

Санкт-Петербургский государственный университет
Биологический факультет
Кафедра генетики и биотехнологии

Дьяконов Егор Егорович

Роль посттрансляционных модификаций белков протеасомы в ее транспорте во
внутриклеточное пространство

Выпускная квалификационная работа магистра
(магистерская диссертация)

Работа выполнена в лаборатории
Молекулярной биологии стволовых клеток
Института цитологии РАН
(зав. лаб., член-корр. РАН, д.б.н. Томилин А.Н.)

Научный руководитель:
с.н.с., к.б.н. Голубкова Е.В.

Куратор:
с.н.с., к.б.н. Цимоха А.С.

Санкт-Петербург, 2018

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

МС – масс-спектрометрия

МС/МС – тандемная масс-спектрометрия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ECL – электрохемилюминесценция

FBS - эмбриональная бычья сыворотка

FT/ICR МС - масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием

MALDI - матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

PAGE – полиакриламидный гель-электрофорез

PBS – фосфатно-солевой буфер

PBSt – фосфатно-солевой буфер с 0.1% Tween-20

pI – изоэлектрическая точка

PVDF – поливинилиденфторид

TFA - трифторуксусная кислота

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. Структура протеасомы.....	6
1.2. Убиквитин-зависимый протеолиз	8
1.3. Внеклеточные протеасомы	10
1.4. Посттрансляционные модификации протеасомы	11
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	16
2.1. Клеточные линии и культивирование клеток	16
2.2. Аффинная очистка протеасом	16
2.3. Измерение пептидазной активности протеасом	17
2.4. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн-блот анализ	17
2.5. Двумерный электрофорез	18
2.6. Масс-спектрометрический анализ.....	19
2.7. Ферментативные реакции и амплификация фрагментов ДНК методом ПЦР	19
2.8. Сайт-направленный мутагенез	20
2.9. Трансформация	21
2.10. Выделение плазмидной ДНК.....	22
2.11. Получение вирусных частиц.....	22
2.12. Получение нокаут конструкций и нокаут по гену <i>PSMB3</i>	23
2.13. Получение доксициклин-регулируемой клеточной линии.....	24
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	25
3.1. Аффинное очищение протеасом.....	25
3.2. МС/МС-анализ посттрансляционных модификаций клеточных протеасом	28
3.3. МС-анализ посттрансляционных модификаций протеасом.....	30
3.4. Нокаут гена протеасомы <i>PSMB3</i>	33
3.5. Получение доксициклин-регулируемой клеточной линии K562	36
4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	39
ВЫВОДЫ	44
БЛАГОДАРНОСТИ	45
ЛИТЕРАТУРА	46
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	57
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	58
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	60

ВВЕДЕНИЕ

Протеасома является крупным мультисубъединичным белковым комплексом, осуществляющим убиквитин-зависимую деградацию белков в клетках эукариот (Maupin-Furlow et al., 2006). Исследования последних лет обнаружили присутствие протеасом также и во внеклеточном пространстве: в плазме крови, спинномозговой жидкости, альвеолярном секрете, в кондиционированной культурами клеток питательной среде (Wada et al., 1993, Roth et al., 2005, Egerer et al., 2002). Роль протеасом во внеклеточном пространстве неизвестна, однако, замечена прямая зависимость между количеством внеклеточных протеасом в плазме крови и тяжестью онкологических заболеваний пациентов (Wada et al., 1993). Аналогичная связь выявлена у пациентов, страдающих заболеваниями печени (цирроз, острый или хронический гепатит, жировая дистрофия) (Wada et al., 1993), а также аутоиммунными заболеваниями (аутоиммунный миозит, системная красная волчанка, синдром Шегрена, ревматоидный артрит и аутоиммунный гепатит) (Egerer et al., 2002). Данное наблюдение открывает перспективы в диагностике патогенных процессов в организме, что подстегивает исследования, направленные на определение количества протеасом в плазме крови пациентов при различных заболеваниях. Кроме того, было замечено, что после проведения стандартной или усиленной химиотерапии уровень протеасом в плазме крови тех пациентов, лечение для которых было успешным, достоверно снижался; такого эффекта не наблюдалось у неподдающихся химиотерапии больных (Wada et al., 1993, Stoebner et al., 2005). Взаимозависимость между стадией онкологического заболевания и концентрацией внеклеточных протеасом была также обнаружена у пациентов с метастазирующей злокачественной меланомой (Stoebner et al., 2005). Значимо повышенные концентрации внеклеточных протеасом также наблюдались у пациентов с различными солидными опухолями (Lavabre-Bertrand et al., 2001, Dutaud et al., 2002). Таким образом, это позволяет рассматривать внеклеточные протеасомы как возможный прогностический параметр в исходе заболеваний. Нельзя, однако, не отметить тот факт, что, в других исследованиях показано, что наибольший рост концентрации внеклеточных протеасом в плазме крови происходит при значительном прогрессировании онкологического заболевания (Lavabre-Bertrand et al., 2001). Кроме того, у пациентов, больных некоторыми формами лимфомы или лимфоцитарным лейкозом, напротив, наблюдалось пониженное количество внеклеточных протеасом по сравнению со здоровыми донорами (Lavabre-Bertrand et al., 2001).

Несмотря на большое количество данных, касающихся исследованию концентрации и активности внеклеточных протеасом у пациентов, страдающих тем или иным заболеванием, свойства секретируемых клетками протеасом или механизм их секреции на сегодняшний день не исследованы, что отдаляет перспективу использования внеклеточных протеасом в качестве маркеров онкологических и других заболеваний. Чтобы приблизиться к пониманию роли протеасом во внеклеточном пространстве, необходимо определить специфические особенности, в том числе посттрансляционные модификации белков внеклеточных протеасом в сравнении с внутриклеточными комплексами, и ответить на вопрос, какие механизмы задействованы в их транспорте во внеклеточное пространство.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ

Цель работы: поиск специфических для внеклеточных протеасом посттрансляционных модификаций

Задачи:

1. Получить с помощью масс-спектрометрического анализа списки посттрансляционных модификаций протеасом, аффинно-очищенных из клеток K562 и кондиционированной клетками среды.
2. Сравнить посттрансляционные модификации клеточных и внеклеточных протеасом и выявить специфические для внеклеточной популяции протеасом модификации.
3. В линии клеток человека провести нокаут эндогенной субъединицы протеасом методом CRISPR/Cas9.
4. Получить с помощью tTR-KRAB системы линии клеток HeLa и K562, стабильно синтезирующие слитую с последовательностью T7 на N-конце субъединицу протеасом дикого типа и с точечной аминокислотной заменой в сайте посттрансляционной модификации, специфической для внеклеточных протеасом.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структура протеасомы

Протеасома является крупным мультисубъединичным белковым комплексом, осуществляющим убиквитин-зависимую деградацию белков в клетках эукариот. Термин «протеасома» употребляется как в отношении 26S-протеасомы с одной или двумя 19S-регуляторными частицами, которая деградирует помеченные полиубиквитиновой цепочкой белки, так и в отношении 20S-протеасомы (коровой частицы), являющейся каталитическим ядром 26S-комплекса (Maurin-Furlow et al., 2006, Budenholzer et al., 2017). Иногда для 20S-коровой частицы с двумя присоединенными 19S-комплексами используют термин «30S-протеасома» (Tanaka, 2009). 26S-протеасома – АТФ-зависимый протеолитический комплекс, обладающий молекулярной массой около 2,5 МДа (Dahlmann, 2005). 26S-протеасома состоит из двух основных субкомплексов: 20S-коровой частицы и различных регуляторных комплексов, в том числе 19S-частицы, которые могут располагаться на одной или обоих концах коровой частицы (Рис. 1А) (Voges et al., 1999).

В состав 20S-коровой частицы входят 14 пар субъединиц с массой от 25 до 35 кДа, которые вместе образуют комплекс с массой около 750 кДа (Lowe et al., 1995). 20S-протеасома по данным рентгеноструктурного анализа обладает цилиндрической структурой длиной 15-17 нм и диаметром 11-12 нм и состоит из дублированных семи α -субъединиц и семи β -субъединиц, которые образуют стопку из четырех гетерогептамерных колец (Groll et al., 1997). Два внешних кольца состоят из семи гомологичных α -субъединиц, а два внутренних - из семи подобных консервативных β -субъединиц (Рис. 1А).

Субстратные пептидные связи гидролизуются N-терминальным остатком треонина Thr1, который присутствует в β -субъединицах (Seemuller et al., 1995). Интересно отметить, что в то время как у более простых организмов протеолитически активными являются все 7 β -субъединиц, у высших эукариот деградация субстрата более специфична (Soux et al., 1996) и каталитические центры имеются только у трех из семи типов β -субъединиц (Groll et al., 1997). Таким образом, взаимодействие между неактивными и активными β -субъединицами образует уникальные каналы для связывания субстрата, порождающих три отдельных активных сайта, располагающихся на β 1, β 2 и β 5-субъединицах. Эти субъединицы обладают каспаза- трипсин- и химотрипсин-подобными активностями соответственно (Groll et al., 2005).

Помимо конститутивной 20S-протеасомы, у млекопитающих наблюдается наличие иммунопротеасомы, сборка которой инициируется под воздействием γ -интерферона (Groettrup et al., 2001). При этом конститутивные каталитические субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ замещаются на индуцибельные (βi) (Raynes et al., 2016).

Структурная организация 20S-протеасомы налагает ограничения на прохождение субстрата в протеолитическую камеру и выход деградированного продукта (Groll et al., 1997, Unno et al., 2002). У протеасом архей два входных отверстия диаметром около 13 Å локализованы в центре α -колец с двух концов коровой частицы (Lowe et al., 1995, Groll et al., 2003). Напротив, у эукариот 20S-протеасомы плотно закрыты, так как N-концы α -субъединиц закрывают входное отверстие. Открытие и закрытие канала регулируют размер пептидов, образовавшихся в результате протеолиза. При этом длина пептидов составляет менее 8 аминокислот, которые затем разрушаются клеточными пептидазами (Glickman, Ciechanover, 2002). Таким образом, доступ во внутреннюю полость протеасомы требует структурных преобразований всего комплекса. Присоединение 19S-регуляторной частицы запускает структурные перестановки N-концов α -субъединиц (Kohler et al., 2001), которые ведут к открытию ворот коровой частицы и образованию узкого ограниченного канала в α -кольце диаметром около 13 Å. Такой диаметр гарантирует, что деградация белка будет иметь место только в случае разворачивания субстрата, которую осуществляет 19S-регуляторная частица.

19S-регуляторная частица (PA700 комплекс) состоит, по крайней мере, из 19 различных субъединиц и имеет молекулярную массу около 900 кДа (Glickman et al., 1998). 19S-частица осуществляет распознавание и разворачивание полиубиквитинированных субстратов, отщепление мономеров убиквитина, а также регулирует вхождение субстрата внутрь коровой 20S-частицы (Glickman, Ciechanover, 2002). Биохимические и структурные исследования показали, что 19S-частица состоит из двух основных структур: основания и крышки (Рис. 1А) (Glickman et al., 1998). Основание состоит из шести различных гомологичных АТФ-аз (regulatory particle triple A proteins Rpt1-6) AAA-семейства, образующих гексамерное кольцо, двух адапторных белков (Rpn1, Rpn2) вместе с двумя рецепторами убиквитина (Rpn10, Rpn13) (Glickman et al., 1998). Было обнаружено, что субъединицы Rpn1 и Sem1 также способны узнавать полиубиквитинированные белки (Shi et al., 2016). Крышка 19S-регулятора состоит из шести протеасом-COP9/сигналом-eIF3 (PCI)-содержащих субъединиц (Rpn3, 5, 6, 7, 9 и 12), двух Mpr1-Pad1-N-терминальных (MPN) субъединиц (Rpn8 и Rpn11) и небольшого адгезивного белка Sem1. Среди всех субъединиц крышки только Rpn11 обладает каталитической способностью, являясь Zn^{2+} -зависимым деубиквитинирующим ферментом (Verma et al., 2002, Yao, Cohen, 2002).

Именно крышка способна узнавать полиубиквитиновые цепи, поскольку протеолиз убиквитинированных белков осуществляется протеасомой только в присутствии «крышки» (Glickman et al., 1998).

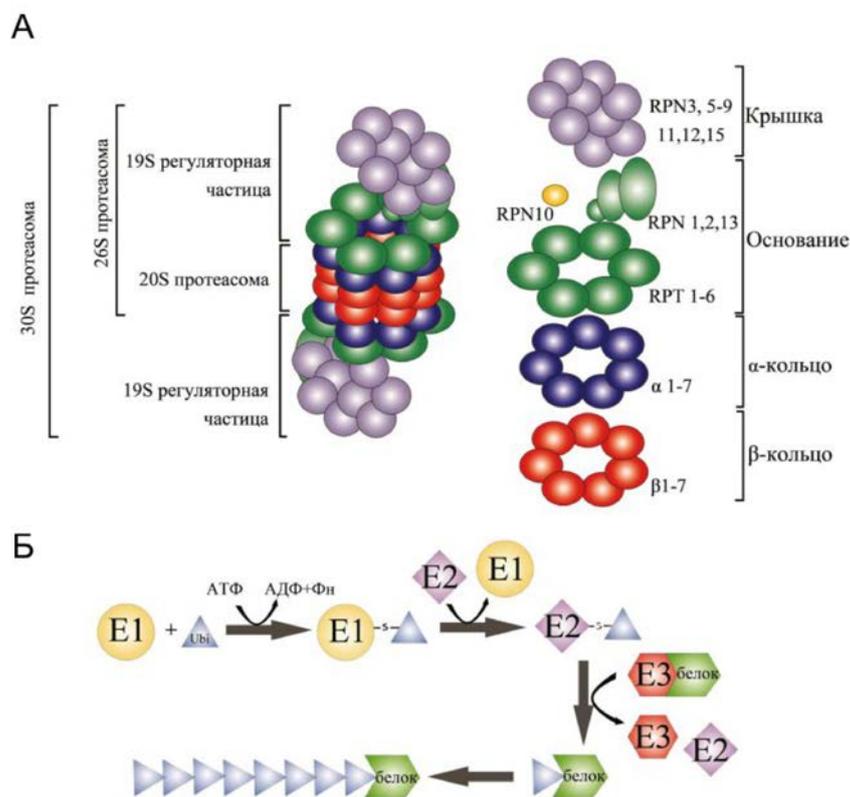


Рисунок 1 – Убиквитин-протеасомная система.

А - структура 26S-протеасомы. Б - ковалентное присоединение убиквитина АТФ-зависимым каскадом убиквитин-активирующих ферментов (E1), убиквитин-конъюгирующих ферментов (E2) и убиквитин-лигаз (E3)
(Селенина и др., 2017)

1.2. Убиквитин-зависимый протеолиз

Процесс деградации белка убиквитин-протеасомным комплексом можно разделить на два основных этапа – ковалентное присоединение к субстрату полиубиквитиновой цепочки (Рис. 1Б) и деградацию помеченного таким образом белка 26S-протеасомой. Присоединение убиквитина является многоступенчатым процессом, который начинается, когда убиквитин образует тиоэфирную связь с убиквитин-активирующим ферментом (E1). Активированный убиквитин затем переносится на цистеин активного сайта убиквитин-конъюгирующего фермента (E2), который при взаимодействии с убиквитин-лигазой (E3) присоединяет С-терминальный остаток глицина убиквитина к остатку лизина белка-мишени. Обычно к белку присоединяется несколько молекул убиквитина, каждый последующий присоединяется к лизину предыдущей молекулы убиквитина. Мишенью

для 26-протеасомы являются белки с полиубиквитиновыми цепочками, образованные связью через остаток лизина-48 (Saeki, 2017). Так, например, присоединение полиубиквитиновой цепочки к белку через лизин-63 не вызывает его деградацию протеасомами (Nandi et al., 2006). Перед попаданием субстрата в протеолитическую полость протеасомы, с него должны быть удалены молекулы убиквитина при участии деубиквитирующих ферментов (DUB) (Schmidt et al., 2005, Grice, Nathan, 2016). В крышке 19S-регуляторной части деубиквитирующим ферментом является субъединица Rpn11 (Verma et al., 2002, Yao, Cohen, 2002).

Важно отметить, что в качестве сигналов для деградации белка протеасомами могут выступать небольшие аминокислотные последовательности внутри белковой молекулы, богатые Ser, Pro, Thr, Glu, Asp, называемые PEST-последовательностями (Rechsteiner, Rogers, 1996) и специальные сайты деструкции (destruction box), состоящие из 9 аминокислот (Kile et al., 2002, Zhou, 2005). Деградиционные сигналы (или дегроны) обычно наблюдаются у белков с коротким временем полужизни (факторы регуляции транскрипции, онкобелки, супрессоры опухолей и белки, участвующие в регуляции клеточного цикла), частично разрушенных белков или у белков с нарушенной третичной структурой. Протеолиз белка протеасомами в этом случае осуществляется убиквитин-независимо (Бунеева, Медведев, 2018).

Внутриклеточная убиквитин-зависимая деградация белков точно регулируется, поддерживая нормальный клеточный цикл и выживание клетки. Таким образом, нарушения в этой системе могут приводить к различным заболеваниям, включая онкологические (Adams, 2004). Учитывая центральную роль убиквитин- и протеасома-зависимого протеолиза в клетке, компоненты этой системы стали привлекательной терапевтической мишенью для лечения рака и других заболеваний. Так, протеасомный ингибитор Velcade (бортезомиб, PS-341) был одобрен федеральным управлением США по контролю за лекарствами (FDA) и использовался для лечения рецидивирующей и рефрактерной миеломной болезни (Kubiczkova et al., 2014). Тем не менее, точный механизм того, как протеасомные ингибиторы, такие как Velcade, способствуют лечению рака остается неясным, учитывая, что блокировка убиквитин-зависимого протеолиза затрагивает многие клеточные процессы всех клеток организма. Было замечено, что посттрансляционные модификации протеасомы регулируют сборку и функции протеасомы (Mason et al., 1998, Rivett et al., 2001, Zhang et al., 2003, Sumegi et al., 2003, Kimura et al., 2000), поэтому для полного понимания функции протеасом и механизмов ее регуляции так важно исследовать структуру комплекса и посттрансляционные модификации его белков.

1.3. Внеклеточные протеасомы

Впервые внеклеточные 20S-протеасомы были обнаружены в плазме крови человека с помощью метода иммуноферментного анализа и были описаны как «циркулирующие протеасомы (ц-протеасомы)» или «плазматические протеасомы (п-протеасомы)» (Wada et al., 1993). Позже с помощью электронной микроскопии и масс-спектрометрии было показано, что очищенные ц-протеасомы представляют собой интактные 20S-комплексы без регуляторных 19S-частиц с сохраненными пептидазными активностями (Zoeger et al., 2006, Tsimokha et al., 2017, Kulichkova et al., 2017). Так как было известно, что генерация протеасом увеличена в различных линиях злокачественных гематопозитических клеток, Wada и др. измерили концентрацию протеасом в плазме крови пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями и выявили положительную корреляцию между концентрацией протеасом и тяжестью онкологического заболевания (Wada et al., 1993). У пациентов, страдающих острой лейкемией, неходжкинской лимфомой и миеломной болезнью повышенная концентрация протеасом в плазме крови была значимо снижена после полной ремиссии, наступившей в результате химиотерапии, в отличие от пациентов у которых ремиссия не наступала (Wada et al., 1993). Также повышенная концентрация ц-протеасом наблюдалась в случае хронического миелопролиферативного синдрома и миелодиспластического синдрома (Lavabre-Bertrand et al., 2001).

Взаимозависимость между стадией онкологического заболевания и концентрацией ц-протеасом была также обнаружена у пациентов с метастазирующей злокачественной меланомой (Stoebner et al., 2005). Значимо повышенные концентрации ц-протеасом также наблюдались у пациентов с различными солидными опухолями (Lavabre-Bertrand et al., 2001, Dutaud et al., 2002). Стоит отметить, что повышенная концентрация внеклеточных протеасом наблюдалась не только в случае онкологических заболеваний, но также и при циррозе печени, остром или хроническом гепатите и жировой инфильтрации печени (Wada et al., 1993). Кроме того, 15-кратное повышение концентрации ц-протеасом также было замечено у пациентов с сепсисом и травмами, в то время как у пациентов, прошедших хирургическое вмешательство без осложнений, концентрация ц-протеасом была увеличена лишь в два раза по сравнению с контролем (Roth et al., 2005). У пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как синдром Jo-1, синдром Сёгрена, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, системная склеродермия, васкулит, аутоиммунный гепатит, наблюдалось 20-кратное повышение концентрации ц-протеасом в плазме крови (Egerer et al., 2002). Таким образом, можно рассматривать внеклеточные

протеасомы как возможный прогностический параметр в исходе онкологических заболеваний. Нельзя, однако, не отметить тот факт, что в других исследованиях показано, что наибольший рост концентрации внеклеточных протеасом в плазме крови происходит только при значительном прогрессировании ракового заболевания (Lavabre-Bertrand et al., 2001), когда рак и так прекрасно диагностируется. Кроме того, у пациентов с некоторыми формами рака концентрация ц-протеасом не отличалась от пациентов здоровой группы. Так, например, пациенты, больные острой миелоцитарной лейкемией, по концентрации ц-протеасом не отличались от контрольной группы (Lavabre-Bertrand et al., 2001).

Несмотря на большое количество данных, касающихся исследованию концентрации и активности ц-протеасом у пациентов, страдающих тем или иным заболеванием, свойства секретируемых клетками протеасом или механизм их секреции на сегодняшний день не исследованы, что отдаляет перспективу использования внеклеточных протеасом в качестве маркеров онкологических и других заболеваний. Чтобы приблизиться к пониманию роли протеасом во внеклеточном пространстве, необходимо определить специфические особенности, в том числе посттрансляционные модификации белков внеклеточных протеасом в сравнении с внутриклеточными комплексами, и ответить на вопрос, какие механизмы задействованы в их транспорте во внеклеточное пространство.

1.4. Посттрансляционные модификации протеасомы

Большое количество белков в клетке посттрансляционно модифицируются и во многих случаях обретают свою нормальную функцию только в результате таких модификаций. Несмотря на то, что посттрансляционные модификации не могут быть изучены на уровне последовательности ДНК или транскриптома, их исследование необходимо для понимания функций белков. Ранее даже с использованием масс-спектрометрии было сложно определять посттрансляционные модификации из-за низкой эффективности ионизации модифицированных пептидов в масс-спектрометре. Тем не менее, с развитием масс-спектрометрического анализа стало возможным проводить относительно эффективный анализ различных посттрансляционных модификаций белков (Silva et al., 2013). Было обнаружено, что в качестве посттрансляционных модификаций субъединиц протеасомы выступают фосфорилирование (Iwafune et al., 2004, Lu et al., 2008), убиквитинирование (Isasa et al., 2010, Zong et al., 2014), сумоилирование (Panse et al., 2004, Scruggs et al., 2012), N^α-ацетилирование (Kimura et al., 2010), N^α-

миристилирование (Kimura et al., 2012), N^α-метилование (Kimura et al., 2013), сукцинирование (Weinert et al., 2013) и другие модификации.

На сегодняшний день ведутся обширные протеомные исследования протеасомных белков, в результате которых пополняются списки идентифицированных посттрансляционных модификаций (Рис. 2) (Iwafune et al., 2004, Wang et al., 2007), однако для большинства посттрансляционных модификаций протеасом функциональная значимость до сих пор не определена. Ниже будут рассмотрены некоторые посттрансляционные модификации протеасом, в том числе те, для которых были предприняты попытки исследовать функциональную значимость в клетке.

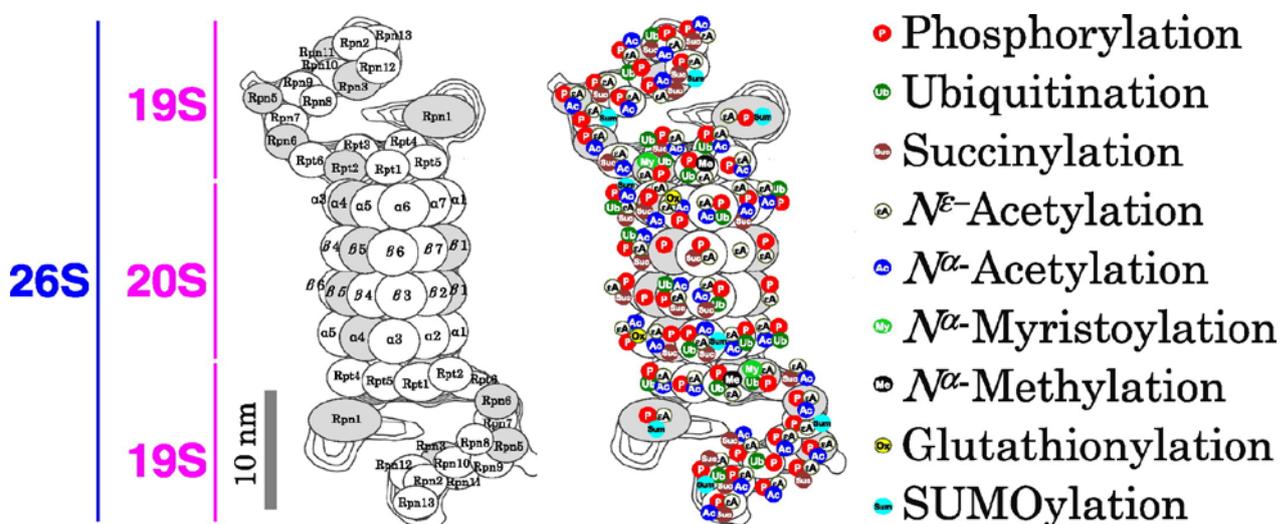


Рисунок 2 – Структура и посттрансляционные модификации субъединиц дрожжевой 26S-протеасомы (Hirano et al., 2016)

Фосфорилирование. У дрожжей три сайта фосфорилирования в С-терминальном конце субъединицы 20S протеасом α7 были идентифицированы при помощи МС/МС-анализа и сайт-направленного мутагенеза: Ser258, Ser263, Ser264 (Iwafune et al., 2004). Дефосфорилирование 20S-протеасомы щелочной фосфатазой приводило к снижению химотрипсин-подобной активности в присутствии SDS, что предполагает снижение сродства между ферментом и субстратом (Iwafune et al., 2002). У дрожжей показано 30%-е снижение АТФ-азной активности 19S-частицы протеасомы после дефосфорилирования λ фосфатазой (Kikuchi et al., 2010). Также показано, что фосфорилирование субъединицы α7 влияет на стабильность 26S-протеасомного комплекса крысы (Bose et al., 2004).

В клетках млекопитающих обнаружено, что фосфорилирование субъединицы 19S-регулятора Rpt6 и активность 26S-протеасомы зависят от киназы PKA (Zhang et al., 2007).

Фосфорилирование и протеолитическая активность 20S-протеасом из тканей сердца и печени мыши также стимулировались киназой PKA (Lu et al., 2008). В противоположность этому, при формировании долговременной памяти, вызванной страхом у крыс, киназа CaMKII, а не PKA, регулировала фосфорилирование субъединицы Rpt6 в положении Ser120 и протеолитическую активность протеасом (Jarome et al., 2013). В нейронах крысы фосфорилирование субъединицы Rpt6 по Ser120 киназой CaMKII приводило к аккумуляции протеасом в дендритных шипиках (Bingol et al., 2010). Обнаружено также, что фосфорилирование субъединицы Rpt6 вовлечено в сборку протеасом в клетках свиньи за счет взаимодействия ее с субъединицей 20S-протеасомы $\alpha 2$ (Satoh et al., 2001).

Имеется множество сайтов фосфорилирования в каждой субъединице 26S-протеасомы (Guo et al., 2017). Но возникает вопрос о функциональности всех этих сайтов фосфорилирования. Так как белки обычно анализируются после гидролиза методом «дробовика» (shotgun), становится сложным точно определить статус посттрансляционных модификаций белков. Даже если белки одинаковы, статус фосфорилирования может отличаться у разных молекул. При анализе методом «дробовика» эта информация утрачивается (Osinalde et al., 2017). Одним из способов для преодоления этой проблемы является Phos-tag аффинный электрофорез для изучения фосфорилированных белков (Kimura et al., 2010, Kinoshita et al., 2008).

Убиквитинирование и ацетилирование. Обнаружено, что моноубиквитинирование субъединицы 19S регулятора Rpn10 E3-убиквитин-лигазой Rsp5 в области убиквитин-связывающего домена (ubiquitin-interacting motif) снижало взаимодействие субъединицы с субстратом у дрожжей (Isasa et al., 2010). Аналогичным образом полиубиквитинирование убиквитин-рецептора Rpn13 в клетках млекопитающих E3-убиквитин-лигазой Ube3c также приводило к ингибированию взаимодействия субъединицы Rpn13 с субстратом (Besche et al., 2014). На сегодняшний день идентифицированы 63 сайта убиквитинирования в 20S-протеасоме из сердечной ткани человека (5 пациентов с кардиомиопатиями) и одновременно выявлены 65 сайтов ацетилирования (Zong et al., 2014). Интересно, что 39 сайтов в числе обнаруженных перекрывались, в результате чего было высказано предположение о том, что функция протеасом регулируется конкуренцией между убиквитинированием и ацетилированием.

У дрожжей роль N^α-ацетилирования белков 20S-протеасомы была изучена с помощью использования мутантов по гену *NatA*, *nat1*. У мутантов *nat1* химотрипсин-подобная активность протеасом была заметно повышена (Kimura et al., 2010). Предполагается, что у мутантов *nat1* ворота в 20S-протеасому остаются открытыми, и поэтому субстраты могут свободно проходить в каталитическую полость протеасомы

(Kimura et al., 2010). Эту гипотезу подтвердили с помощью метода рентгеноструктурной кристаллографии (Groll et al., 2000). Кроме того, у мутантов дрожжей с N-терминальной делецией $\alpha 3$ -субъединицы ворота в каталитическую полость 20S-протеасомы были открыты (Groll et al., 2000). Интересно, что каталитическая активность 26S-протеасомы, тем не менее, была одинакова как у линий дрожжей дикого типа, так и у мутантов (Kimura et al., 2003). Вообще, многие субъединицы 20S-протеасомы клеток человека и мыши, а также клеток острой миелогенной лейкемии человека, являются ацетилованными по лизину. Причем, у 20S-протеасом человека и мыши ацетилирование лизина было ассоциировано с регуляцией протеазной активности (Wang et al., 2013).

SUMO-илирование у дрожжей было идентифицировано у субъединиц протеасом Rpn1, Rpn7, Rpn12 и $\alpha 3$ (Panse et al., 2004, Scruggs et al., 2012). У человека SUMO-илированию подвергались более 10 субъединиц протеасом (Guo et al., 2005, Tatham et al., 2011). Тем не менее, функции данной модификации в протеасоме остаются неизвестными.

N^α-миристилирование. было обнаружено у субъединицы протеасом Rpt2 у дрожжей, человека, мышей и риса с помощью МС-анализа. Чтобы разобраться в функциональной значимости этой посттрансляционной модификации протеасом, были сконструированы штаммы дрожжей, в которых N^α-сайт миристилирования (глицин) был заменен на аланин или удален (Kimura et al., 2012). Как оказалось, в мутантных штаммах пептидазная активность и сборка протеасомы не были затронуты, однако, мутантные штаммы показали фенотипы, соответствующие пониженной деградации неправильно сложенных белков, угнетенному росту в присутствии канаванина и при повышенной температуре. Предполагаемой функцией этой модификации считают ядерное заякоривание, в результате которого находящиеся в ядре протеасомы могут способствовать протеолизу функционально важных ядерных белков (Hirano et al., 2016).

Метилирование. В штаммах дрожжей, экспрессирующих ген, кодирующий субъединицу 19S-регулятора протеасом Rpt1 без N-терминальной последовательности распознавания N-метилтрансферазы, N^α-метилирования не наблюдалось, и рост клеток был серьезно угнетен в среде YPD при 30°C. Полученные мутанты росли более медленно в среде, содержащей перекись водорода и канаванин, по сравнению со штаммом дикого типа. Эти результаты показали, что метилирование одной субъединицы протеасом Rpt1 крайне важно для роста клеток дрожжей и их устойчивости к окислительному стрессу (Kimura et al., 2013).

Глутатионилирование. В стационарной фазе роста дрожжей два остатка цистеина (Cys76, Cys21) из 28 общего количества остатков цистеина субъединицы 20S-протеасомы $\alpha 5$ были глутатионилированы. Причем оказалось, что при деглутатионилировании

субъединицы $\alpha 5$ канал в протеолитическую полость 20S-протеасомы оказывался закрытым, в результате чего наблюдалось снижение химотрипсин- и каспаза-подобных активности протеасом (Silva et al., 2012, Demasi et al., 2003, Demasi et al., 2013).

Окисление. Обнаружено, что субъединица 26S-протеасомы Rpt5 в клетках нейробластомы человека показывает высокую чувствительность к окислению (Ishii et al., 2005). Аналогичные данные показаны для протеасом, полученных из сердечной ткани человека (Divald et al., 2010).

Гликозилирование. Интересно, что O-GlcNAc-модифицирование АТФ-азной субъединицы 26S-протеасомы Rpt2 в клетках млекопитающих понижает химотрипсиновую активность протеасом (Zhang et al., 2003). Кроме того, в клетках мыши после окрашивания ProQ Emerald разделенных в системе 2D-электрофореза гликозилированных субъединиц 20S-протеасомы были идентифицированы гликозилированные субъединицы $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ и $\beta 6$ (Zong et al., 2008). У дрожжей таким методом гликозилированные субъединицы найдены не были (Zhang et al., 2003).

Поли-ADP-рибозилирование протеасом в культуре клеток K562 вызывалось добавлением пероксида водорода (Ullrich et al., 1999). Интересно, что поли-ADP-рибозилированная протеасома эффективно расщепляла поврежденные гистоны. Предполагается, что такая модификация протеасом может быть связана с защитной системой ядра при избыточном окислении.

Сукцинилирование. У дрожжей, 13 субъединиц 26S-протеасомы из 35 сукцинилированы, причем обнаружен перекрест между сукцинилированием и ацетилизацией остатков лизина у субъединиц $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 3$, $\beta 6$, Rpt3, Rpn2, Rpn3, Rpn9, Rpn12, Rpn13 (Weinert et al., 2013).

С-терминальный процессинг. У выделенных из сперматозоидов асцидии *Halocynthia roretzi* 26S-протеасом был обнаружен специфичный процессинг 16 аминокислотных остатков с С-конца $\alpha 6$ -субъединицы (Yokota et al., 2011). Предполагается, что С-терминальная последовательность GLVPPVSG, уникальная у *H. roretzi* и *C. intestinalis*, может являться сигнальной последовательностью для транспорта в акросому и последующего выхода из клетки.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что из проведенных исследований посттрансляционных модификаций протеасом у разных видов организмов, большая их часть сфокусирована на изучении 20S-протеасомы дрожжей. Исследования посттрансляционных модификаций протеасом во внеклеточном пространстве не проводились до сих пор.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клеточные линии и культивирование клеток

В работе были использованы клетки человека линии HEK293T, HeLa и K562. Клетки HEK293T, HeLa культивировались в чашках Петри в среде DMEM (Биолот, Россия) в присутствии 10% и 8% эмбриональной бычьей сыворотки, соответственно, (FBS, Gibco, США), 2 mM L-глутамина (Биолот, Россия), 50 мкг/мл пенициллина/стрептомицина (Биолот, Россия) при 37°C и 5% CO₂. Клетки K562 культивировались в 50 мл флаконах в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия) в присутствии 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, Gibco, США), 2 mM L-глутамина (Биолот, Россия), 50 мкг/мл пенициллина/стрептомицина.

Для масс-спектрометрического анализа посттрансляционных модификаций была использована линия клеток миелогенной лейкемии человека K562, стабильно экспрессирующая генетическую конструкцию, кодирующую субъединицу протеасом человека $\beta 7$ (*PSMB4*) слитую на С-конце со сложным полипептидом НТВН (Н – последовательность из шести гистидинов, Т – сайт расщепления TEV-протеазой, В – сайт биотинилирования *in vivo*) (Artamonova et al., 2014).

2.2. Аффинная очистка протеасом

Для приготовления клеточного экстракта клетки промывали холодным PBS и лизировали в буфере А (50мМ Na-фосфат, pH 7.5, 100мМ NaCl, 10%-ый глицерин, 5мМ АТФ, 1мМ DTT, 5мМ MgCl₂, 0.5% NP-40, ингибиторы протеаз). Клеточные фрагменты удаляли центрифугированием при 13 тыс. об/мин в течение 30 мин при 4°C.

Для аффинной очистки 26S протеасом к клеточному экстракту клеток K562- $\beta 7$ -НТВН добавляли стрептавидин-агарозу (Thermo Scientific, США) и инкубировали в течение ночи при 4°C при постоянном перемешивании. Далее белки в комплексе со стрептавидин-агарозой осаждали центрифугированием и промывали последовательно 20 объемами лизирующего буфера и 10 объемами буфера ТЕВ (50 мМ ТрисHCl, pH 7.5, 10% глицерин). После серии промывок протеасомы элюировали со стрептавидин-агарозы двумя объемами буфера ТЕВ в присутствии 0.1% TEV-протеазы (Sigma-Aldrich, США) в течение 2 ч. при температуре 30°C и концентрировали с применением центрифужных фильтров Amicon Ultra-0.5 (100K NMWL, Millipore, США).

При очистке 20S-протеасом были использованы дополнительные этапы промывок и инкубирования в буферах, вызывающих диссоциацию комплекса коровой и

регуляторной частицы (50 мМ ТрисHCl, pH 7.5, 1мМ EDTA, 100мМ NaCl, 1мМ ATP) и разделение крышки и основания регуляторной частицы (50 мМ ТрисHCl, pH 7.5, 1мМ EDTA, 500мМ NaCl, 1мМ ATP).

Для выделения внеклеточных протеасом, клетки K562-β7-НТВН в течение ночи культивировались в среде RPMI-1640 не содержащей сыворотки для предотвращения контаминации внеклеточных протеасом сывороточными белками. Среда для культивирования была собрана, предпочищена последовательным центрифугированием при 300g, (10 мин.) для удаления клеток, при 1200g (10 мин.) и 15000g (30 мин.) для удаления клеточного дебриса и крупных везикул, и концентрирована (100X) при помощи фильтров Amicon Ultra-15 (100K NMWL, Millipore, США).

Концентрацию выделенных протеасом определяли с помощью метода Бредфорд при длине волны 595 нм (Bradford, 1976).

2.3. Измерение пептидазной активности протеасом

Химотрипсин-подобная активность была измерена с помощью гидролиза флуорогенного пептида Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-амино-4-метилкумарина (AMC) (3-H2505p, Enzo Life Sciences, США) в концентрации 4 нмоль в буфере HEPES (250 мМ NaCl, 50 мМ HEPES, 0.5% Nonidet P-40, 10% глицерол, 2 мМ ЭДТА, 10 мМ NaF), содержащем также 0.5 мкг протеасом, при 37°C в течение часа. Аналогично, для измерения трипсин- и каспаз-подобных активностей были использованы флуорогенные пептиды Bz-Val-Gly-Arg-AMC (BML-9375-0005, Enzo Life Sciences, США) и Z-Leu-Leu-Glu-AMC (BML-ZW9345, Enzo Life Sciences, США) соответственно. Концентрацию продукта гидролиза AMC определяли на флуориметре VersaFluor (Bio-Rad, США), измеряя экстинкцию и эмиссию при длинах волн 365 и 440 нм соответственно. Для контроля за субстратной специфичностью очищенные протеасомы обрабатывали протеасомным ингибитором MG132 в концентрации 100 мкМ в течение 15 мин при 0°C перед добавлением субстрата.

2.4. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн-блот анализ

Разделение белков проводили методом SDS-электрофореза в 10-13% полиакриламидном геле, в блоках геля 90×60×1.5 мм при силе тока 40 мА на пластину в течение 1.5 ч по методу Лэммли (Laemmli, 1970) в вертикальной камере (Bio-Rad, США), использовали Tris-глициновый электродный буфер (pH 8.3), содержащий 25 мМ Tris-HCl, 250 мМ глицина и 0.1 % SDS. Пробы прогревали в течение 5 мин при 37°C в буфере для нанесения.

Белки из геля переносили на PVDF мембрану (Bio-Rad, США) методом «полусухого» переноса с помощью трансблота фирмы Sigma (США) с использованием буфера, содержащего 48 мМ Tris-HCl, 39 мМ глицина, 0.1 % SDS и 10% метанола. Для проверки качества переноса белков на мембрану использовали предокрашенные маркеры молекулярных весов (Thermo, США).

Вестерн-блоттинг проводили в соответствии с методикой ECL Western Blotting protocols (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Мембрану отмывали в буфере PBSt (PBS, 0.1 % Tween-20) и блокировали центры неспецифического связывания в течение 1 ч при комнатной температуре 5%-ным обезжиренным молоком в этом же буфере. По окончании инкубации мембрану промывали в буфере PBSt и инкубировали с первичными антителами в течение ночи при +4°C. Для специфического выявления белков использовали следующие первые моноклональные антитела: anti-T7-tag mouse (Novagen), anti-β3 mouse (Enzo Life Sciences). После инкубации с первыми антителами мембрану промывали PBSt (3 раза по 10 мин), затем инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с вторыми антителами, после чего промывали мембрану, как описано выше. В качестве вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, использовали козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов мыши (1:5000, GAM-HRP) (Jackson Immunoresearch, США). Белки, связавшиеся с антителами, выявляли с помощью метода усиленной хемилюминесценции SuperSignal (Thermo, США). Для этого на мембрану наносили раствор ECL и, далее, регистрировали хемилюминесцентное излучение с помощью системы гель-документирования ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, США).

2.5. Двумерный электрофорез

Для изоэлектрофокусирования образцов в первом направлении применяли готовые стрипы с нанесенными амфолитами длиной 11 см, с pI от 3 до 10 (Amersham). Для изоэлектрофокусирования образцы протеасом смешивали с буфером для нанесения (9М мочевины, 2% CHAPS (Sigma), 1.2% DeStreak (Amersham), 2% IPG-буфера (Amersham)).

После изоэлектрофокусирования стрипы инкубировали в течение 10-15 мин в буфере: 50 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 6М мочевины, 30% глицерина, 2% SDS, 1% DTT, 0.0005% бромфенолового синего. Затем повторно инкубировали в том же буфере без 1% DTT и в присутствии 2.5% йодацетамида в течение 10-15 минут. После этого стрипы фиксировали с помощью 0.5% легкоплавкой агарозы на 30% SDS-полиакриламидном геле и проводили электрофорез во втором направлении при 220V и 40мА. Гель окрашивали Coomassie brilliant blue G-250 и отмывали 7% уксусной кислотой.

2.6. Масс-спектрометрический анализ

После электрофоретического разделения протеасомных белков и окрашивания Кумасси G250 полоски или пятна геля, соответствующие белковым полосам или пятнам, вырезали и промывали для удаления красителя в 40% растворе ацетонитрила в 100 мМ водном бикарбонате аммония в течение 15 мин при 37°C. После удаления раствора, кусочки геля обезвоживали инкубацией в течение 10 мин в ацетонитриле, затем, удалив ацетонитрил, пробы высушивали. К высушенным образцам добавляли раствор модифицированного трипсина (Promega, США) в 50 мМ растворе бикарбоната аммония с концентрацией 15 мкг/мл и инкубировали сначала в течение 30 мин на льду, затем в течение 4 ч при 37°C. Трипсинолиз останавливали добавлением к раствору 0,5% TFA в 10% растворе водного ацетонитрила (в соотношении 2:1 к раствору трипсина). Надгелевый раствор использовали для получения масс-спектров.

Для приготовления образцов для МС-анализа непосредственно на мишени смешивали 0,7 мкл белкового образца и 0,35 мкл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в концентрации 20мг/мл в 30% водном ацетонитриле в присутствии 0,1% TFA, полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на ионно-циклотронном масс-спектрометре ионно-циклотронного резонанса с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI FT-ICR) Varian 902-MS (Varian, США) со сверхпроводящим магнитом 9.4 Тесла, в режиме положительных ионов и - масс-спектрометре с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF/TOF) AB Sciex 5800 (AB Sciex, США) в научно-исследовательском комплексе "Нанобиотехнологии" СПбГПУ.

Идентификацию белков осуществляли с помощью метода пептидного фингерпринтинга с использованием программы Mascot (www.matrixscience.com). Также был использован Protein-Prospector MS-Fit для идентификации белков и посттрансляционных модификаций (www.prospector.ucsf.edu).

2.7. Ферментативные реакции и амплификация фрагментов ДНК методом ПЦР

Ферментативные реакции были проведены согласно протоколам, приложенным к ферментам. Для выполнения реакции рестрикции смешивали ДНК с ферментом из расчета 1-10 единиц эндонуклеазы рестрикции на 1 мкг ДНК, добавляли прилагаемый буфер и, при необходимости, воду, инкубировали в течение часа, после чего проводили

очистку ДНК от буфера и фермента. Были использованы полимеразы Taq DNA polimerase (Thermo Scientific #EP0402) и БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс МНС010-200) для проведения ПЦР в аналитических целях и Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (Thermo Scientific #F-530S) для продукции генетического материала с целью дальнейшего молекулярного клонирования.

Перед проведением реакции лигирования вектор обрабатывали щелочной фосфатазой Fast Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific #EF0651). Лигирование проводили с использованием T4 DNA Ligase (Thermo Scientific #EL0014) в течение 10 минут при температуре 22°C. Очистка фрагментов после ферментативных реакций и из геля проводилась с помощью набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Разделение продуктов ПЦР и плазмид проводилось в 0,8-2% агарозном геле.

Тотальную клеточную РНК получали согласно стандартному протоколу RNeasy Mini kit (Qiagen, США). Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop (США) при длине волны 260 нм. Далее, очищенную тотальную РНК обрабатывали ДНКазой RQ1 RNase-Free DNase (Promega, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для реакции обратной транскрипции использовали 2 мкг, и 0,5 мкг случайных гексапраймеров (Thermo, США) и обратной транскриптазы RT (Promega, США); реакцию проводили согласно протоколу фирмы-производителя. Полученную кДНК хранили при -20° С.

Для амплификации кодирующей области гена *PSMB3* протеасомы человека из кДНК были подобраны последовательности праймеров, несущих сайты рестрикции *AscI* и *SpeI* с целью дальнейшего клонирования фрагмента в плазмиду системы tTR-KRAB – pLVTHM-T7-Puro (Таблица 1).

Таблица 1 – Последовательности праймеров и температуры отжига праймеров для реакции амплификации (ПЦР) к кодирующей области гена *PSMB3*

Ген	Последовательность	Температура отжига
<i>PSMB3</i>	F: AGGCGCGCCAATGTCTATTATGTCCTATAACGGAGG	62 °C
	R: TCACTAGTTTAGTCCATTTCGGGCCTTC	

2.8. Сайт-направленный мутагенез

Для замены последовательности серина в 181-м положении на последовательность аланина в гене *PSMB3* протеасомы человека был использован метод ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза.

Для этого были использованы пара праймеров, несущих нужную мутацию (В,С), и пара праймеров (А, D), комплементарных концам нужного фрагмента ДНК. Пара праймеров ВС также несла сайленс-мутацию в 180-м аминокислотном положении для оптимизации температуры отжига подобранных олигонуклеотидов.

Таблица 2 – Праймеры ПЦР-опосредованного сайт-специфического мутагенеза

Название	Последовательность	Температура отжига
А	AGGCGCGCCAATGTCTATTATGTCCTATAACGGAGGGGCC	60.5°C
В	TGACTCCCATGCCTGCTACTGCATCC	64.2°C
С	GGATGCAGTAGCAGGCATGGGAGTCA	64.2°C
Д	ТСАСТАГТТТАГТССАТТССГГГССТТСАГТГ	59°C

В ходе первых двух реакций были амплифицированы методом ПЦР фрагменты ДНК с мутацией (А+В, С+D), которые затем объединили в ходе третьей реакции амплификации методом ПЦР (А+D). Матрицей для ПЦР-реакции служила модифицированная плазида рLVTHM-T7-PSMB3-iresPuro – компонент доксициклин-контролируемой лентивирусной векторной системы, содержащий tet-оператор и кодирующий ген субъединицы протеасомы *PSMB3*, слитый с последовательностью тэга-T7. Для синтеза фрагментов была использована высокоточная ДНК-полимераза Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific #F-530S). Полученный фрагмент, несущий необходимую мутацию, был заклонирован в плазмиду рLVTHM-T7-Puro системы tTR-KRAB по сайтам рестрикции *AscI* и *SpeI*.

2.9. Трансформация

Компетентные клетки *E.coli* Top10, предварительно полученные по методу Rubidium Competent Cell Prep – Rich Roberts Lab Group, хранившиеся при -70°C, размораживали на льду в течение 15 мин.

Далее к бактериям добавляли 10-50 нг плазмидной ДНК и инкубировали в течение 5 минут на льду, затем клетки подвергали тепловому шоку при 41°C в течение 2 минут и инкубировали в течение 5 минут на льду. Полученную смесь втирали в чашку Петри с агаром и селективным антибиотиком и инкубировали в течение ночи при 37°C

2.10. Выделение плазмидной ДНК

Ночные культуры бактериальных колоний, полученные в результате плазмидной трансформации, растили в 10 мл среды LB с селективным антибиотиком при 37°C и интенсивном перемешивании.

Небольшие количества плазмидной ДНК высокого качества выделяли с помощью GeneGet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific #K0502).

Для выделения больших количеств плазмидной ДНК ночные культуры переносили в 100 мл среды LB с селективным антибиотиком и растили в течение ночи при 37°C и интенсивном перемешивании. Далее плазмидная ДНК выделялась в максипрепаративных количествах с помощью метода щелочного лизиса с использованием самостоятельно приготовленных буферов (Birnboim, Doly, 1979).

Концентрацию полученной плазмидной ДНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop (США) при длине волны 260 нм.

2.11. Получение вирусных частиц

Клетки линии HEK293T рассевали на 10-сантиметровую культуральную чашку Петри в среде DMEM с 10% FBS до достижения 80% конфлюэнтности. За 2 часа до трансфекции среду культивирования заменяли на свежую. Свежие трансфекционные смеси готовили следующим образом: в пробирке смешивали 135 мкл 1M CaCl₂, необходимое количество ДНК, состоящее из 3-х плазмид:

1. а) 11 мкг модифицированной pLVCT-tTR-KRAB (Addgene#12247) с геном устойчивости к бластицидину – компонент доксициклин-контролируемой лентивирусной векторной системы, кодирующий гибридный белок tTR-KRAB, в котором тетрациклиновый репрессор (tTR) из *E.coli* Tn10 слит с KRAB доменом человеческого Kox1.

б) 11 мкг модифицированной pLVTHM-T7-PSMB3-iresPuro (Addgene #12247) с геном устойчивости к пурамицину – компонент доксициклин-контролируемой лентивирусной векторной системы, содержащий tet-оператор и кодирующий ген субъединицы протеасомы PSMB3, слитый с N-конца с тэгом T7.

в) 11 мкг модифицированной pLVTHM-T7-PSMB3_S181A-iresPuro (Addgene #12247) с геном устойчивости к пурамицину – компонент доксициклин-контролируемой лентивирусной векторной системы, содержащий tet-оператор и кодирующий мутантный ген субъединицы протеасомы PSMB3, в котором последовательность серина в 181-м положении заменена на последовательность аланина, слитый с N-конца с тэгом T7

2. 4 мкг pMD2 – плаزمид, кодирующая белки вирусной оболочки (addgene #12259)
3. 8 мкг pPAX – плаزمид, кодирующая белки, необходимые для сборки вирусной частицы (addgene #12260)

Объём каждой смеси доводили до 600 мкл стерильной водой. Далее, в полученный раствор ДНК вносили по капле при постоянном перемешивании 600 мкл 2-кратного буфера HBS (280 mM NaCl, 100 mM Hepes, 1.5 mM Na₂HPO₄; 7.11 ≤ pH ≤ 7.13). Полученную смесь инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и затем по капле добавляли в среду культивирования подготовленных для трансфекции клеток HEK293T. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂, после чего меняли среду культивирования на свежую.

Вирусные частицы в среде собирали через 48 часов после постановки трансфекции в течение двух-трех дней. Содержащую вирусы среду пропускали через 0.45 мкм шприцевой фильтр (Millipore, США). Вирусные частицы собирали в осадок с помощью центрифуги Beckman Avanti J-E Series в течение 2 ч при 47000xg, затем осадок растворяли в бессывороточной среде Opti-MEM (Gibco, США) в течение суток при постоянном перемешивании при +4°C. Через сутки вирусные частицы аликвотировали, замораживали и хранили при -70°C.

2.12. Получение нокаут конструкций и нокаут по гену *PSMB3*

Для нокаута гена была использована система CRISPR-Cas9 (Hwang et al., 2013, Jinek et al., 2012)

Были подобраны оригинальные последовательности гид-РНК для экзона 2 и экзона 3 гена *PSMB3* протеасомы (Табл. 3). Активность гид-РНК высчитывалась по алгоритму Донча (Doench et al., 2016), а off-target активность (сайт-специфичность) – по алгоритму Сюй (Hsu et al., 2013) во избежание неспецифичной активности системы CRISPR/Cas9 (Табл. 3).

Таблица 3 – Олигонуклеотиды с последовательностями гидовых РНК

Ген	Цепь	Последовательность	РАМ	Активность	Off-target
<i>PSMB3</i> 5'-интрон -экзон 2	sense	CACCGTTATAGGACATAATAGACT	AGG	62	84
	antisense	AAACAGTCTATTATGTCCCTATAAC			
<i>PSMB3</i> Экзон 3 – интрон-3'	sense	CACCGCTCACCGTTTCTCATAACAAG	AGG	64	95
	antisense	AAACCTTGTATGAGAAACGGTGAGC			
Отрицательный контроль	sense	GCACTACCAGAGCTAACTCA			
	antisense	TGAGTTAGCTCTGGTAGTGTC			

Для отжига комплементарные олигонуклеотиды с последовательностями гид-РНК инкубировались при 94°C в течение 4 минут и несколько часов медленно охлаждались до 30°C. Полученные двухцепочные фрагменты были заклонированы в плазмиду pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (addgene # 42230 Feng Zhang Lab) по сайтам рестрикции *BbsI*.

Полученные плазмиды, содержащие Cas9, GFP и последовательности гид-РНК (Табл. 3) были доставлены трансфекцией в клетки K562 с помощью набора TurboFect (ThermoFisher Scientific). Отбор клеток, получивших плазмиду, провели сортировкой по зеленому флуоресцентному сигналу с помощью S3e™ Cell Sorter (BioRad).

2.13. Получение доксициклин-регулируемой клеточной линии

За день до вирусной инфекции клетки HeLa и K562 высевались в количестве 5×10^4 на лунку 24-луночного планшета. На следующий день клетки инфицировались лентивирусами, содержащими tTR-KRAB в присутствии полибрена в концентрации 8 мкг/мл. На следующий день трансдукционную среду убирали и добавляли свежую среду с селективным антибиотиком бластицидином в концентрации 10 мкг/мл. Селекцию клеток проводили в течение 10 суток. Полученные стабильно экспрессирующие tTR-KRAB клетки аналогично трансдуцировали лентивирусами, содержащими tetO с *PSMB3* дикого типа или *PSMB3*, в котором последовательность серина в 181-м положении была заменена на последовательность аланина. Селекцию клеток проводили в течение 7 дней в присутствии в среде культивирования селективного антибиотика пурамицина в концентрации 1 мкг/мл. После получения доксициклин-регулируемой клеточной линии клетки переводились в среду с доксициклином в концентрации 0.1 мкг/мл.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Аффинное очищение протеасом

Ранее для выделения 26S-протеасомы в нашей лаборатории использовали метод, сочетающий в себе ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы и ионообменную хроматографию на DE-52 целлюлозе, а также концентрирование с помощью этанола, полиэтиленгликоля 6000Da (ПЭГ 6000) и центрифужных пробирок (Amicon Ultra <10 kDa, Millipore). Однако в случае концентрирования этанолом и ПЭГ 6000 происходила контаминация проб остатками солей, которые могут приводить к искаженным результатам и невозпроизводимым результатам. Количественный выход 26S-протеасом при использовании центрифужных пробирок оказывался недостаточным (Евтеева и др. 2013). В то же время, аффинная хроматография в сочетании с генно-инженерными подходами, позволяет более мягко и специфично выделять высокомолекулярные комплексы, к которым и относятся протеасомы (Wang et al., 2007).

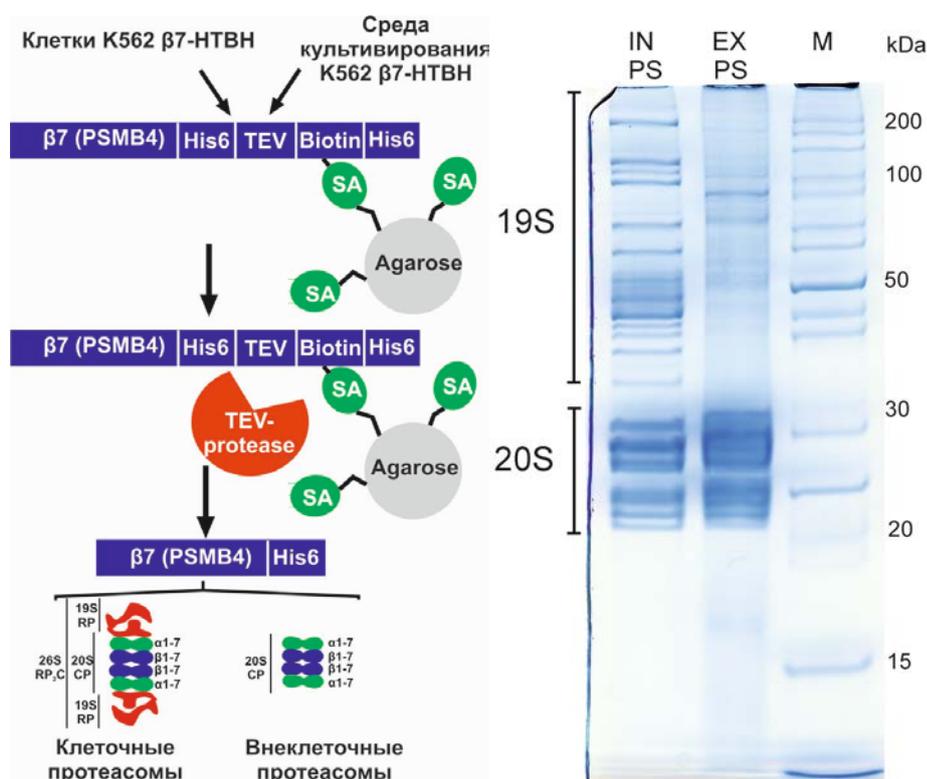


Рисунок 3 – Слева - схематическое представление аффинного очищения протеасом из линии клеток K562, содержащей слитую конструкцию $\beta 7$ -НТВН. (His6 (H), сайт для расщепления TEV-протеазой (T), сигнальная последовательность для биотинилирования *in vivo* (B)). SA – стрептавидин. Справа – разделение аффинно очищенных клеточных и внеклеточных протеасом с помощью денатурирующего SDS-PAGE электрофореза.

В нашей работе для выделения клеточных и внеклеточных протеасом была использована ранее полученная линия клеток миелогенной лейкемии человека K562, стабильно экспрессирующая генетическую конструкцию, кодирующую субъединицу протеасом человека $\beta 7$ (*PSMB4*) слитую на С-конце со сложным полипептидом НТВН (Н – последовательность из шести гистидинов, Т – сайт расщепления TEV-протеазой, В – сайт биотинилирования *in vivo*) (Рис. 3) (Artamonova et al., 2014). Пептид НТВН позволял нам очищать протеасомы благодаря их связыванию со стрептавидиновым носителем за счет биотинилированного фрагмента пептида и последующего элюирования с носителя с помощью TEV-протеазы. При разделении очищенных проб с помощью SDS-PAGE электрофореза мы наблюдали характерную для клеточных 26S-протеасом картину распределения протеасомных субъединиц: белки 20S-коровой частицы и 19S-регуляторного комплекса. В тоже время, как и ожидалось, протеасомы очищенные из кондиционированной клетками K562 среды представляли собой 20S-комплексы без 19S-регуляторных частиц (Рис. 3).

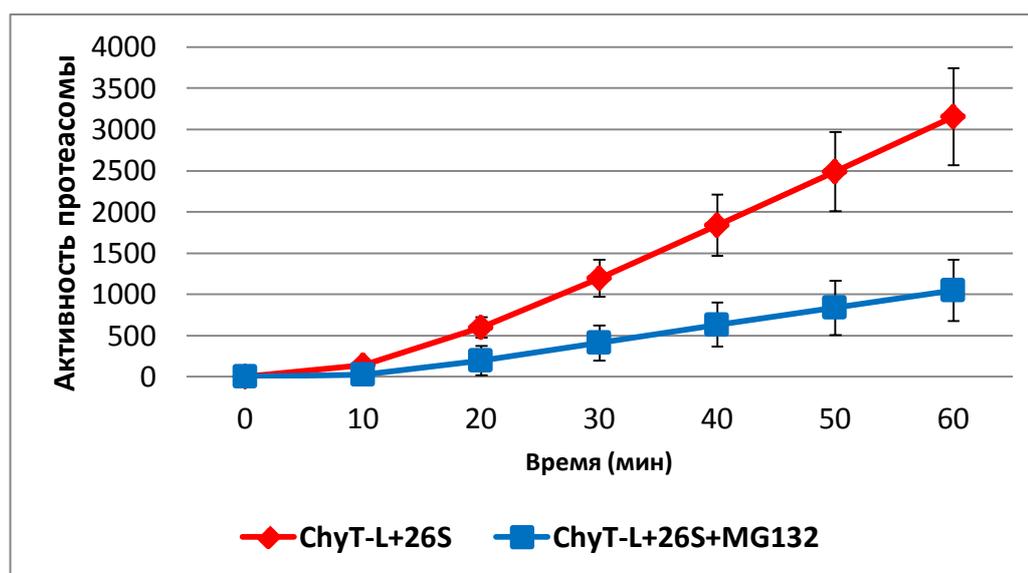


Рисунок 4 – График химотрипсин-подобной активности 26S-протеасомы ChyT-L+26S – пептидный субстрат химотрипсиновой активности + 26S-протеасома ChyT-L+26S+MG132 – пептидный субстрат химотрипсиновой активности + 26S-протеасома + протеасомный ингибитор химотрипсин-подобной активности MG132

Протеолитическая активность выделенных протеасом была подтверждена при помощи анализа гидролиза специфических для химотрипсин-, трипсин-, калпаза-подобных активностей флуорогенных пептидов (Рис. 4, 5). Субстратная специфичность проверена с помощью ингибитора химотрипсин-подобной активности протеасомы MG132 (Рис. 4, 5).

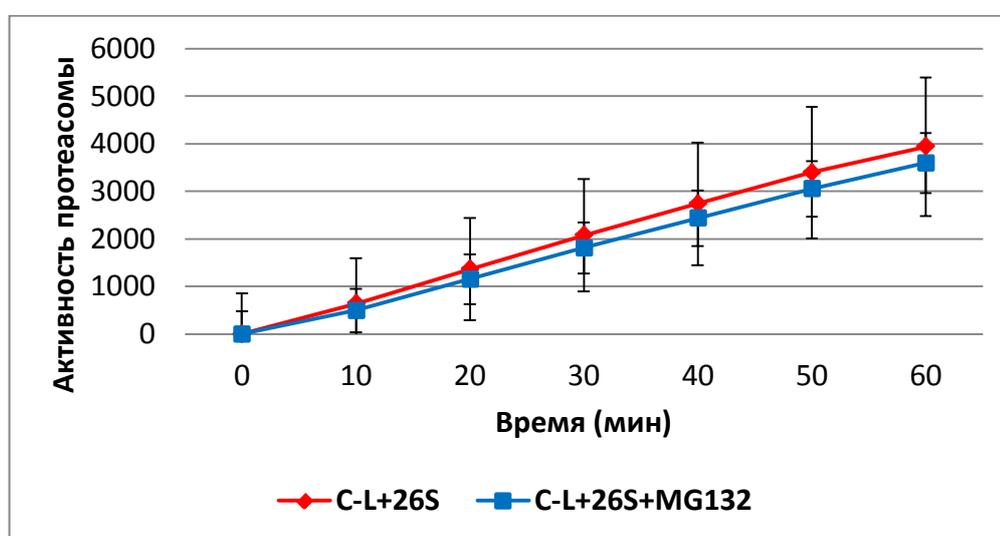
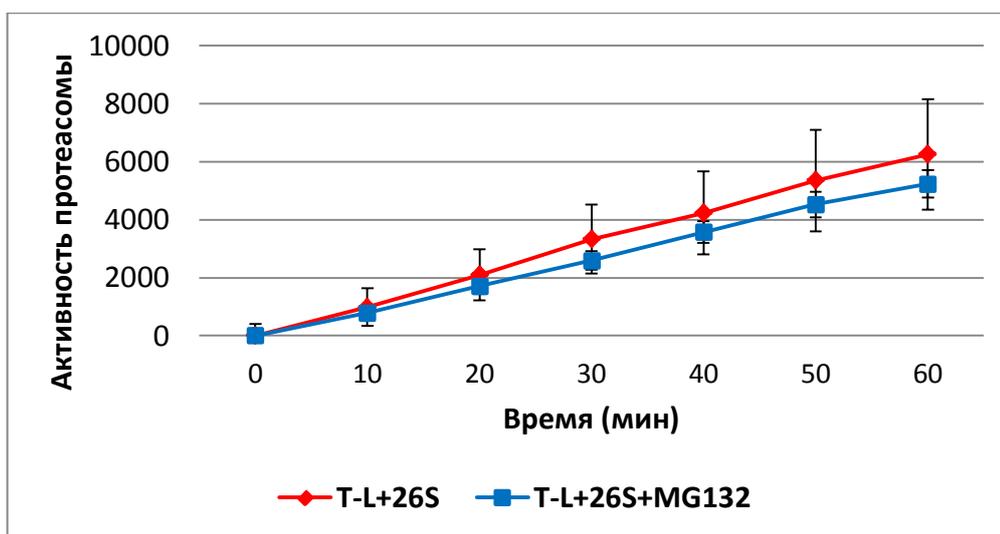


Рисунок 5 – Сверху - график трипсин-подобной активности 26S-протеасомы
 T-L+26S – пептидный субстрат трипсиновой активности + 26S-протеасома
 T-L+26S+MG132 – пептидный субстрат трипсиновой активности + 26S-протеасома +
 протеасомный ингибитор химотрипсин-подобной активности MG132
 Снизу - график каспаз-подобной активности 26S-протеасомы
 C-L+26S – пептидный субстрат каспазной активности + 26S-протеасома
 C-L+26S+MG132 – пептидный субстрат каспазной активности + 26S-протеасома +
 протеасомный ингибитор химотрипсин-подобной активности MG132

3.2. MS/MS-анализ посттрансляционных модификаций клеточных протеасом

Полученные пробы клеточных 26S-протеасом были разделены с помощью двумерного электрофореза. Видимые электрофоретические зоны, соответствующие белкам 20S-протеасомы, были вырезаны из полиакриламидного геля и подвергнуты MALDI MS/MS-анализу. По результатам MS/MS-анализа были идентифицированы все 14 субъединиц 20S-корового комплекса и регуляторная субъединица PA28 β (Рис. 6). Как можно увидеть на рис. 6, несколько «пятен» на электрофореграмме соответствовали одному протеасомному белку, как например, $\alpha 6$, $\alpha 7$ или $\beta 4$, что предполагает присутствие посттрансляционных модификаций белков. Однако в результате MS-анализа были идентифицированы только 3 сайта N-концевого ацетилирования на трех субъединицах протеасом и 4 сайта окисления у четырех субъединиц (Табл. 4). В силу неудовлетворительного количества обнаруженных посттрансляционных модификаций, вызванного неспособностью подбора оптимальных условий для MS/MS-анализа протеасом, далее нами был применен MS-анализ для идентификации посттрансляционных модификаций клеточных и внеклеточных протеасом.

Таблица 4 – Посттрансляционные модификации клеточной 26S-протеасомы, обнаруженные с помощью MS/MS-анализа

Название белка	Название гена	А.к.	Последовательность пептида
В клетке			
N-концевое ацетилирование			
$\alpha 7$	<i>PSMA3</i>	S2	acetyl- SSIGTGYDLSASTFSPDGR
$\beta 3$	<i>PSMB3</i>	S2	acetyl- SIMSYNGGAVMAMK
$\beta 4$	<i>PSMB2</i>	M1	acetyl- MEYLIGIQGPDYVLVASDR
Окисление			
$\alpha 2$	<i>PSMA2</i>	M79	HIGLVYSGMGPDYR
$\alpha 7$	<i>PSMA3</i>	M76	HVGMAVAGLLADAR
$\beta 6$	<i>PSMB1</i>	M186	NMQNVEHVPLSLDR
$\beta 7$	<i>PSMB4</i>	W136	AIHSWLTR

3.3. МС-анализ посттрансляционных модификаций протеасом

Схема эксперимента МС-анализа белков протеасом представлена на рис 7. Белки очищенных аффинным способом клеточных и внеклеточных протеасом были разделены с помощью SDS-PAGE электрофореза. Гель визуализировали окраской Кумасси G250. Видимые электрофоретические зоны, соответствующие белкам внутриклеточных и внеклеточных протеасомных комплексов, были вырезаны из полиакриламидного геля и подвергнуты FT-ICR МС-анализу (Рис. 7).

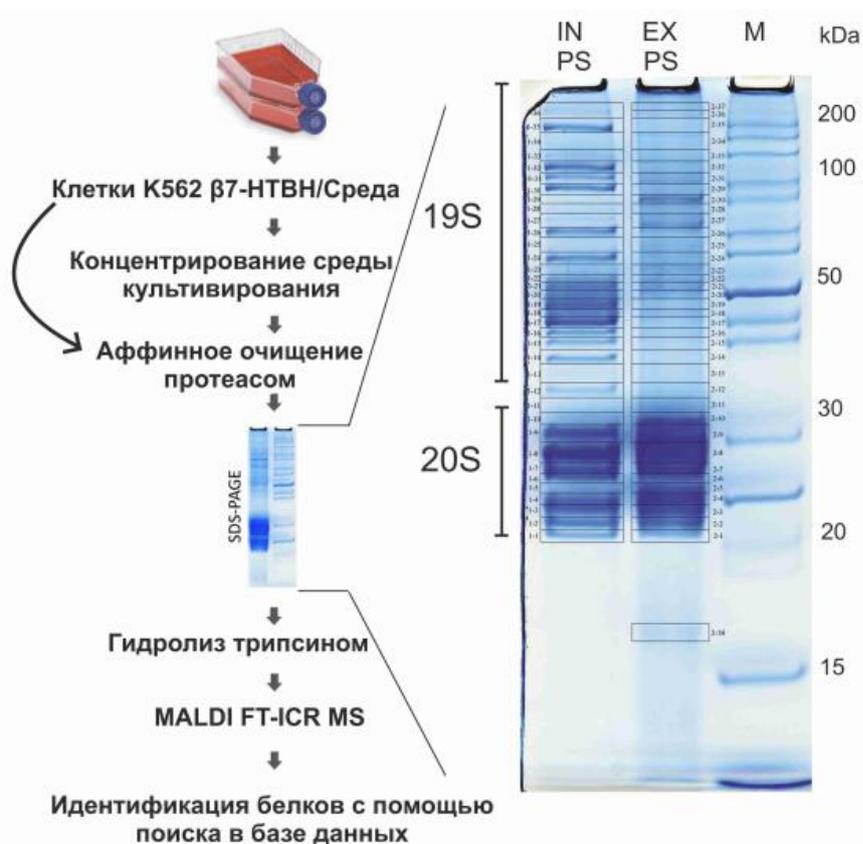


Рисунок 7 – Схема этапов эксперимента, включая очистку протеасом из клеток и среды культивирования, разделение протеасомных белков в SDS-PAGE и МС-анализ подготовленных проб

При МС-анализе было использовано 2 биологических повтора, по несколько технических повторов в каждом. Была использована точность измерения пептидов 5 ppm. Сайты посттрансляционных модификаций с помощью пептидного фингерпринтинга устанавливались только в том случае, если они присутствовали в обоих биологических повторах. При помощи метода пептидного фингерпринтинга были идентифицированы все 14 субъединиц 20S-корового комплекса: 7 α -субъединиц и 7 β -субъединиц, а также 55 посттрансляционных модификаций у клеточных и 31 – у внеклеточных протеасом.

Полный табличный список и карта расположения сайтов посттрансляционных модификаций клеточных и внеклеточных протеасом приведены в приложении. Из этого списка, соответственно, 36 и 21 посттрансляционных модификаций идентифицированы нами впервые. Наиболее распространенными среди обнаруженных нами посттрансляционных модификаций оказались фосфорилирование и ацетилирование: 25 и 23 сайтов у клеточных, 16 и 11 сайтов у внеклеточных протеасом, соответственно. Менее распространенными оказались ацетилирование и сукцинирование (Табл 5-6, Рис. 8).

Таблица 5 – Общий список посттрансляционных модификаций клеточных и внеклеточных протеасом

Посттрансляционные модификации клеточных протеасом	Количество сайтов	Посттрансляционные модификации внеклеточных протеасом	Количество сайтов
Фосфорилирование	25	Фосфорилирование	16
Убиквитинирование	5	Убиквитинирование	3
Ацетилирование	23	Ацетилирование	11
Сукцинирование	2	Сукцинирование	1
Всего:	55	Всего:	31

Таблица 6 – Количество субъединиц протеасом с различными типами посттрансляционных модификаций

Посттрансляционные модификации клеточных протеасом	Количество	Посттрансляционные модификации внеклеточных протеасом	Количество
Фосфорилированные субъединицы	10	Фосфорилированные субъединицы	8
Убиквитинированные субъединицы	2	Убиквитинированные субъединицы	2
Ацетилированные субъединицы	11	Ацетилированные субъединицы	7
Сукцинированные субъединицы	2	Сукцинированные субъединицы	1
Количество субъединиц:	14	Количество субъединиц:	14

Чтобы выявить кандидатов в список специфических для внеклеточных протеасом посттрансляционных модификаций, листы посттрансляционных модификаций внеклеточных протеасом сравнили с листами модификаций клеточных комплексов. В результате такого анализа были получены несколько модификаций, присутствие которых потом проверяли в первоначальных списках посттрансляционных модификаций клеточных протеасом. Целью такого поиска стало предположение, что какие-то модификации могли не войти в списки только потому, что они не повторялись и были

исключены, как статистически недостоверные. Однако для поиска кандидатов в специфические для внеклеточных протеасом посттрансляционных модификаций этот аспект был критическим. В результате такого поиска фосфорилирование по серину в 181-м положении в субъединице $\beta 3$ (*PSMB3*) нами обнаружено впервые и было выделено как кандидат на внесение в список посттрансляционных модификаций, специфических для внеклеточных протеасом, с целью дальнейшего анализа роли этой модификации в транспорте протеасом во внеклеточное пространство.

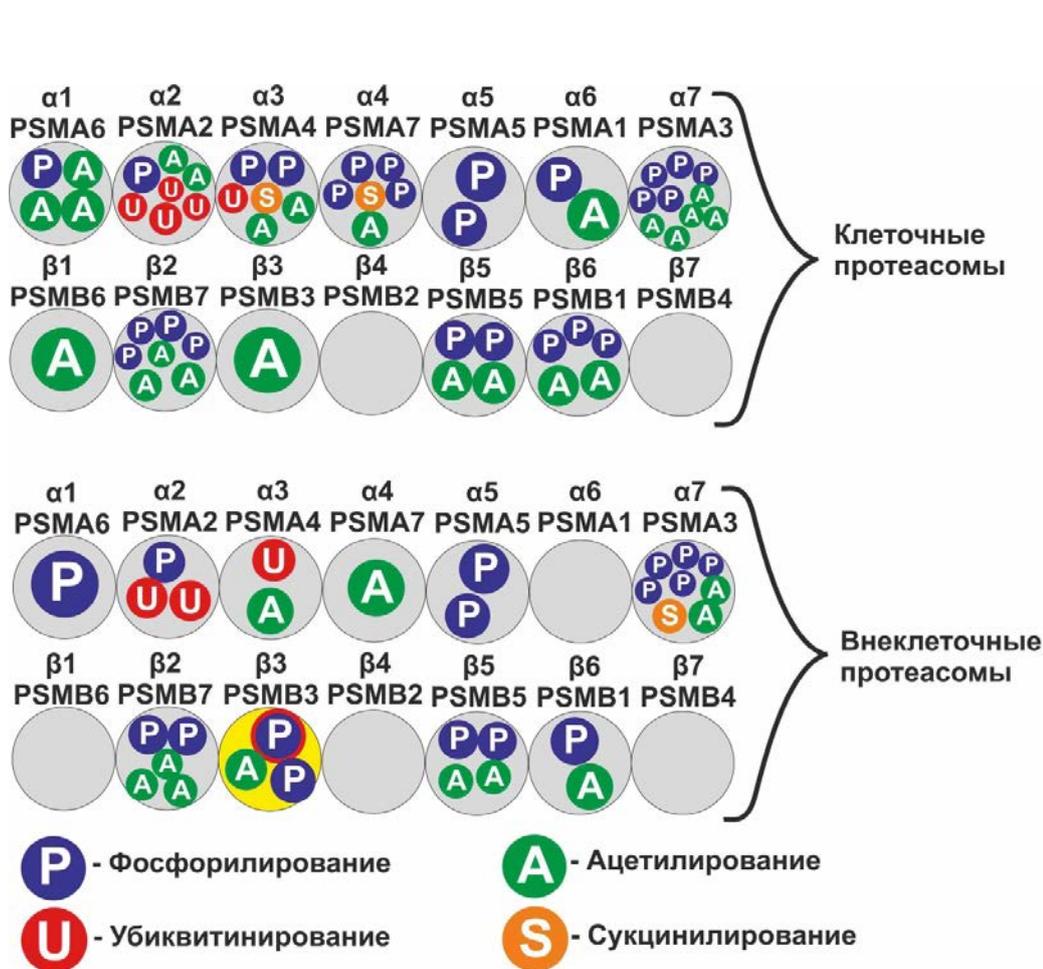


Рисунок 8 – Расположение обнаруженных посттрансляционных модификаций по субъединицам клеточных и внеклеточных протеасом

3.4. Нокаут гена протеасомы *PSMB3*

Чтобы исследовать роль фосфорилирования по серину в 181-м положении в субъединице $\beta 3$ (*PSMB3*) в транспорте протеасом во внеклеточное пространство, было принято решение использовать технологию CRISPR/Cas9 для нокаута гена *PSMB3* на примере линии клеток HeLa с целью ее дальнейшего замещения мутантным геном с точечной нуклеотидной заменой, приводящей к аминокислотной замене по сайту фосфорилирования серина в 181-м положении субъединицы $\beta 3$ (*PSMB3*).

Для этого были подобраны специфические последовательности гид-РНК, комплементарных экзону 2 и экзону 3 гена *PSMB3*, которые были заклонированы в плазмиду рХ330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (addgene # 42230 Feng Zhang Lab) (Рис. 11). Полученные плазмиды были доставлены в клетки HeLa трансфекцией с использованием раствора TurboFect (ThermoFisher Scientific), что позволило добиться эффективность трансфекции около 60-70 %.

С целью получения популяций клеток, несущих в себе плазмиду с CRISPR/Cas9 системой, был проведен сортирование клеток с помощью S3e™ Cell Sorter (BioRad, США) по зеленому флуоресцентному сигналу на GFP-положительные клетки и GFP-отрицательные клетки, т.е. клетки, не получившие плазмиду. Трансфекция клеток HeLa плазмидами с последовательностями гидовых РНК системы CRISPR/Cas9, комплементарных по экзону 2 и экзону 3 гена *PSMB3* привело к резкому уменьшению популяции живых клеток уже через 36 часов после постановки трансфекции – 18 и 25% от общего количества, соответственно. В то же время, в результате трансфекции клеток плазмидой с отрицательным контролем CRISPR/Cas9 количество живых клеток составило 38% от общего количества (Рис. 9). Такую массовую гибель клеток можно соотнести только с нокаутом критического для жизнеспособности клеток гена. Очевидно, что протеасомы являются важной для клеток компонентой, нарушения в работе протеасом сопряжены с развитием различных патологий (Adams, 2004). Была отсортирована небольшая часть живых GFP-положительных клеток, как мы предполагаем, нокаутированных только по одному аллелю гена *PSMB3* (Рис.10).

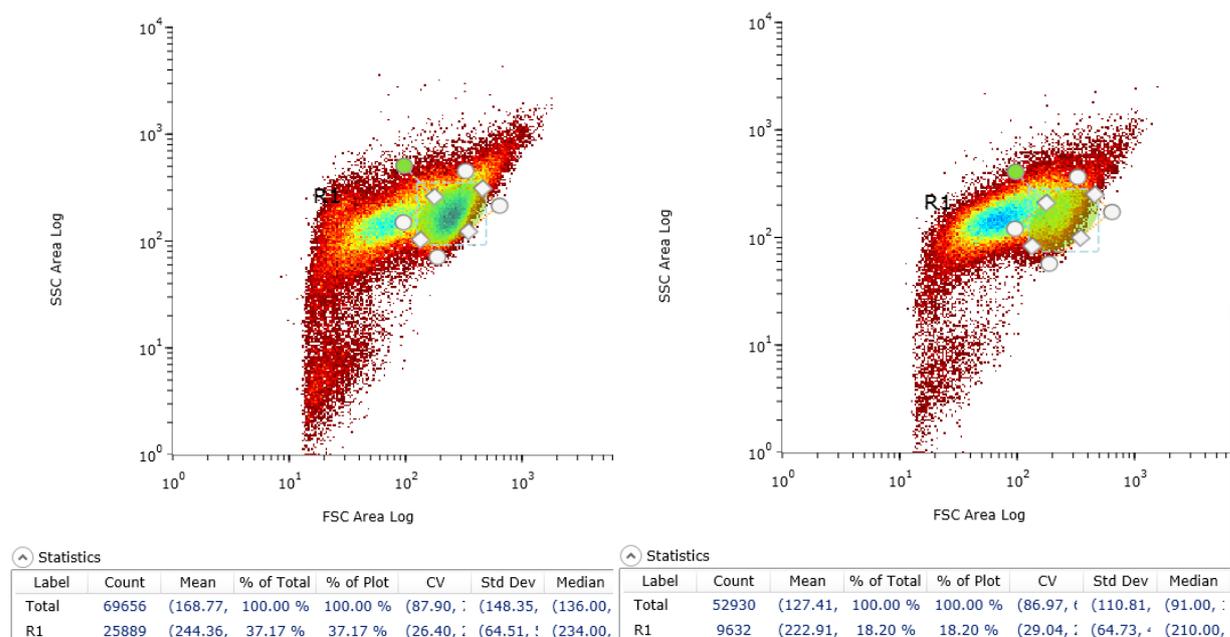


Рисунок 9 – Анализ клеточных популяций HeLa, трансформированных плазмидой с отрицательным контролем системы CRISPR/Cas9 и с последовательностью гид-РНК системы CRISPR/Cas9, комплементарной последовательности экзона 2 гена *PSMB3* с помощью S3e™ Cell Sorter. R1-популяция жизнеспособных клеток. Count-количество. % of Total - % от общего количества

В силу резкого снижения пролиферативной способности и жизнеспособности клеток HeLa было принято решение сначала внести в клетки мутантный и контрольный экзогены, а потом провести нокаут эндогена с помощью технологии CRISPR/Cas9. Анализ нокаута гена в клетках часто проводят с помощью вестерн-блот анализа со специфическими для кодируемого этим геном продукта антителами. Однако после внесения экзогена станет затруднительно оценивать проведенный нокаут эндогена, если только они не будут иметь отличия в массе, которые будут заметны при верификации нокаута вестерн-блоттингом. С другой стороны добавлять дополнительную последовательность к экзогену с целью изменения его массы также может иметь нежелательные последствия. Поэтому было принято решение внести в клетки мутантный и контрольный экзоген в составе доксициклин-регулируемой системы tTR-KRAB с целью дальнейшего нокаута гена *PSMB3* дикого типа.

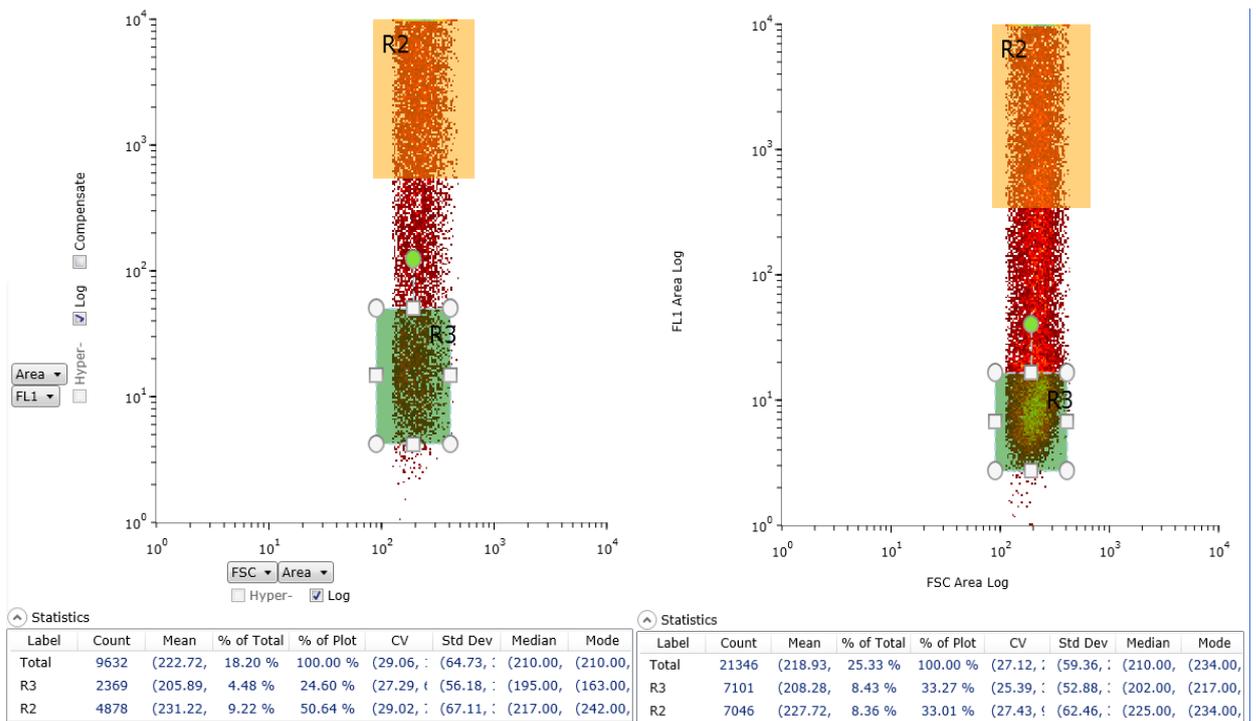


Рисунок 10 – Результат сортировки HeLa Exon 2- (слева) и Exon 3- (справа) с помощью S3e™ Cell Sorter. R2 – GFP-положительные клетки, которые несут в себе плазмиду с CRISPR/Cas9 системой, R3 – GFP-отрицательные клетки, не получившие плазмиду. Count-количество. % of Total - % от общего количества

3.5. Получение доксициклин-регулируемой клеточной линии K562

Поэтому следующим шагом стало получение доксициклин-регулируемых клеточных линий K562 и HeLa с контрольным и мутантным экзогенными белками $\beta 3$ (*PSMB3*). Используемая система tTR-KRAB состоит из респонсивной плазмиды, содержащей экзоген под контролем оператора tetO, а также регуляторной плазмиды, содержащей репрессор tTR-KRAB, который конститутивно связывается с tetO, подавляя экспрессию экзогена. При этом добавленный в среду культивирования доксициклин связывается с tTR-KRAB, тем самым позволяя добиться контролируемой экспрессии экзогена. Полученная линия клеток, культивируемая в присутствии доксициклина, нокаутируется по гену дикого типа *PSMB3*, оставляя только экспрессию экзогена (Рис. 11).

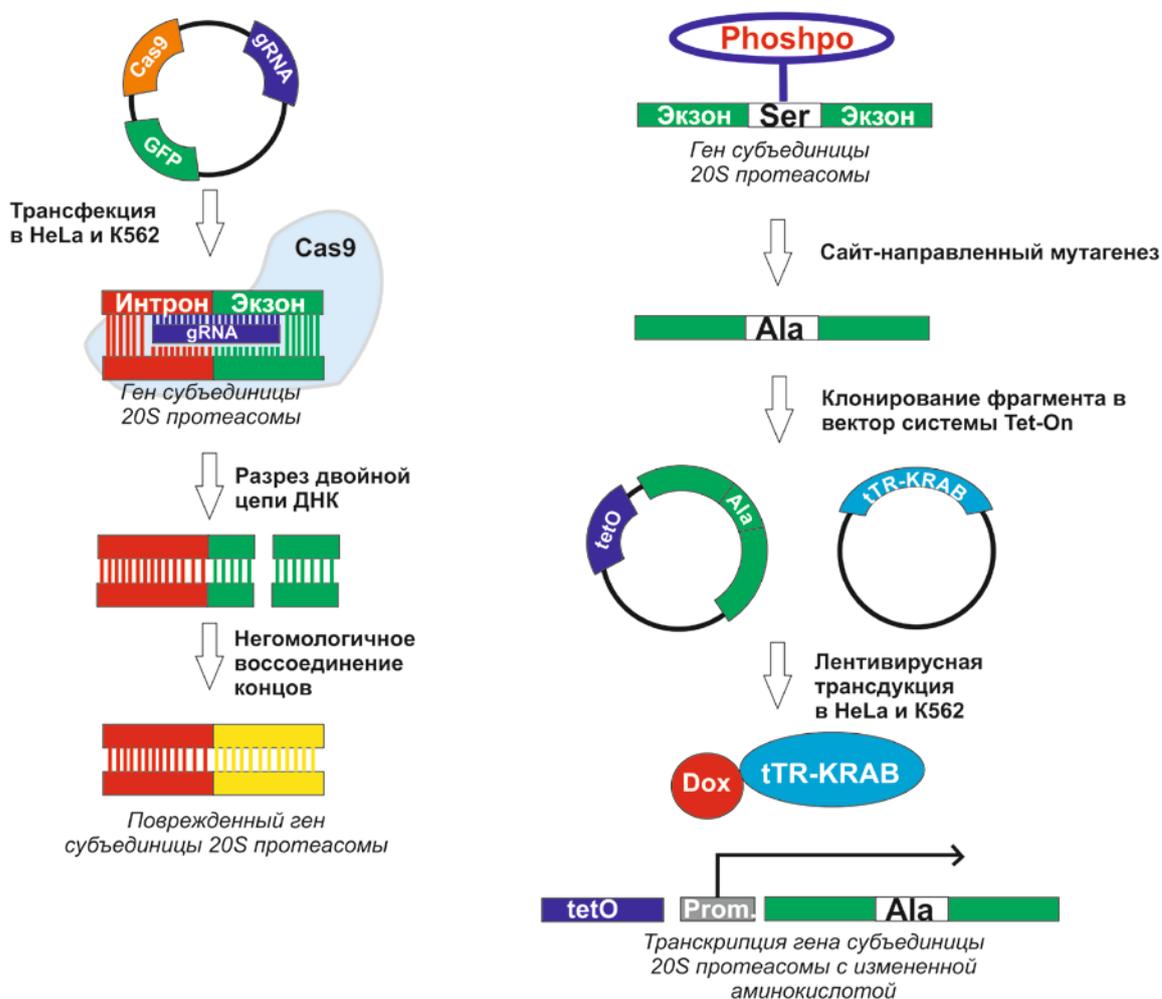


Рисунок 11 – Схема получения с помощью tTRKrab системы и метода CRISPR/Cas9 линии клеток K562, стабильно экспрессирующей субъединицу протеасомы с точечной аминокислотной заменой в сайте посттрансляционной модификации, специфической для внеклеточных протеасом

Для создания мутантного белка $\beta 3$ была проведена однонуклеотидная замена с помощью ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза, приводящая к замене серина в 181-м положении на аланин в нуклеотидной последовательности гена *PSMB3* (Рис. 12). Успешность сайт-направленного мутагенеза была подтверждена с помощью секвенирования.

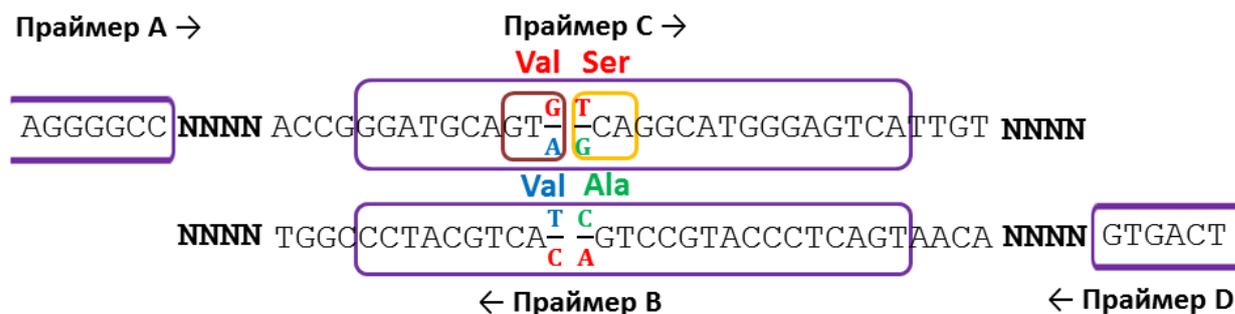


Рисунок 12 – Схематическое отображение ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза в гене *PSMB3* протеасомы человека. Красным цветом выделены исходные последовательности и аминокислоты. Голубым цветом выделена сайленс-мутация.

Зеленым цветом выделена точечная мутация, приводящая к замене серина в 181-м положении на аланин.

Кодирующая последовательность гена *PSMB3* дикого типа, полученная из кДНК, а также последовательность гена *PSMB3*, содержащая мутацию, были по отдельности вставлены в респонсивную плазмиду pLVTHM-T7-Puro системы tTR-KRAB по сайтам рестрикции *AscI* и *SpeI*. При этом последовательность экзогена была помечена по N-терминальному концу последовательностью эпитопа T7, для дальнейшей верификации экспрессии гена с помощью вестерн-блоттинга.

Затем были последовательно проведены ко-трансфекция клеток HEK293, сборка вирусных частиц и инфекция клеток K562 и HeLa. Сборка вирусных частиц была произведена в клетках HEK293 после одновременной трансфекции в них регуляторной плазмиды pLVCT-tTR-KRAB, содержащей репрессор tTR-KRAB и ген устойчивости к бластицидину, а также дополнительных плазмид MD2 и PAX, необходимых для экспрессии вирусной полимеразы и белков оболочки. Селекция клеток была проведена с помощью бластицидина в концентрации 10 мкг/мл в течение 14 дней. Клетки, прошедшие селекцию по бластицидину, аналогичным образом для получения контрольной линии по гену *PSMB3* были трансдуцированы респонсивной плазмидой, содержащей последовательность экзогена и оператора tetO. Селекция была проведена с помощью пурамицина в концентрации 1 мкг/мл в течение 7 дней. Нам удалось получить линию

клеток K562, которая, как мы предполагали, синтезировала репрессор tTR-KRAB и белок протеасомы $\beta 3$. Клетки культивировали в течение 48 часов в отсутствии и присутствии в среде доксициклина в концентрации 0.1 мкг/мл. Синтез экзогенного белка и правильность размера продукта были подтверждены с помощью вестерн-блота с помощью антител к эпитопу T7 и субъединице протеасомы $\beta 3$ (*PSMB3*) (Рис. 13). Неожиданностью для нас стал тот факт, что синтез экзогенного белка протеасомы $\beta 3$ был идентифицирован также и в клетках, культивированных в отсутствии доксициклина, что предполагает неэффективность первичной трансдукции регуляторной плазмидой pLVCT-tTR-KRAB и/или селекции клеток с помощью бластицидина.

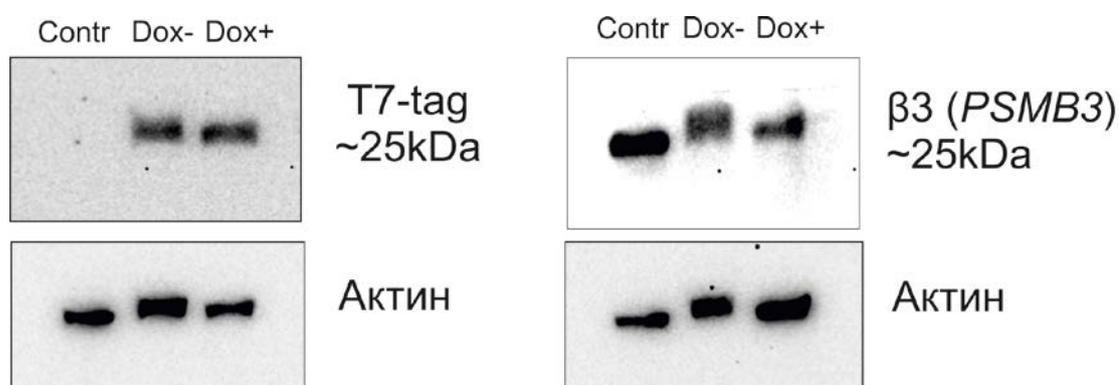


Рисунок 13 – Вестерн-блот анализ в клетках K562 по антителам на таг-T7 и субъединицу протеасомы $\beta 3$ (*PSMB3*). Contr – контрольные клетки K562. Dox (-) – клеточная линия K562 с контрольным экзогеном $\beta 3$ (*PSMB3*), культивированная в отсутствии доксициклина в среде. Dox (+) – клеточная линия K562 с контрольным экзогеном $\beta 3$ (*PSMB3*), культивированная в присутствии доксициклина в среде.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

В этой работе для выделения 26S-протеасомы была использована ранее полученная линия клеток миелогенной лейкемии человека K562, стабильно экспрессирующая генетическую конструкцию, кодирующую субъединицу протеасом человека $\beta 7$ (PSMB4) слитую на С-конце со сложным полипептидом НТВН (Н – последовательность из шести гистидинов, Т – сайт расщепления TEV-протеазой, В – сайт биотинилирования *in vivo*) (Artamonova et al., 2014). НТВН-тэг первоначально происходит от НВ-тэга, который использовался для выделения белков в дрожжах в условиях полной денатурации (Guerrero et al., 2006, Tagwerker et al., 2006). Пептид НТВН позволял нам очищать протеасомы благодаря их связыванию со стрептавидиновым носителем за счет биотинилированного фрагмента пептида и последующего элюирования с носителя с помощью TEV-протеазы.

Данная стратегия очистки требует меньшего стартового материала и затраты времени по сравнению с методами очистки протеасом дрожжей, использующих другие аффинные теги (Guerrero et al., 2006, Verma et al., 2000, Leggett et al., 2002). Так, нам из клеток K562, культивированных в одном литре питательной среды до достижения конfluence, удавалось выделить до 200 мкг протеасом в течение двух дней, которых могло быть достаточно для двух технических повторов МС-анализа. При этом концентрация выделенных проб достигала 0,5 – 4 мкг/мкл. Проведенные нами анализы протеолитической активности и картина электрофоретических зон при SDS-электрофорезе (Рис. 3-5) свидетельствовали об интактности выделенных протеасом и об отсутствии влияния пептида НТВН в комплексе с $\beta 7$ на пептидазную активность протеасом.

Впервые для очищения 26S-протеасом человека данная стратегия была использована Wang и др. путем слияния субъединицы протеасомы 19S-комплекса Rpn11 по С-концу с пептидом НТВН (Wang et al., 2007). До этого для выделения протеасомных комплексов млекопитающих в основном использовались традиционные методы хроматографии (Huang, Burlingame, 2005, Schmidt et al., 2006, Zong et al., 2006, Gomes et al., 2006) и иммуноаффинные стратегии очищения (Froment et al., 2005, Claverol et al., 2002) с использованием специфических антител к субъединицам. Несмотря на эффективность, традиционные методы хроматографии требуют большого количества материала и времязатратны, в то время как использование иммуноаффинного очищения затрудняет дальнейшие операции из-за наличия антител в пробе и жестких условий элюции.

С использованием МС/МС анализа нам не удалось добиться детекции приемлемого количества посттрансляционных модификаций (Табл. 4). Мы предполагаем, что из-за

неоптимальных условий фрагментации основных ионов при проведении МС/МС анализа происходил отрыв посттрансляционных модификаций от аминокислот. Особенно сильно подвержено такому исходу событий фосфорилирование, для изучения которого часто применяют методы обогащения фосфопептидов (Kimura et al., 2010, Kinoshita et al., 2008), которые в нашей работе использованы не были. Поэтому далее нами был применен MALDI-FT МС-анализ для идентификации посттрансляционных модификаций клеточных и внеклеточных протеасом.

При помощи МС-анализа нами были идентифицированы все 14 субъединиц 20S-корового комплекса: 7 α -субъединиц и 7 β -субъединиц; а также 55 посттрансляционных модификаций у клеточных и 31 – у внеклеточных протеасом. Полный табличный список и карта расположения сайтов посттрансляционных модификаций клеточных и внеклеточных протеасом приведены в приложении. Из этого списка, соответственно, 36 и 21 посттрансляционных модификаций идентифицированы нами впервые. Наиболее распространенными среди обнаруженных нами посттрансляционных модификаций оказались фосфорилирование и ацетилирование: 25 и 23 сайтов у клеточных, 16 и 11 сайтов у внеклеточных протеасом, соответственно. Менее распространенными оказались убиквитинирование и сукцинирование (Табл 5-6, Рис. 8).

На сегодняшний день идентифицированы 63 сайта убиквитинирования в 20S-протеасоме из сердечной ткани человека и одновременно выявлены 65 сайтов ацетилирования (Zong et al., 2014). 39 сайтов в числе обнаруженных перекрывались, в результате чего было высказано предположение о том, что функция протеасом регулируется конкуренцией между убиквитинированием и ацетилированием. Интересно, что в субъединице $\alpha 3$ (*PSMA4*) в обеих популяциях протеасом нами был обнаружен перекрестный сайт убиквитинирования и ацетилирования по лизину в 222-м аминокислотном положении, который ранее не был описан в литературе. К сожалению, количество идентифицированных сайтов убиквитинирования в нашей работе было недостаточно для изучения конкуренции убиквитинирования и ацетилирования за сайты модификации.

Из всех изученных посттрансляционных модификаций наиболее хорошо охарактеризовано фосфорилирование, которое играет важную роль в сборке комплекса 26S-протеасомы (Bose et al., 2004, Satoh et al., 2001), регулирует каталитическую активность (Iwafune et al., 2002) и внутриклеточную локализацию протеасом (Bingol et al., 2010). По результатам МС-анализа 10 из 14 субъединиц клеточных, а также 8 из 14 у внеклеточных 20S-протеасом оказались фосфорилированными, причем 18 сайтов у клеточных, и 13 сайтов у внеклеточных протеасом ранее не были описаны.

Функциональная активность ни одного обнаруженного нами сайта фосфорилирования ранее не была описана. Фосфорилирование по серину в 181-м положении в субъединице $\beta 3$ (*PSMB3*) нами обнаружено впервые и было выделено как кандидат на внесение в список посттрансляционных модификаций, специфических для внеклеточных протеасом, с целью дальнейшего анализа роли этой модификации в транспорте протеасом во внеклеточное пространство.

Для исследования роли фосфорилирования по серину в 181-м положении в субъединице $\beta 3$ (*PSMB3*) в транспорте протеасом во внеклеточное пространство, было принято решение использовать технологию CRISPR/Cas9 для нокаута гена *PSMB3* на примере линии клеток HeLa с целью ее дальнейшего замещения мутантным геном с точечной нуклеотидной заменой, приводящей к аминокислотной замене по сайту фосфорилирования серина в 181-м положении субъединицы $\beta 3$ (*PSMB3*). Для системы CRISPR-Cas9 были подобраны оригинальные последовательности гид-РНК для экзона 2 и экзона 3 гена *PSMB3* протеасомы (Табл. 3). Принимались во внимание активность гид-РНК, высчитываемая по алгоритму Донча (Doench et al., 2016), а также off-target активность (сайт-специфичность), высчитываемая по алгоритму Сюй (Hsu et al., 2013) во избежание неспецифичной активности системы CRISPR/Cas9 (Табл. 3). Так как время полужизни протеасомы составляет 8-12 дней (Tanaka, Ichihara, 1989), мы предполагали, что после проверки нокаута возможно будет внести в клетки “спасительный” контрольный и мутантный экзоген *PSMB3* и произвести селекцию на пурамицине в течение недели. Однако, трансфекция клеток HeLa плазмидами с последовательностями гидовых РНК системы CRISPR/Cas9, комплементарных по экзону 2 и экзону 3 гена *PSMB3* привела к резкому уменьшению популяции живых клеток уже через 36 часов после трансформации - 18 и 25% от общего количества, соответственно. В то же время, в результате трансформации плазмидой с отрицательным контролем CRISPR/Cas9 количество живых клеток составило 38% от общего количества (Рис. 9). Была отсортирована небольшая часть живых GFP-положительных клеток, как мы предполагаем, нокаутированных только по одному аллелю гена *PSMB3* (Рис.10). Интересно отметить, что использование гид-РНК на экзон 2 гена *PSMB3* привело к большей смертности клеток HeLa, чем использование гид-РНК на экзон 3, что скорее всего вызвано большей эффективностью гид-РНК, нацеленных на начало кодирующей части гена. В силу резкого снижения пролиферативной способности и жизнеспособности клеток HeLa нами было принято решение сперва вносить в клетки мутантный и контрольный экзоген в составе доксициклин-регулируемой системы tTR-KRAB с целью дальнейшего нокаута гена *PSMB3* дикого типа. Так как субъединица $\beta 3$ (*PSMB3*) не процессируется по N-концу в

процессе сборки протеасомы, в отличие от некоторых β -субъединиц, это нам позволило присоединить по его N-концу последовательность эпитопа T7 (Huber et al., 2016).

Tet-Off (Gossen, Bujard, 1992) и Tet-On (Gossen, Bujard, 1995) системы экспрессии генов позволяют осуществлять регулируемую высокую степень экспрессии гена. В случае Tet-Off системы экспрессия гена включается, когда тетрациклин или доксициклин убираются со среды культивирования клеток. При использовании Tet-On системы, наоборот, экспрессия гена включается при добавлении в среду доксициклина. Максимальные уровни экспрессии генов в Tet системах являются очень высокими и сравнимы с сильными конститутивными промоторами млекопитающих, таких как CMV (Yin et al., 1996). В отличие от других индуцибельных экспрессионных систем у млекопитающих, регуляция гена в Tet-системах высокоспецифична, поэтому интерпретация результатов не усложняется плейотропным эффектом или неспецифической индукцией.

Использованная нами Tet-On-система tTR-KRAB состоит из респонсивной плазмиды, содержащей экзоген под контролем оператора tetO, а также регуляторной плазмиды, содержащей репрессор tTR-KRAB, который конститутивно связывается с tetO, подавляя экспрессию экзогена. При этом добавленный в среду культивирования доксициклин связывается с tTR-KRAB, тем самым позволяя добиться контролируемой экспрессии экзогена. Мы планировали полученные линии клеток, культивируемые в присутствии доксициклина, нокаутировать по гену дикого типа *PSMB3*, оставляя только экспрессию экзогена. При этом нам удалось получить линию клеток K562, которая, как мы предполагали, синтезировала репрессор tTR-KRAB и белок протеасомы $\beta 3$, и культивировали ее в течение 48 часов в отсутствии и присутствии в среде доксициклина в концентрации 0.1 мкг/мл. Синтез экзогенного белка и правильность размера продукта были подтверждены с помощью вестерн-блота с помощью антител к эпитопу T7 и субъединице протеасомы $\beta 3$ (*PSMB3*) (Рис. 13).

Неожиданностью для нас стал тот факт, что синтез экзогенного белка протеасомы $\beta 3$ был идентифицирован также и в клетках, культивированных в отсутствие доксициклина, что предполагает неэффективность первичной трансдукции регуляторной плазмидой pLVCT-tTR-KRAB, селекции клеток на бластицидине или недостаточной экспрессии гена tTR-KRAB. Тем не менее, полученная линия клеток K562, стабильно экспрессирующая генетическую конструкцию, кодирующую субъединицу протеасом $\beta 3$ (*PSMB3*) слитую на N-конце с последовательностью T7, а также апробированные на клетках HeLa плазмидные конструкции pX330 системы CRISPR/Cas9 в будущем позволят нам получить линии клеток HeLa, стабильно экспрессирующих нормальную и, созданную

нами, мутантную последовательности для исследования роли фосфорилирования по серину в 181-м положении в субъединице $\beta 3$ (*PSMB3*) в транспорте протеасом во внеклеточное пространство.

ВЫВОДЫ

1. С помощью масс-спектрометрического анализа идентифицированы 55 посттрансляционных модификаций у клеточных и 31 – у внеклеточных протеасом, аффинно-очищенных из клеток K562 и кондиционированной клетками среды. Из списка выявленных посттрансляционных модификаций клеточных и внеклеточных протеасом, соответственно, 36 и 21 идентифицированы нами впервые.
2. По результатам МС-анализа фосфорилирование по серину в 181-м положении в субъединице $\beta 3$ (*PSMB3*) нами обнаружено впервые и потенциально является специфичной посттрансляционной модификацией для внеклеточных протеасом.
3. Получены и апробированы плазмидные конструкции рX330 системы CRISPR/Cas9, содержащие последовательности гид-РНК, нацеленные на второй и третий экзоны гена субъединицы $\beta 3$ (*PSMB3*) протеасомы с целью дальнейшего нокаута по гену *PSMB3* доксициклин-регулируемых клеточных линий.
4. Получена линия клеток K562, стабильно экспрессирующая генетическую конструкцию, кодирующую субъединицу протеасом $\beta 3$ (*PSMB3*) слитую на N-конце с последовательностью T7, с целью дальнейшего получения линий клеток HeLa, стабильно экспрессирующих нормальную и, созданную нами, мутантную последовательности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа выполнена на базе лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток Института цитологии РАН.

Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю к.б.н., ст.н.с. Голубковой Е.В. (кафедра генетики Биологического факультета СПбГУ), куратору к.б.н. ст.н.с. Цимохе А.С. (Институт цитологии РАН); коллегам из лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток Института цитологии РАН: заведующему лаборатории член.-корр. РАН, д.б.н. Томилину А.Н., Бахмету Е.И., Кузьмину А.А., Старковой Т.Ю., Скворцовой Е.В., Селениной А.В., Ивановой Е.Ю. а также Артамоновой Т.О., Ходорковскому М.А. из НИК «НаноБио» СПбГПУ.

Также я хочу поблагодарить преподавателей и сотрудников кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ за предоставление актуальных знаний и поддержку данной работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (№16-14-10343), Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№№18-04-01168, 15-04-08128).

ЛИТЕРАТУРА

1. Maupin-Furlow J. A., Humbard M. A., Kirkland P. A., Li W., Reuter C. J., Wright A. J., Zhou G. Proteasomes from structure to function: perspectives from Archaea // *Curr Top Dev Biol.* – 2006. – Т. 75. – С. 125-69.
2. Wada M., Kosaka M., Saito S., Sano T., Tanaka K., Ichihara A. Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiologic significance // *J Lab Clin Med.* – 1993. – Т. 121, № 2. – С. 215-23.
3. Roth G. A., Moser B., Krenn C., Roth-Walter F., Hetz H., Richter S., Brunner M., Jensen-Jarolim E., Wolner E., Hoetzenecker K., Boltz-Nitulescu G., Ankersmit H. J. Heightened levels of circulating 20S proteasome in critically ill patients // *Eur J Clin Invest.* – 2005. – Т. 35, № 6. – С. 399-403.
4. Egerer K., Kuckelkorn U., Rudolph P. E., Ruckert J. C., Dorner T., Burmester G. R., Kloetzel P. M., Feist E. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases // *J Rheumatol.* – 2002. – Т. 29, № 10. – С. 2045-52.
5. Stoebner P. E., Lavabre-Bertrand T., Henry L., Guiraud I., Carillo S., Dandurand M., Joujoux J. M., Bureau J. P., Meunier L. High plasma proteasome levels are detected in patients with metastatic malignant melanoma // *Br J Dermatol.* – 2005. – Т. 152, № 5. – С. 948-53.
6. Lavabre-Bertrand T., Henry L., Carillo S., Guiraud I., Ouali A., Dutaud D., Aubry L., Rossi J. F., Bureau J. P. Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies // *Cancer.* – 2001. – Т. 92, № 10. – С. 2493-500.
7. Budenholzer L., Cheng C. L., Li Y., Hochstrasser M. Proteasome Structure and Assembly // *J Mol Biol.* – 2017. – Т. 429, № 22. – С. 3500-3524.
8. Tanaka K. The proteasome: overview of structure and functions // *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* – 2009. – Т. 85, № 1. – С. 12-36.
9. Dahlmann B. Proteasomes // *Essays Biochem.* – 2005. – Т. 41. – С. 31-48.
10. Voges D., Zwickl P., Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis // *Annu Rev Biochem.* – 1999. – Т. 68. – С. 1015-68.
11. Lowe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W., Huber R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution // *Science.* – 1995. – Т. 268, № 5210. – С. 533-9.
12. Groll M., Ditzel L., Lowe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H. D., Huber R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution // *Nature.* – 1997. – Т. 386, № 6624. – С. 463-71.

13. Seemuller E., Lupas A., Stock D., Lowe J., Huber R., Baumeister W. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease // *Science*. – 1995. – T. 268, № 5210. – C. 579-82.
14. Coux O., Tanaka K., Goldberg A. L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes // *Annu Rev Biochem*. – 1996. – T. 65. – C. 801-47.
15. Groll M., Bochtler M., Brandstetter H., Clausen T., Huber R. Molecular machines for protein degradation // *Chembiochem*. – 2005. – T. 6, № 2. – C. 222-56.
16. Groettrup M., Khan S., Schwarz K., Schmidtke G. Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? // *Biochimie*. – 2001. – T. 83, № 3-4. – C. 367-72.
17. Raynes R., Pomatto L. C., Davies K. J. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways // *Mol Aspects Med*. – 2016. – T. 50. – C. 41-55.
18. Unno M., Mizushima T., Morimoto Y., Tomisugi Y., Tanaka K., Yasuoka N., Tsukihara T. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution // *Structure*. – 2002. – T. 10, № 5. – C. 609-18.
19. Groll M., Brandstetter H., Bartunik H., Bourenkow G., Huber R. Investigations on the maturation and regulation of archaeobacterial proteasomes // *J Mol Biol*. – 2003. – T. 327, № 1. – C. 75-83.
20. Glickman M. H., Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction // *Physiol Rev*. – 2002. – T. 82, № 2. – C. 373-428.
21. Kohler A., Cascio P., Leggett D. S., Woo K. M., Goldberg A. L., Finley D. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release // *Mol Cell*. – 2001. – T. 7, № 6. – C. 1143-52.
22. Glickman M. H., Rubin D. M., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Baumeister W., Fried V. A., Finley D. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3 // *Cell*. – 1998. – T. 94, № 5. – C. 615-23.
23. Shi Y., Chen X., Elsasser S., Stocks B. B., Tian G., Lee B. H., Shi Y., Zhang N., de Poot S. A., Tuebing F., Sun S., Vannoy J., Tarasov S. G., Engen J. R., Finley D., Walters K. J. Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome // *Science*. – 2016. – T. 351, № 6275.
24. Verma R., Aravind L., Oania R., McDonald W. H., Yates J. R., 3rd, Koonin E. V., Deshaies R. J. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome // *Science*. – 2002. – T. 298, № 5593. – C. 611-5.

25. Yao T., Cohen R. E. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome // *Nature*. – 2002. – Т. 419, № 6905. – С. 403-7.
26. Селенина А. В., Цимоха А. С., Томилин А. Н. Протеасомы в регуляции белкового гомеостаза плюрипотентных стволовых клеток // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). – 2017. – Т. 9, № 3(34). – С. 42-50.
27. Saeki Y. Ubiquitin recognition by the proteasome // *J Biochem*. – 2017. – Т. 161, № 2. – С. 113-124.
28. Nandi D., Tahiliani P., Kumar A., Chandu D. The ubiquitin-proteasome system // *J Biosci*. – 2006. – Т. 31, № 1. – С. 137-55.
29. Schmidt M., Hanna J., Elsasser S., Finley D. Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine // *Biol Chem*. – 2005. – Т. 386, № 8. – С. 725-37.
30. Grice G. L., Nathan J. A. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome // *Cell Mol Life Sci*. – 2016. – Т. 73, № 18. – С. 3497-506.
31. Rechsteiner M., Rogers S. W. PEST sequences and regulation by proteolysis // *Trends Biochem Sci*. – 1996. – Т. 21, № 7. – С. 267-71.
32. Kile B. T., Schulman B. A., Alexander W. S., Nicola N. A., Martin H. M., Hilton D. J. The SOCS box: a tale of destruction and degradation // *Trends Biochem Sci*. – 2002. – Т. 27, № 5. – С. 235-41.
33. Zhou P. Targeted protein degradation // *Curr Opin Chem Biol*. – 2005. – Т. 9, № 1. – С. 51-5.
34. Бунеева О. А., Медведев А. Е. Убиквитин-независимая деградация белков в протеасомах // *Биомедицинская химия*. – 2018. – Т. 64(2). – С. 134-148.
35. Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs // *Cancer cell*. – 2004. – Т. 5, № 5. – С. 417-21.
36. Kubiczikova L., Pour L., Sedlarikova L., Hajek R., Sevcikova S. Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma // *J Cell Mol Med*. – 2014. – Т. 18, № 6. – С. 947-61.
37. Mason G. G., Murray R. Z., Pappin D., Rivett A. J. Phosphorylation of ATPase subunits of the 26S proteasome // *FEBS Lett*. – 1998. – Т. 430, № 3. – С. 269-74.
38. Rivett A. J., Bose S., Brooks P., Broadfoot K. I. Regulation of proteasome complexes by gamma-interferon and phosphorylation // *Biochimie*. – 2001. – Т. 83, № 3-4. – С. 363-6.
39. Zhang F., Su K., Yang X., Bowe D. B., Paterson A. J., Kudlow J. E. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome // *Cell*. – 2003. – Т. 115, № 6. – С. 715-25.
40. Sumegi M., Hunyadi-Gulyas E., Medzihradzky K. F., Udvardy A. 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster* // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2003. – Т. 312, № 4. – С. 1284-9.

41. Kimura Y., Takaoka M., Tanaka S., Sassa H., Tanaka K., Plevoda B., Sherman F., Hirano H. N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome // *J Biol Chem.* – 2000. – T. 275, № 7. – C. 4635-9.
42. Zoeger A., Blau M., Egerer K., Feist E., Dahlmann B. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells // *Clin Chem.* – 2006. – T. 52, № 11. – C. 2079-86.
43. Tsimokha A. S., Zaykova J. J., Bottrill A., Barlev N. A. Extracellular Proteasomes Are Deficient in 19S Subunits as Revealed by iTRAQ Quantitative Proteomics // *J Cell Physiol.* – 2017. – T. 232, № 4. – C. 842-851.
44. Kulichkova V. A., Artamonova T. O., Lyublinskaya O. G., Khodorkovskii M. A., Tomilin A. N., Tsimokha A. S. Proteomic analysis of affinity-purified extracellular proteasomes reveals exclusively 20S complexes // *Oncotarget.* – 2017. – T. 8, № 60. – C. 102134-102149.
45. Dutaud D., Aubry L., Henry L., Levieux D., Hendil K. B., Kuehn L., Bureau J. P., Ouali A. Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma // *J Immunol Methods.* – 2002. – T. 260, № 1-2. – C. 183-93.
46. Silva A. M., Vitorino R., Domingues M. R., Spickett C. M., Domingues P. Post-translational modifications and mass spectrometry detection // *Free Radic Biol Med.* – 2013. – T. 65. – C. 925-41.
47. Iwafune Y., Kawasaki H., Hirano H. Identification of three phosphorylation sites in the alpha7 subunit of the yeast 20S proteasome in vivo using mass spectrometry // *Arch Biochem Biophys.* – 2004. – T. 431, № 1. – C. 9-15.
48. Lu H., Zong C., Wang Y., Young G. W., Deng N., Souda P., Li X., Whitelegge J., Drews O., Yang P.-Y., Ping P. Revealing the Dynamics of the 20 S Proteasome Phosphoproteome : A Combined CID and Electron Transfer Dissociation Approach // *Molecular & Cellular Proteomics : MCP.* – 2008. – T. 7, № 11. – C. 2073-2089.
49. Isasa M., Katz E. J., Kim W., Yugo V., Gonzalez S., Kirkpatrick D. S., Thomson T. M., Finley D., Gygi S. P., Crosas B. Monoubiquitination of RPN10 regulates substrate recruitment to the proteasome // *Mol Cell.* – 2010. – T. 38, № 5. – C. 733-45.
50. Zong N., Ping P., Lau E., Choi H. J., Ng D. C., Meyer D., Fang C., Li H., Wang D., Zelaya I. M., Yates J. R., 3rd, Lam M. P. Lysine ubiquitination and acetylation of human cardiac 20S proteasomes // *Proteomics Clin Appl.* – 2014. – T. 8, № 7-8. – C. 590-594.
51. Panse V. G., Hardeland U., Werner T., Kuster B., Hurt E. A proteome-wide approach identifies sumoylated substrate proteins in yeast // *J Biol Chem.* – 2004. – T. 279, № 40. – C. 41346-51.

52. Scruggs S. B., Zong N. C., Wang D., Stefani E., Ping P. Post-translational modification of cardiac proteasomes: functional delineation enabled by proteomics // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2012. – T. 303, № 1. – C. H9-18.
53. Kimura Y., Nagata K., Suzuki N., Yokoyama R., Yamanaka Y., Kitamura H., Hirano H., Ohara O. Characterization of multiple alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis // *Proteomics.* – 2010. – T. 10, № 21. – C. 3884-95.
54. Kimura A., Kato Y., Hirano H. N-myristoylation of the Rpt2 subunit regulates intracellular localization of the yeast 26S proteasome // *Biochemistry.* – 2012. – T. 51, № 44. – C. 8856-66.
55. Kimura Y., Kurata Y., Ishikawa A., Okayama A., Kamita M., Hirano H. N-Terminal methylation of proteasome subunit Rpt1 in yeast // *Proteomics.* – 2013. – T. 13, № 21. – C. 3167-74.
56. Weinert B. T., Scholz C., Wagner S. A., Iesmantavicius V., Su D., Daniel J. A., Choudhary C. Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation // *Cell Rep.* – 2013. – T. 4, № 4. – C. 842-51.
57. 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. – T. 46, № 11. – C. 3553-65.
58. Hirano H., Kimura Y., Kimura A. Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome // *J Proteomics.* – 2016. – T. 134. – C. 37-46.
59. Iwafune Y., Kawasaki H., Hirano H. Electrophoretic analysis of phosphorylation of the yeast 20S proteasome // *Electrophoresis.* – 2002. – T. 23, № 2. – C. 329-38.
60. Kikuchi J., Iwafune Y., Akiyama T., Okayama A., Nakamura H., Arakawa N., Kimura Y., Hirano H. Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast // *Proteomics.* – 2010. – T. 10, № 15. – C. 2769-79.
61. 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. – T. 378, № Pt 1. – C. 177-84.
62. Zhang F., Hu Y., Huang P., Toleman C. A., Paterson A. J., Kudlow J. E. Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6 // *J Biol Chem.* – 2007. – T. 282, № 31. – C. 22460-71.
63. Jarome T. J., Kwapis J. L., Ruenzel W. L., Helmstetter F. J. CaMKII, but not protein kinase A, regulates Rpt6 phosphorylation and proteasome activity during the formation of long-term memories // *Front Behav Neurosci.* – 2013. – T. 7. – C. 115.

64. Bingol B., Wang C. F., Arnott D., Cheng D., Peng J., Sheng M. Autophosphorylated CaMKIIalpha acts as a scaffold to recruit proteasomes to dendritic spines // *Cell*. – 2010. – T. 140, № 4. – C. 567-78.
65. Satoh K., Sasajima H., Nyoomura K. I., Yokosawa H., Sawada H. Assembly of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase subunit // *Biochemistry*. – 2001. – T. 40, № 2. – C. 314-9.
66. Guo X., Huang X., Chen M. J. Reversible phosphorylation of the 26S proteasome // *Protein Cell*. – 2017. – T. 8, № 4. – C. 255-272.
67. Osinalde N., Aloria K., Omaetxebarria M. J., Kratchmarova I. Targeted mass spectrometry: An emerging powerful approach to unblock the bottleneck in phosphoproteomics // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. – 2017. – T. 1055-1056. – C. 29-38.
68. Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Matsubara M., Yamada S., Nakamura H., Shiro Y., Aoki Y., Okita K., Koike T. Separation of phosphoprotein isotypes having the same number of phosphate groups using phosphate-affinity SDS-PAGE // *Proteomics*. – 2008. – T. 8, № 15. – C. 2994-3003.
69. Besche H. C., Sha Z., Kukushkin N. V., Peth A., Hock E. M., Kim W., Gygi S., Gutierrez J. A., Liao H., Dick L., Goldberg A. L. Autoubiquitination of the 26S proteasome on Rpn13 regulates breakdown of ubiquitin conjugates // *EMBO J*. – 2014. – T. 33, № 10. – C. 1159-76.
70. Groll M., Bajorek M., Kohler A., Moroder L., Rubin D. M., Huber R., Glickman M. H., Finley D. A gated channel into the proteasome core particle // *Nat Struct Biol*. – 2000. – T. 7, № 11. – C. 1062-7.
71. 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. – T. 409, № 2. – C. 341-8.
72. Wang D., Fang C., Zong N. C., Liem D. A., Cadeiras M., Scruggs S. B., Yu H., Kim A. K., Yang P., Deng M., Lu H., Ping P. Regulation of acetylation restores proteolytic function of diseased myocardium in mouse and human // *Mol Cell Proteomics*. – 2013. – T. 12, № 12. – C. 3793-802.
73. Guo D., Han J., Adam B. L., Colburn N. H., Wang M. H., Dong Z., Eizirik D. L., She J. X., Wang C. Y. Proteomic analysis of SUMO4 substrates in HEK293 cells under serum starvation-induced stress // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2005. – T. 337, № 4. – C. 1308-18.
74. Tatham M. H., Matic I., Mann M., Hay R. T. Comparative proteomic analysis identifies a role for SUMO in protein quality control // *Sci Signal*. – 2011. – T. 4, № 178. – C. rs4.

75. Silva G. M., Netto L. E., Simoes V., Santos L. F., Gozzo F. C., Demasi M. A., Oliveira C. L., Bicev R. N., Klitzke C. F., Sogayar M. C., Demasi M. Redox control of 20S proteasome gating // *Antioxid Redox Signal.* – 2012. – T. 16, № 11. – C. 1183-94.
76. Demasi M., Silva G. M., Netto L. E. 20 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated // *J Biol Chem.* – 2003. – T. 278, № 1. – C. 679-85.
77. Demasi M., Netto L. E., Silva G. M., Hand A., de Oliveira C. L., Bicev R. N., Gozzo F., Barros M. H., Leme J. M., Ohara E. Redox regulation of the proteasome via S-glutathionylation // *Redox Biol.* – 2013. – T. 2. – C. 44-51.
78. Ishii T., Sakurai T., Usami H., Uchida K. Oxidative Modification of Proteasome: Identification of an Oxidation-Sensitive Subunit in 26 S Proteasome // *Biochemistry.* – 2005. – T. 44, № 42. – C. 13893-13901.
79. Divald A., Kivity S., Wang P., Hochhauser E., Roberts B., Teichberg S., Gomes A. V., Powell S. R. Myocardial ischemic preconditioning preserves postischemic function of the 26S proteasome through diminished oxidative damage to 19S regulatory particle subunits // *Circ Res.* – 2010. – T. 106, № 12. – C. 1829-38.
80. Zong C., Young G. W., Wang Y., Lu H., Deng N., Drews O., Ping P. Two-dimensional electrophoresis-based characterization of post-translational modifications of mammalian 20S proteasome complexes // *Proteomics.* – 2008. – T. 8, № 23-24. – C. 5025-37.
81. Ullrich O., Reinheckel T., Sitte N., Hass R., Grune T., Davies K. J. Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1999. – T. 96, № 11. – C. 6223-8.
82. Yokota N., Kataoka Y., Hashii N., Kawasaki N., Sawada H. Sperm-specific C-terminal processing of the proteasome PSMA1/alpha6 subunit // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2011. – T. 410, № 4. – C. 809-15.
83. Artamonova T. O., Khodorkovskii M. A., Tsimokha A. S. [Mass spectrometric analysis of proteasomes affinity purified from the human myelogenous leukemia cells K562] // *Bioorg Khim.* – 2014. – T. 40, № 6. – C. 720-34.
84. 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. – T. 72. – C. 248-54.
85. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1979. – T. 7, № 6. – C. 1513-23.

86. Евтеева И. Н., Старкова Т. Ю., Артемов А. В., Зайкова Ю. Я., Барлев Н. А. Сравнительный анализ очистки и концентрирования 26s протеасом из печени крыс // Цитология. – 2013. № 12. – С. 893-900.
87. Guerrero C., Tagwerker C., Kaiser P., Huang L. An integrated mass spectrometry-based proteomic approach: quantitative analysis of tandem affinity-purified in vivo cross-linked protein complexes (QTAX) to decipher the 26 S proteasome-interacting network // Mol Cell Proteomics. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 366-78.
88. Tagwerker C., Flick K., Cui M., Guerrero C., Dou Y., Auer B., Baldi P., Huang L., Kaiser P. A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking // Mol Cell Proteomics. – 2006. – Т. 5, № 4. – С. 737-48.
89. Verma R., Chen S., Feldman R., Schieltz D., Yates J., Dohmen J., Deshaies R. J. Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes // Mol Biol Cell. – 2000. – Т. 11, № 10. – С. 3425-39.
90. Leggett D. S., Hanna J., Borodovsky A., Crosas B., Schmidt M., Baker R. T., Walz T., Ploegh H., Finley D. Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function // Mol Cell. – 2002. – Т. 10, № 3. – С. 495-507.
91. Huang L., Burlingame A. L. Comprehensive mass spectrometric analysis of the 20S proteasome complex // Methods Enzymol. – 2005. – Т. 405. – С. 187-236.
92. 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. – Т. 6, № 16. – С. 4622-32.
93. Zong C., Gomes A. V., Drews O., Li X., Young G. W., Berhane B., Qiao X., French S. W., Bardag-Gorce F., Ping P. Regulation of murine cardiac 20S proteasomes: role of associating partners // Circ Res. – 2006. – Т. 99, № 4. – С. 372-80.
94. Gomes A. V., Zong C., Edmondson R. D., Li X., Stefani E., Zhang J., Jones R. C., Thyparambil S., Wang G. W., Qiao X., Bardag-Gorce F., Ping P. Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes // Circ Res. – 2006. – Т. 99, № 4. – С. 362-71.
95. Froment C., Uttenweiler-Joseph S., Bousquet-Dubouch M. P., Matondo M., Borges J. P., Esmenjaud C., Lacroix C., Monsarrat B., Burlet-Schiltz O. A quantitative proteomic approach using two-dimensional gel electrophoresis and isotope-coded affinity tag labeling for studying human 20S proteasome heterogeneity // Proteomics. – 2005. – Т. 5, № 9. – С. 2351-63.

96. 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. – T. 1, № 8. – C. 567-78.
97. Doench J. G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E. W., Donovan K. F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H. W., Listgarten J., Root D. E. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9 // *Nat Biotechnol*. – 2016. – T. 34, № 2. – C. 184-191.
98. Hsu P. D., Scott D. A., Weinstein J. A., Ran F. A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E. J., Wu X., Shalem O., Cradick T. J., Marraffini L. A., Bao G., Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases // *Nat Biotechnol*. – 2013. – T. 31, № 9. – C. 827-32.
99. Tanaka K., Ichihara A. Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1989. – T. 159, № 3. – C. 1309-15.
100. Huber E. M., Heinemeyer W., Li X., Arendt C. S., Hochstrasser M., Groll M. A unified mechanism for proteolysis and autocatalytic activation in the 20S proteasome // *Nat Commun*. – 2016. – T. 7. – C. 10900.
101. Gossen M., Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1992. – T. 89, № 12. – C. 5547-51.
102. Gossen M., Bujard H. Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary // *Biotechniques*. – 1995. – T. 19, № 2. – C. 213-6; discussion 216-7.
103. Yin D. X., Zhu L., Schimke R. T. Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression // *Anal Biochem*. – 1996. – T. 235, № 2. – C. 195-201.

Общий список обнаруженных посттрансляционных модификаций протеасом

Клеточные протеасомы	ЛТР- сайт- специфические методы	НТР- только MS- анализ	Внеклеточные протеасомы	ЛТР- сайт- специфические методы	НТР- только MS- анализ
PSMA1 (α6) 42T-Ph 50K-Acetyl	0	2	PSMA1 (α6)		
PSMA2 (α2) 48T-Ph 50K-Acetyl 51K-Acetyl 70K-Ubiq 171K-Ubiq 176K-Ubiq 227K-Ubiq	0 0 0 0 0	1 105 27 12 19	PSMA2 (α2) 48T-Ph 70K-Ubiq 227K-Ubiq	0 0	105 19
PSMA3 (α7) Met-loss 2S- N-terminal acetyl 29K-Acetyl 56S-Ph 57K-Acetyl 65K-Acetyl 87S-Ph 175T-Ph 230K-Acetyl 239Y-Ph 243S-Ph	0 0 0 0 0 2	11 2 1 18	PSMA3 (α7) Met-loss 2S- N-terminal acetyl 56S-Ph 65K-Acetyl 87S-Ph 175T-Ph 208K-Suc 239Y-Ph 243S-Ph	0 0 2	2 18
PSMA4 (α3) 185T-Ph 188S-Ph 195K-Acetyl 210K-Suc 222K-Ubiq/Acetyl 222K-Ubiq	0	1	PSMA4 (α3) 222K-Ubiq/Acetyl 222K-Ubiq	- 0	1
PSMA5 (α5) Met-loss 197S-Ph 198S-Ph			PSMA5 (α5) 197S-Ph 198S-Ph		
PSMA6 (α1) Met-loss 52T-Ph 181K-Acetyl 182K-Acetyl 184K-Acetyl	0	8	PSMA6 (α1) 52T-Ph		

PSMA7 ($\alpha 4$) Met-loss 2S- N-terminal acetyl 49S-Ph 166K-Suc 167S-Ph 201S-Ph 248S-Ph				
PSMB1 ($\beta 6$) 70K-Acetyl 204K-Acetyl 209S-Ph 216Y-Ph 217T-Ph				
PSMB2 ($\beta 4$)				
PSMB3 ($\beta 3$) Met-loss 41K-Acetyl				
PSMB4 ($\beta 7$)				
PSMB5 ($\beta 5$) 130K-Acetyl 134S-Ph 139S-Ph 140K-Acetyl				
PSMB6 ($\beta 1$) 67K-Acetyl				
PSMB7 ($\beta 2$) Met-loss 34Y-Ph 35K-Acetyl 38K-Acetyl 72K-Acetyl 121T-Ph 232Y-Ph 233T-Ph				
PSMA7 ($\alpha 4$) Met-loss 2S- N-terminal acetyl				
PSMB1 ($\beta 6$) 204K-Acetyl 209S-Ph				
PSMB2 ($\beta 4$)				
PSMB3 ($\beta 3$) Met-loss 41K-Acetyl 74Y-Ph 181S-Ph				
PSMB4 ($\beta 7$)				
PSMB5 ($\beta 5$) 130K-Acetyl 134S-Ph 139S-Ph 140K-Acetyl				
PSMB6 ($\beta 1$)				
PSMB7 ($\beta 2$) Met-loss 34Y-Ph 35K-Acetyl 38K-Acetyl 72K-Acetyl 121T-Ph				

LTP – количество обнаружений посттрансляционной модификации в литературе с помощью сайт-специфических методов

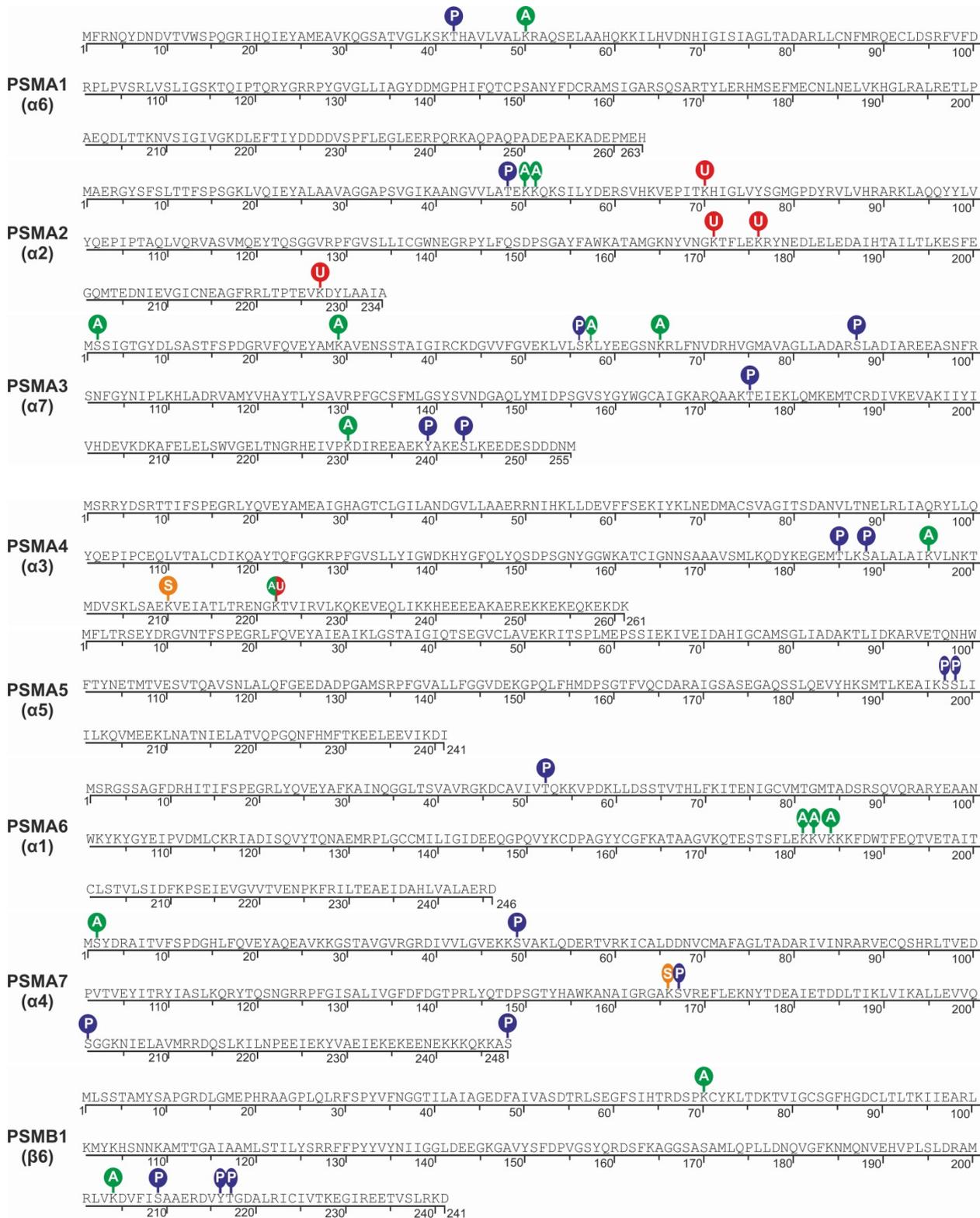
HTP – количество обнаружений посттрансляционной модификации в литературе с помощью методов масс-спектрометрии

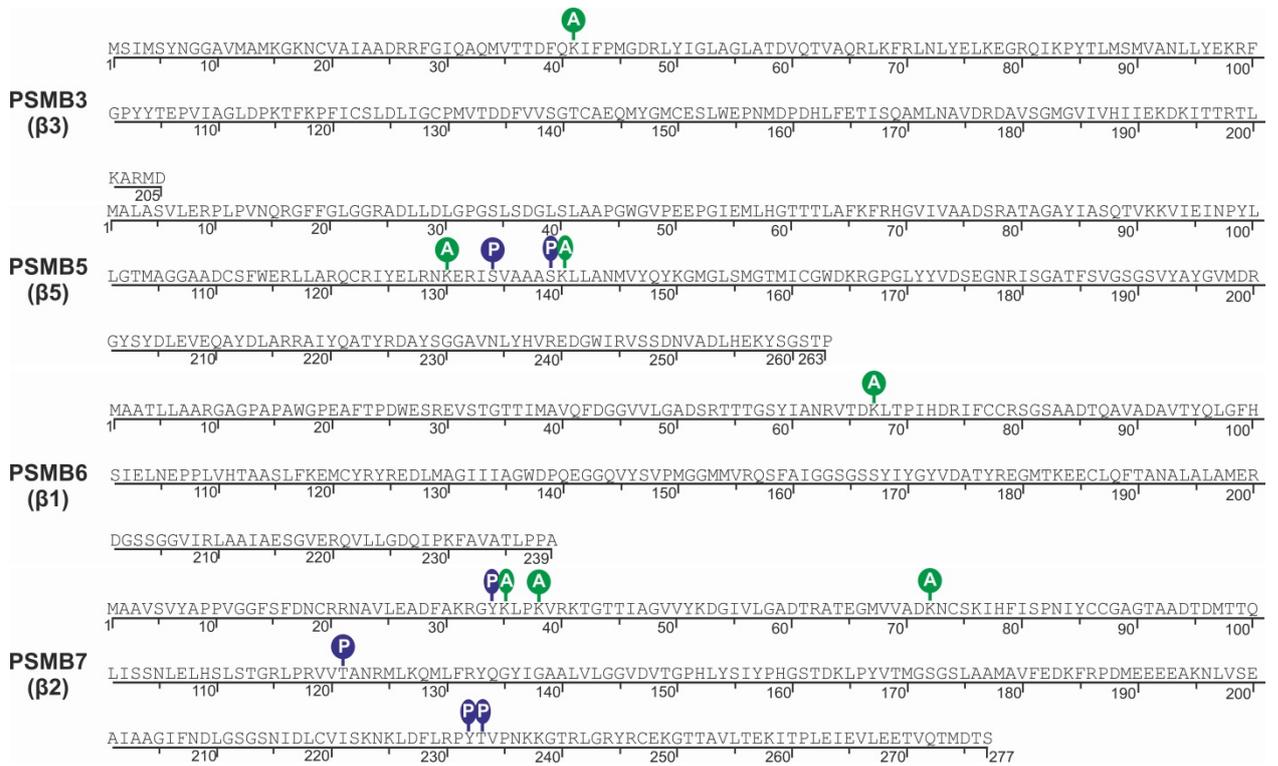
Красным цветом выделена посттрансляционная модификация, кандидатная на внесение в список специфических для внеклеточных протеасом
Ph-фосфорилирование, Acetyl-ацетилирование, N-terminal acetyl – N-терминальное ацетилирование, Ubiqu – убиквитинирование, Suc – сукцинирование

Количество сайтов различных типов посттрансляционных модификаций в субъединицах протеасом

Клеточные протеасомы	Количество сайтов	Внеклеточные протеасомы	Количество сайтов
Фосфорилирование		Фосфорилирование	
<i>PSMA1</i> ($\alpha 6$)	1	<i>PSMA2</i> ($\alpha 2$)	1
<i>PSMA2</i> ($\alpha 2$)	1	<i>PSMA3</i> ($\alpha 7$)	5
<i>PSMA3</i> ($\alpha 7$)	5	<i>PSMA5</i> ($\alpha 5$)	2
<i>PSMA4</i> ($\alpha 3$)	2	<i>PSMA6</i> ($\alpha 1$)	1
<i>PSMA5</i> ($\alpha 5$)	2	<i>PSMB1</i> ($\beta 6$)	1
<i>PSMA6</i> ($\alpha 1$)	1	<i>PSMB3</i> ($\beta 3$)	2
<i>PSMA7</i> ($\alpha 4$)	4	<i>PSMB5</i> ($\beta 5$)	2
<i>PSMB1</i> ($\beta 6$)	3	<i>PSMB7</i> ($\beta 2$)	2
<i>PSMB5</i> ($\beta 5$)	2		
<i>PSMB7</i> ($\beta 2$)	4		
Всего:	25	Всего:	16
Убиквитинирование		Убиквитинирование	
<i>PSMA2</i> ($\alpha 2$)	4	<i>PSMA2</i> ($\alpha 2$)	2
<i>PSMA4</i> ($\alpha 3$)	1	<i>PSMA4</i> ($\alpha 3$)	1
Всего:	5	Всего:	3
Ацетилирование		Ацетилирование	
<i>PSMA1</i> ($\alpha 6$)	1	<i>PSMA3</i> ($\alpha 7$)	2
<i>PSMA2</i> ($\alpha 2$)	2	<i>PSMA4</i> ($\alpha 3$)	1
<i>PSMA3</i> ($\alpha 7$)	5	<i>PSMA7</i> ($\alpha 4$)	1
<i>PSMA4</i> ($\alpha 3$)	2	<i>PSMB1</i> ($\beta 6$)	1
<i>PSMA6</i> ($\alpha 1$)	3	<i>PSMB3</i> ($\beta 3$)	1
<i>PSMA7</i> ($\alpha 4$)	1	<i>PSMB5</i> ($\beta 5$)	2
<i>PSMB1</i> ($\beta 6$)	2	<i>PSMB7</i> ($\beta 2$)	3
<i>PSMB3</i> ($\beta 3$)	1		
<i>PSMB5</i> ($\beta 5$)	2		
<i>PSMB6</i> ($\beta 1$)	1		
<i>PSMB7</i> ($\beta 2$)	3		
Всего:	23	Всего:	11
Сукцинирование		Сукцинирование	
<i>PSMA4</i> ($\alpha 3$)	1	<i>PSMA3</i> ($\alpha 7$)	1
<i>PSMA7</i> ($\alpha 4$)	1		
Всего:	6	Всего:	1

Карта расположения обнаруженных посттрансляционных модификаций в клеточной протеасоме. А-ацетилирование, Р-фосфорилирование, U-убиквитинирование, S-сукцинирование





Карта расположения обнаруженных посттрансляционных модификаций во внеклеточной протеасоме. А-ацетилирование, Р-фосфорилирование, U-убиквитинирование, S-сукцинирование

