, так и ядерных протеасом. Значение данной модификации пока не изучено, однако субъединица $\alpha 5$ известна как одна из двух субъединиц, отвечающих за РНКазную активность протеасом (Petit et al., 1997), поэтому фосфорилирование данного белка может участвовать в регуляции узнавания и расщепления протеасомой РНК-субстратов. Кроме того, согласно литературным данным, субъединица $\alpha 5$ обнаружена в клетке в свободном виде (Jorgensen and Hendil, 1999) и играет ключевую роль в процессе сборки α -кольца при созревании 20S протеасомы совместно с $\alpha 7$ (Hirano et al., 2005), поэтому её фосфорилирование может играть важную роль в создании гетерогенности популяции протеасом в клетке.

Таблица 1. Посттрансляционные модификации субъединиц протеасом, выделенных из цитоплазмы и ядер контрольных и обработанных доксорубицином клеток K562. P – фосфорилирование, Ub – убиквитинилирование. Модификации подчёркнутых аминокислотных остатков выявлены впервые.

Субъединица	ПТМ	Цитоплазма		Ядро	
		контроль	доксорубицин	контроль	доксорубицин
$\alpha 5$	Ub		<u>Lys196, Lys203</u>		
	P		Ser16, Thr55, Ser56, <u>Thr213/219</u>		Thr55, Ser56
$\alpha 6$	Ub	Lys115	<u>Lys30, Lys115, Lys189,</u> Lys208	Lys115	
	P				<u>Tyr6, Thr11</u>
$\alpha 7$	Ub	<u>Lys52</u>			
	P	Ser250	Ser250	Ser250	<u>Фосфорилирован</u> <u>1 из 4 сайтов на</u> <u>участке 2-8</u>
$\beta 1$	Ub	<u>Lys67</u>			

До настоящего момента на субъединице $\alpha 6$ протеасом человека был обнаружен лишь один сайт фосфорилирования – Ser14 (Dephoure et al., 2008). Под действием доксорубицина в ядерных протеасомах происходило присоединение фосфатных

групп к двум другим аминокислотам – Tyr6 и Thr11. Именно N-концевые области α -субъединиц образуют канал, через который происходит доступ белковых субстратов в протеасому (Groll et al., 2000), поэтому фосфорилирование субъединиц $\alpha 5$, $\alpha 6$ и $\alpha 7$ на этих участках может свидетельствовать о специфической регуляции спектра белков, расщепляемых протеасомой с помощью данных посттрансляционных модификаций.

Другой важнейшей посттрансляционной модификацией, которой подвергаются субъединицы протеасом в клетках K562, является убиквитинилирование. Масс-спектрометрическое исследование позволило идентифицировать несколько сайтов убиквитинилирования на субъединицах $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ и $\beta 1$ (табл. 1). Существует сравнительно небольшое количество литературных данных об убиквитинилировании субъединиц протеасом: были обнаружены 2 сайта убиквитинилирования $\alpha 6$ (Meierhofer et al., 2008): Lys115 и Lys208, а также 1 сайт убиквитинилирования на $\alpha 1$ (Denis et al., 2007), однако большая часть масс-спектрометрических исследований протеасомы этих модификаций не выявила. Сложности с обнаружением убиквитинилирования протеасомы могут объясняться тем, что существует несколько деубиквитинилирующих ферментов, взаимодействующих с протеасомой (обзор Koulich et al., 2008), поэтому данная модификация может носить временный обратимый характер.

Согласно литературным данным, белок $\alpha 5$ является ключевым элементом в расщеплении протеасомами РНК (Petit et al., 1997; Kulichkova et al., 2010), а субъединицы $\alpha 7$ и $\beta 1$ – в расщеплении белковых субстратов ($\alpha 7$ в убиквитин-независимом протеолизе (Orlowski et al., 2003), а $\beta 1$ в осуществлении каспазоподобной активности (Tanaka, 2009)), поэтому независимое регулирование данных субъединиц в цитоплазме клеток вполне объяснимо. Однако конкретные функции убиквитинилирования компонентов 20S протеасомы пока остаются неясными.

Для подтверждения присутствия в клетках убиквитинилированных форм субъединиц $\alpha 5$ и $\alpha 7$ был проведён иммуноблоттинг клеточного экстракта, приготовленного из контрольных и обработанных доксорубицином клеток K562 в присутствии ингибитора деубиквитинилирующих ферментов леупептина, с использованием специфических антител к данным субъединицам. Данный

эксперимент показал наличие в клеточном экстракте дополнительных форм субъединиц $\alpha 5$ и $\alpha 7$, отличающихся от канонических по молекулярной массе, причём отличие приблизительно соответствовало молекулярной массе единичного убиквитина (8,5 кДа), что говорит о присутствии в клетках K562 моноубиквитинилированных форм данных субъединиц.

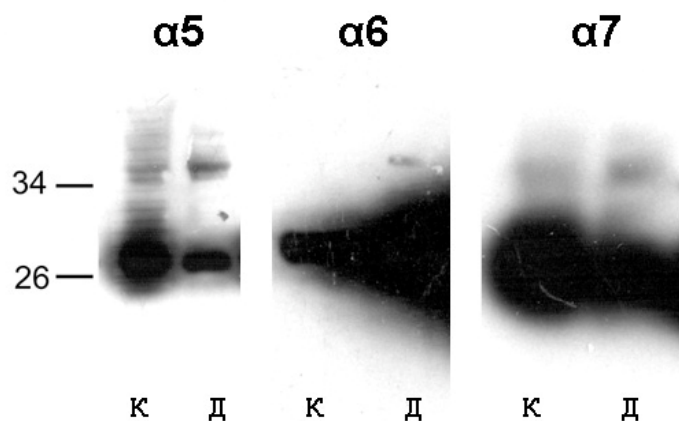


Рис. 2. Иммуноблоттинг клеточного экстракта, приготовленного из контрольных (К) и обработанных доксорубицином (Д) клеток K562 в присутствии ингибитора протеаз леупептина, с использованием антител к субъединицам $\alpha 5$, $\alpha 6$ и $\alpha 7$. PS – протеасомы, выделенные из клеток K562 без использования леупептина.

Кроме того, для субъединицы $\alpha 5$ чётко видно обогащение моноубиквитинилированной изоформой после индукции генотоксического стресса, что соответствует данным, полученным с помощью масс-спектрометрического анализа. Масс-спектрометрия выявила два сайта убиквитинилирования на белке $\alpha 5$ из цитоплазматических протеасом после воздействия доксорубицина, однако данные вестерн-блоттинга говорят о том, что рассматриваемые модификации чаще всего не встречаются на одной и той же молекуле белка, а являются взаимоисключающими. Таким образом, можно говорить о том, что субъединицы $\alpha 5$ и $\alpha 7$ в клетках K562 подвергаются моноубиквитинилированию.

Обнаруженные в настоящей работе посттрансляционные модификации зависели не только от физиологического состояния клетки, но и от внутриклеточной локализации протеасом (табл. 1). Из литературных данных известно, что фосфорилирование субъединицы $\alpha 2$ протеасом крысы играло важную роль в определении ядерной локализации данного белка (Benedict et al., 1996), поэтому мы можем предполагать, что в клетках K562 осуществляется один из двух вариантов регуляции: 1) локализация протеасом определяет спектр киназ и убиквитин-лигаз, модифицирующих их субъединицы; 2) модификация отдельных субъединиц

приводит к изменению внутриклеточной локализации протеасом (импорту в ядро или экспорту в цитоплазму).

Моноубиквитилирование не приводит к направленному расщеплению белков протеасомами, а обычно регулирует каталитические активности, внутриклеточную локализацию или белок-белковые взаимодействия. Исходя из этого, мы предположили, что обнаруженные нами остатки убиквитина могут влиять на способность протеасом к расщеплению белков. Для проверки влияния идентифицированных в данной работе посттрансляционных модификаций на протеолитическую активность протеасомы мы исследовали пептидазные активности протеасом, выделенных из цитоплазмы контрольных и обработанных доксорубицином клеток, с использованием флуорогенных пептидных субстратов (рис. 3).

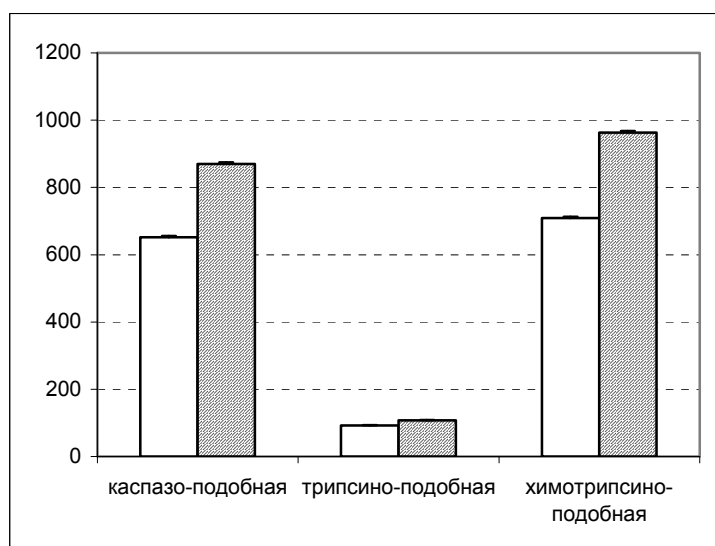


Рис. 3. Сравнение пептидазных активностей протеасом, выделенных из контрольных и обработанных доксорубицином клеток K562 (белые столбики – контроль, штрихованные – доксорубицин)

Как ранее было показано, влияние доксорубицина на протеолитические активности протеасом зависит от его концентрации: концентрация 0.1 — 5 мкМ доксорубицина приводит к активации протеасом, а при 10 мкМ происходит ингибирование протеасом (Liu et al., 2008). В своей работе мы использовали доксорубицин в концентрации 4 мкМ, поэтому наши результаты о стимуляции протеолитической активности протеасом доксорубицином вполне соответствуют литературным данным. Однако остаётся до конца не изученным механизм регуляции протеолитических активностей протеасомы. Среди возможных вариантов – изменение субъединичного состава протеасом, различные посттрансляционные модификации и непосредственное связывание протеасомы с доксорубицином. Мы обнаружили, что при генотоксическом стрессе происходят изменения статуса

фосфорилирования и убиквитинилирования субъединиц протеасом, поэтому не исключено, что именно посттрансляционные модификации играют ключевую роль в регуляции пептидазных активностей протеасом при генотоксическом стрессе. Для проверки данной гипотезы мы исследовали влияние убиквитинилирования протеасом *in vitro* на их способность к расщеплению флуорогенных пептидных субстратов.

Для убиквитинилирования белкового субстрата необходимо последовательное действие нескольких ферментов. На первом этапе E1 (убиквитин-активирующий фермент) переводит убиквитин в активное состояние. Затем убиквитин-конъюгирующий фермент E2, действуя совместно с убиквитин-лигазой E3, распознаёт белковый субстрат и прикрепляет к нему убиквитин. Ферменты E2 и E3 высокоспецифичны для каждого субстрата.

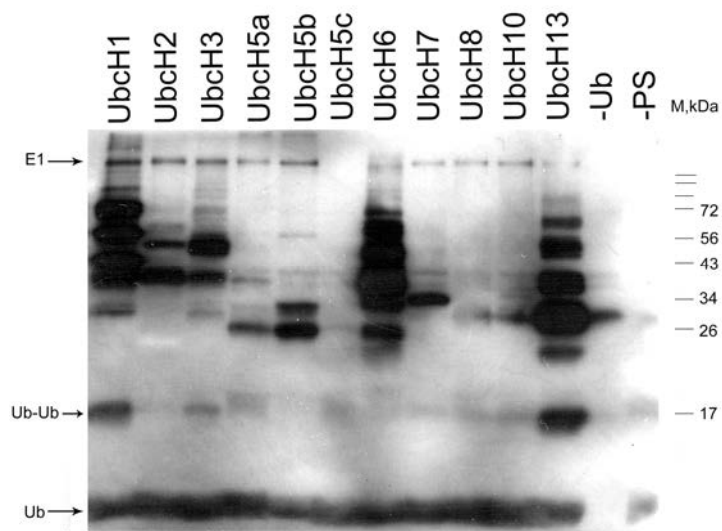


Рис. 4. Убиквитинилирование протеасом с использованием различных ферментов E2. Детектирование убиквитина производилось с помощью стрептавидин-биотиновой системы. На двух крайних правых дорожках – контроля без добавления убиквитина и без добавления протеасом.

В реакции *in vitro* присоединение единичных молекул убиквитина к белкам-мишеням происходит и в отсутствие E3, который оказывается необходимым лишь для образования полиубиквитиновых цепей. Известно 30 различных ферментов E2, различающихся своей специфичностью, которые могут экспрессироваться в клетках человека. Для того, чтобы определить E2 ферменты, специфичные для субъединиц 20S протеасомы, мы провели соответствующий *in vitro* скрининг, используя в качестве субстрата для убиквитинилирования протеасомы, выделенные из клеток K562. Были проверены следующие E2 ферменты: UbcH1, UbcH2, UbcH3, UbcH5a, UbcH5b, UbcH5c, UbcH6, UbcH7, UbcH8, UbcH10, UbcH13. Благодаря использованию биотинилированного рекомбинантного убиквитина, после электрофореза и переноса

на нитроцеллюлозную мембрану, убиквитинилированные белки можно было детектировать с помощью стрептавидин-биотиновой системы (рис. 4). Данный эксперимент показал, что наиболее эффективно убиквитинилирование происходило в присутствии E2-ферментов UbcH1, UbcH2, UbcH3, UbcH5a, UbcH5b, UbcH6, UbcH7 или UbcH13. Аналогичный эксперимент с использованием коммерческого препарата 20S протеасом (BioMol, Великобритания) подтвердил специфичность данных E2 по отношению к компонентам протеасомы.

Из литературных данных известно, что моноубиквитинилирование различных белков играет важную роль в регуляции мембранного транспорта, транскрипции (модификации гистонов) и почкования ретровирусов (Hicke, 2001). Кроме того, оно влияет на каталитические активности некоторых белков (ДНК-полимераза η (Bienko et al., 2010), фосфолипаза D1 (Yin et al., 2010)), что позволяет предположить, что в нашем случае моноубиквитинилирование также участвует в регуляции каталитических активностей протеасомы.

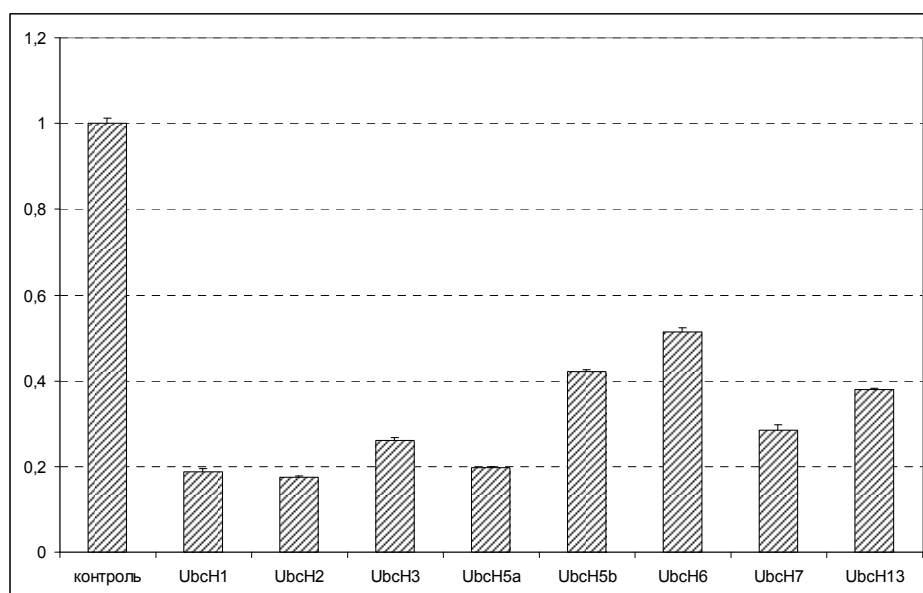


Рис. 5. Влияние убиквитинилирования протеасом при помощи убиквитин-конъюгирующих ферментов UbcH1, UbcH2, UbcH3, UbcH5a, UbcH5b, UbcH6, UbcH7 и UbcH13 на их химотрипсиноподобную активность. За единицу принята активность протеасом из контрольных клеток до убиквитинилирования.

Исходя из вышесказанного, протеасомы, выделенные из клеток K562, были убиквитинилированы *in vitro* в присутствии следующих E2-ферментов: UbcH1, UbcH2, UbcH3, UbcH5a, UbcH5b, UbcH6, UbcH7 и UbcH13. После этого производилось измерение их пептидазных активностей по отношению к флуорогенным пептидным субстратам (рис. 5). Эксперимент показал, что убиквитинилирование с помощью всех проверенных E2-ферментов приводило к снижению химотрипсиноподобной активности протеасом на 50-80%.

Аналогичный эксперимент был проведён с использованием флуорогенного субстрата для исследования каспазоподобной активности протеасом до и после убиквитинилирования их субъединиц *in vitro*. Данные этого эксперимента указывают на то, что все проверенные E2-ферменты вызывают подавление каспазоподобной активности протеасом на 70-85% (рис. 6) за счёт убиквитинилирования.

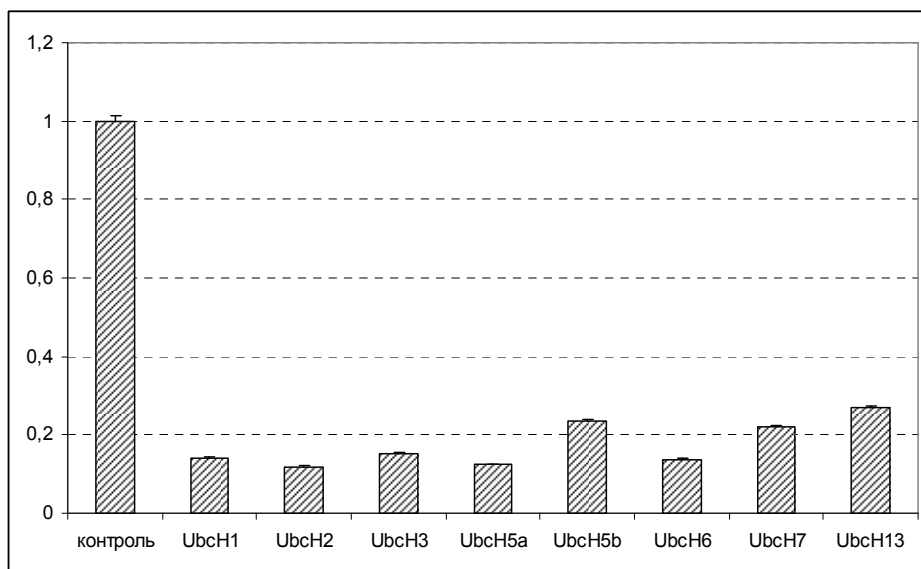


Рис. 6. Влияние убиквитинилирования протеасом при помощи убиквитин-конъюгирующих ферментов UbcH1, UbcH2, UbcH3, UbcH5a, UbcH5b, UbcH6, UbcH7 и UbcH13 на их каспазоподобную активность. За единицу принята активности протеасом из контрольных клеток до убиквитинилирования.

Пептидазные активности протеасом локализованы на трёх субъединицах бета-типа: субъединица $\beta 1$ отвечает за каспазоподобную, $\beta 2$ – за трипсиноподобную, а $\beta 5$ – за химотрипсиноподобную активности. Убиквитинилирование данных субъединиц вполне может изменять их конформацию, влияя на способность протеасом к расщеплению пептидов. Маловероятно, что убиквитин, ковалентно присоединенный к α -субъединицам протеасомы, непосредственно воздействует на сайты пептидазных активностей. Однако присутствие убиквитина на субъединицах $\alpha 5$, $\alpha 6$ и $\alpha 7$ может регулировать доступ субстрата во внутреннюю камеру 20S протеасомы, где и происходит расщепление субстрата, а также влиять на присоединение регуляторных комплексов, что тоже приводит к изменению спектра субстратов, расщепляемых протеасомой.

Суммируя результаты данной работы, можно говорить о том, что субъединицы $\beta 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ и $\alpha 7$ подвергаются убиквитинилированию и фосфорилированию в клетках K562. Более того, при индукции генотоксического стресса в клетках K562 доксорубицином спектр посттрансляционных модификаций данных субъединиц существенно изменяется параллельно активации пептидазных активностей протеасом. Наши результаты также подтверждают гипотезу о регуляции активностей

протеасом с помощью посттрансляционных модификаций, в частности, с помощью присоединения убиквитина: убиквитинилирование протеасом, выделенных из клеток K562 *in vitro*, вызывало понижение их химотрипсиноподобной и каспазоподобной пептидазных активностей. Возникающее на первый взгляд противоречие между увеличением пептидазных активностей после воздействия доксорубицина и подавлением их после убиквитинилирования легко объяснимо. Дело в том, что генотоксический стресс *in vivo* вызывает целый каскад посттрансляционных модификаций протеасом (в частности, фосфорилирование). При этом не все рассматриваемые субъединицы подвергаются убиквитинилированию: белки $\beta 1$ и $\alpha 7$, напротив, теряют остатки убиквитина при воздействии на клетки доксорубицина. Поэтому, несмотря на то, что наши эксперименты подтверждают гипотезу об участии убиквитинилирования в регуляции активностей протеасом, они могут не вполне адекватно отражать ситуацию *in vivo*. Тем не менее, результаты данного исследования дают начало изучению влияния убиквитинилирования на свойства протеасомных субъединиц и в дальнейшем будут вписаны в общую картину регуляции активности протеасом за счет посттрансляционных модификаций.

Выводы:

1. Субъединицы $\alpha 5$, $\alpha 6$ и $\alpha 7$ подвергаются фосфорилированию и убиквитинилированию в клетках K562, а субъединица $\beta 1$ убиквитинилируется. Спектр фосфорилирования и убиквитинилирования субъединиц протеасом различается в ядре и цитоплазме.
2. При индукции генотоксического стресса в клетках K562 доксорубицином спектр фосфорилирования и убиквитинилирования субъединиц 20S протеасом существенно изменяется.
3. Индукция генотоксического стресса в клетках K562 приводит к активации химотрипсиноподобной и каспазоподобной активностей протеасом.
4. Убиквитинилирование протеасом *in vitro* приводит к подавлению химотрипсиноподобной и каспазоподобной активностей протеасом.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Цимоха А.С., Куличкова В.А., Евтеева И.Н., Ватажок Ю.Я., **Моисеева Т.Н.**, Ермолаева Ю.Б., Вашукова Е.С., Гаузе Л.Н., Константинова И.М. Специфичность изменений в протеасомах клеток K562 при апоптозе, индуцированном диэтилмалеатом // Цитология. 2006. 48 (2): 133-141.
2. Миттенберг А.Г., **Моисеева Т.Н.**, Пугачева И.В., Куличкова В.А., Цимоха А.С., Гаузе Л.Н., Константинова И.М. Регуляция специфичности эндорибонуклеазной активности протеасом при действии индукторов дифференцировки и апоптоза на клетки линии K562. // Цитология. 2007. 49(2):142-148.
3. Tsimokha A.S., Mittenberg A.G., Kulichkova V.A., Vashukova E.S., Vatajok Yu.Ya., **Moiseeva T.N.**, Evteeva I.N., Ermolaeva Yu.B., Gause L.N., Konstantinova I.M. Reprogramming of nuclear proteasome undergoing apoptosis in K562 cells. I. Effect of glutathione-depleting agent diethylmaleate // Cell and Tissue Biology. 2007. 1(4):334-342.
4. Mittenberg A.G., **Moiseeva T.N.**, Barlev N.A. The role of proteasomes in transcription and their regulation by post-translational modifications // Frontiers in Bioscience. 2008. 13:7184-7192.
5. **Моисеева Т.Н.**, Семёнова Н.Ю., Кучина П.В., Миттенберг А.Г. Эндорибонуклеазная активность субъединиц протеасом и её регуляция с помощью посттрансляционных модификаций // Биология: традиции и инновации в XXI веке. 2008. с.67-69.
6. **Моисеева Т.Н.** Определение альфа-субъединиц, обладающих эндорибонуклеазными активностями, и исследование их изменений при воздействии на клетки доксорубицина // Материалы конференций Политехнического симпозиума. 2009. с.183-184.
7. **Моисеева Т.Н.** Эндорибонуклеазные активности альфа-субъединиц протеасом и их изменения при воздействии на клетки доксорубицина // Ломоносов – 2009: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных; Секция «Биология». 2009. Сборник тезисов, с.190-191.
8. **Moiseeva T.N.** Fedorova O.A., Mittenberg A.G., Barlev N.A. Novel RNase activities of proteasome alpha-type subunits are found to be affected by apoptosis induction // FEBS J. 2009. Vol.276 supp.1, p.212-213.
9. **Моисеева Т.Н.**, Фёдорова О.А., Миттенберг А.Г., Барлев Н.А. Протеасомные субъединицы альфа-типа обладают регулируемой эндорибонуклеазной активностью // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА. 13-я Пущинская международная школа-конференция молодых учёных. 2009. Сборник тезисов, с.30.
10. **Моисеева Т.Н.**, Миттенберг А.Г., Барлев Н.А. Протеасомы и их роль в регуляции транскрипции // Цитология. 2010.52(3):195-203.
11. Kulichkova V.A., Fedorova O.A., Tsimokha A.S., **Moiseeva T.N.**, Bottril A., Lezina L., Gause L.N., Konstantinova I.M., Mittenberg A.G. and Barlev N.A. 26S proteasome exhibits endoribonuclease activity controlled by extra-cellular stimuli // Cell Cycle. 2010. 9(4): 840 - 849.
12. **Моисеева Т.Н.**, Миттенберг А.Г., Барлев Н.А. Влияние индукции повреждений ДНК в клетках K562 доксорубицином на свойства и РНКазные активности альфа-субъединиц протеасом // Цитология 2010. 52 (6):500-501
13. **Моисеева Т.Н.**, Миттенберг А.Г., Барлев Н.А. Индукция повреждений ДНК в клетках K562 вызывает изменение свойств и активностей альфа-субъединиц протеасом // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА. 14-я Пущинская международная школа-конференция молодых учёных. 2010. Сборник тезисов, т.2, с.159.
14. **Моисеева Т.Н.** Влияние индукции повреждений ДНК в клетках K562 на посттрансляционные модификации и каталитические активности протеасом // Материалы конференций Политехнического симпозиума 20 мая 2010 г. 2010. с.196-197.
15. **Moiseeva T.N.**, Fedorova O.A., Mittenberg A.G., Barlev N.A. DNA-damage induction affects RNase activities and posttranslational modifications of proteasome alpha-type subunits // FEBS J. 2010. Vol.277 supp.1, p.291.

Список цитируемой литературы

1. **Туроверов К.К.**, Бикташев А.Г. Дорофеев А.В. и Кузнецова И.М. Комплекс аппаратных и программных средств для измерения спектральных, поляризационных и кинетических характеристик флуоресценции в растворе // *Цитология*. 40:806-817.
2. **Anand S.**, Verma H., Kumar L., Singh N. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia lymphocytes by hydroxyurea and adriamycin // *Cancer Lett*. 1995. 88(1):101-105.
3. **Barrett A.J.** Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates// *Biochem J*. 1980. 187(3): 909-912.
4. **Beausoleil S.A.**, Jedrychowski M., Schwartz D., Elias J.E., Villen J., Li J., Cohn M.A., Cantley L.C., Gygi S.P. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. 101(33):12130-12135.
5. **Benedict C.M.**, Clawson G.A. Nuclear multicatalytic proteinase subunit RRC3 is important for growth regulation in hepatocytes // *Biochemistry*. 1996. 35(36):11612-11621.
6. **Bienko M.**, Green C.M., Sabbioneda S., Crosetto N., Matic I., Hibbert R.G., Begovic T., Niimi A., Mann M., Lehmann A.R., Dikic I. Regulation of translesion synthesis DNA polymerase eta by monoubiquitination // *Mol Cell*. 2010. 37(3):396-407.
7. **Bose S.**, Stratford F.L., Broadfoot K.I., Mason G.G., Rivett A.J. Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon // *Biochem J*. 2004. 378:177-184.
8. **Bradford M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem*. 1976. 72:248-254.
9. **Bulteau A.L.**, Lundberg K.C., Humphries K.M., Sadek H.A., Szweda P.A., Friguet B., Szweda L.I. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion // *J Biol Chem*. 2001. 276(32):30057-30063.
10. **Chen B.B.**, Mallampalli R.K. Masking of a nuclear signal motif by monoubiquitination leads to mislocalization and degradation of the regulatory enzyme cytidylyltransferase// *Mol Cell Biol*. 2009. 29(11):3062-3075.
11. **Choudhary C.**, Kumar C., Gnad F., Nielsen M.L., Rehman M., Walther T.C., Olsen J.V., Mann M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions // *Science*. 2009. 325(5942):834-840.
12. **Claverol S.**, Burlet-Schiltz O., Girbal-Neuhauser E., Gairin J.E., Monsarrat B. Mapping and structural dissection of human 20 S proteasome using proteomic approaches // *Mol Cell Proteomics*. 2002. 1(8):567-578.
13. **Denis N.J.**, Vasilescu J., Lambert J.-P., Smith J.C., Figeys D. Tryptic digestion of ubiquitin standards reveals an improved strategy for identifying ubiquitinated proteins by mass spectrometry // *Proteomics*. 2007. 7:868-874.
14. **Dephoure N.**, Zhou C., Villén J., Beausoleil S.A., Bakalarski C.E., Elledge S.J., Gygi S.P. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. 105(31):10762-10767.
15. **Diaz-Hernandez M.**, Hernandez F., Martin-Aparicio E., Gomez-Ramos P., Moran M.A., Castano J.G., Ferrer I., Avila J., Lucas J.J. Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease // *J Neurosci*. 2003. 23(37):11653-11661.
16. **Ethen C.M.**, Hussong S.A, Reilly C., Feng X., Olsen T.W., Ferrington D.A. Transformation of the proteasome with age-related macular degeneration // *FEBS Lett*. 2007. 581(5):885-890.
17. **Gewirtz D.A.** A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin // *Biochem Pharmacol*. 1999. 57(7):727-741.
18. **Gillardon F.**, Kloss A., Berg M., Neumann M., Mechtler K., Hengerer B., Dahlmann B. The 20S proteasome isolated from Alzheimer's disease brain shows post-translational modifications but unchanged proteolytic activity // *J Neurochem*. 2007. 101(6):1483-1490.

19. **Glickman M.H., Ciechanover A.** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction // *Physiol Rev.* 2002. 82(2):373-428.
20. **Groll M., Bajorek M., Kohler A., Moroder L., Rubin D., Huber R., Glickman M., Finley D.** A gated channel into the proteasome core particle // *Nat Struct Biol.* 2000. 7:1062-1067.
21. **Hicke L.** Protein regulation by monoubiquitin // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001. 2(3):195-201.
22. **Hirano Y., Hendil K.B., Yashiroda H., Iemura S., Nagane R., Hioki Y., Natsume T., Tanaka K., Murata S.** A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes // *Nature.* 2005. 437(7063):1381-1385.
23. **Hough R., Pratt G., Rechsteiner M.** Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate // *J Biol Chem.* 1987. 262(17):8303-8313.
24. **Husom A.D., Peters E.A., Kolling E.A., Fugere N.A., Thompson L.V., Ferrington D.A.** Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle // *Arch Biochem Biophys.* 2004. 421(1):67-76.
25. **Jørgensen L., Hendil K.B.** Proteasome subunit zeta, a putative ribonuclease, is also found as a free monomer // *Mol Biol Rep.* 1999. 26(1-2):119-123.
26. **Kimura Y., Saeki Y., Yokosawa H., Polevoda B., Sherman F., Hirano H.** N-Terminal modifications of the 19S regulatory particle subunits of the yeast proteasome // *Arch Biochem Biophys.* 2003. 409(2):341-348.
27. **Koulich E., Li X., DeMartino G.N.** Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome // *Mol Biol Cell.* 2008. 19(3):1072-1082.
28. **Kulichkova V.A., Fedorova O.A., Tsimokha A.S., Moiseeva T.N., Bottril A., Lezina L., Gauze L.N., Konstantinova I.M., Mittenberg A.G. and Barlev N.A.** 26S proteasome exhibits endoribonuclease activity controlled by extra-cellular stimuli // *Cell Cycle.* 2010. 9(4): 840 - 849.
29. **Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. 227: 680-685.
30. **Liu J., Zheng H., Tang M., Ryu Y.C., Wang X.** A therapeutic dose of doxorubicin activates ubiquitin-proteasome system-mediated proteolysis by acting on both the ubiquitination apparatus and proteasome // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008. 295(6):H2541- H2550.
31. **Lozzio C.B., and Lozzio B.B.** Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome // *Blood (45):* 321-334.
32. **Mason G.G., Hendil K.B., Rivett A.J.** Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Identification of two phosphorylated subunits and the effect of phosphorylation on activity // *Eur. J. Biochem.* 238: 453-462.
33. **Meierhofer D., Wang X., Huang L., Kaiser P.** Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry // *J. Proteome Res.* 2008. 7:4566-4576.
34. **Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.** Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity // *Pharmacol Rev.* 2004. 56(2):185-229.
35. **Moore B.S., Eustáquio A.S., McGlinchey R.P.** Advances in and applications of proteasome inhibitors // *Curr Opin Chem Biol.* 2008. 12(4):434-440.
36. **Mosesson Y., Yarden Y.** Monoubiquitylation: a recurrent theme in membrane protein transport // *Isr Med Assoc J.* 2006. 8(4):233-237.
37. **Murata S., Takahama Y., Tanaka K.** Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides // *Curr Opin Immunol.* 2008. 20(2):192-196.
38. **Orlowski M., Wilk S.** Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome // *Arch Biochem Biophys* 2003. 415(1):1-5.
39. **Perkins D.N., Pappin D.J.C., Creasy D.M., Cottrell J.S.** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data // *Electrophoresis.* 1999. 20:3551-3567.

40. **Petit F.**, Jarrousse A.-S., Dahlmann B., Sobek A., Hendil K.B., Buri J., Briand Y., Schmid H.-P. Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation // *Biochem J.* 1997. 326:93-98.
41. **Rush J.**, Moritz A., Lee K.A., Guo A., Goss V.L., Spek E.J., Zhang H., Zha X.M., Polakiewicz R.D., Comb M.J. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells // *Nat Biotechnol.* 2005. 23(1):94-101.
42. **Schmidt F.**, Dahlmann B., Janek K., Kloss A., Wacker M, Ackermann R., Thiede B., Jungblut P.R. Comprehensive quantitative proteome analysis of 20S proteasome subtypes from rat liver by isotope coded affinity tag and 2-D gel-based approaches // *Proteomics.* 2006. 6(16):4622-4632.
43. **Speicher K.D.**, Kolbas O., Harper S., Speicher D.W. Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestions for protein identifications in proteome studies // *Journal of Biomolecular Techniques.* 2000. 11:74-86.
44. **Tanaka K.** The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009. 85(1):12-36.
45. **Tanaka K., Kasahara M.** The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28 // *Immunol Rev.* 1998. 163:161-176.
46. **The Uniprot Consortium.** The Universal Protein Resource (UniProt) // *Nucl Acids Res.* 2009. 37:169-174.
47. **Wang X.**, Chen C.F., Baker P.R., Chen P.L., Kaiser P., Huang L. Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex // *Biochemistry.* 2007. 46(11):3553-3565.
48. **Yin H.**, Gui Y., Du G., Frohman M.A., Zheng X.L. Dependence of phospholipase D1 multi-monoubiquitination on its enzymatic activity and palmitoylation // *J. Biol. Chem.* 2010. 285(18):13580-13588.
49. **Zachara N.E.**, Hart G.W. O-GlcNAc modification: a nutritional sensor that modulates proteasome function // *Trends Cell Biol.* 2004. 14(5):218-221.