

Санкт-Петербургский Государственный Университет

Биологический факультет

Кафедра цитологии и гистологии

Иванова Елена Юрьевна

Исследование роли протеасом в появлении укороченной формы альфа-тубулина в клетках человека

Выпускная квалификационная работа

(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:
Доц., к.б.н. Сабанеева Е.В.

Куратор:
С.н.с., к.б.н. Цимоха А.С.

Санкт-Петербург

2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
Протеасома. Строение и состав	6
Типы протеасом.....	9
Убиквитин протеасомный путь деградации белков.....	10
Процессинг	12
Убиквитин-независимый протеолиз.....	13
Участие убиквитин-протеасомной системы в клеточных процессах.....	14
Многообразие тубулинов. Функции.	15
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	18
Работа с клетками эукариот в культуре.....	18
Молекулярно-биохимические и физико-химические методы.....	18
Методы работы с бактериями <i>Escherichia coli</i>	23
РЕЗУЛЬТАТЫ.....	25
Масс-спектрометрический анализ аффинно-очищенных протеасом.....	25
Верификация масс-спектрометрических данных с помощью иммуноблотинга	27
Создание генетических конструкций для экспрессии рекомбинантного α -тубулина	28
Подбор условий для экспрессии и очистки рекомбинантных α -тубулинов	30
Проверка результатов очистки рекомбинантного α -тубулина Вестерн-блот анализом...31	
Протеолиз α -тубулина протеасомой <i>in vitro</i>	32
ОБСУЖДЕНИЕ.....	34
ВЫВОДЫ	39
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	39
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	45

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- УПС – убиквитин-протеасомная система
- СЕ – субъединица
- ИП – иммунопротеасома
- ИПТГ - Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
- ПААГ - полиакриамидный гель
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- BSA – бычий сывороточный альбумин
- EBV - Epstein-Barr virus (вирус Эпштейна-Барр)
- His - последовательность из шести или восьми гистидинов
- НТВН - сложный полипептид, состоящий из двух последовательностей из шести гистидинов (Н), специфического сайта расщепления TEV-протеазой (Т) и сигнальной последовательности для биотинилирования *in vivo*(В)
- MBP – основной белок миелина (myelin basic protein)
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- PBSt – 0,1% tween-20 фосфатно-солевой буфер
- PVDF - polyvinylidene fluoride (поливинилиденфторид)
- SDS - sodium dodecil sulphate (додecilсульфат натрия)
- TEV - *Tibacco Etch virus*

ВВЕДЕНИЕ

Мультисубъединичный белковый комплекс, отвечающий за избирательную деградацию большинства белков в эукариотической клетке, называется 26S протеасомой. За счет деградации специфических регуляторных белков она играет центральную роль в основных клеточных процессах: клеточной дифференцировке и развитии, транскрипции и репарации ДНК, продвижении клетки по клеточному циклу, иммунном и воспалительном ответах, апоптозе (Цимоха, 2010).

На сегодняшний день прослеживается связь между патогенезом различных заболеваний, включая нейродегенеративные, аутоиммунные и онкологические, и нарушениями в работе убиквитин-протеасомной системы. Причинами заболеваний может стать как ингибирование работы этой протеолитической системы, так и ее чрезмерная активность. Тот факт, что работа протеасомы тесно связана с патогенезом многих заболеваний, наводит на мысль о возможности изменения течения этих заболеваний. Поэтому так важно широкое и комплексное изучение механизма работы убиквитин-протеасомной системы и способов регуляции функционирования протеасом в клетке.

Существует ряд белков с известными и неизвестными функциями, которые постоянно или краткосрочно связываются с 26S протеасомами, и условно поделены на две группы: белки убиквитиновой системы и белки, регулирующие активность и функции протеасом за счет прямого связывания. Определение белков, взаимодействующих с протеасомами, является одним из важных этапов в понимании функций протеасом в клетке и механизмов их регуляции.

Согласно данным нашей лаборатории, полученным с помощью iTRAQ-масс-спектрометрического анализа очищенных с помощью последовательного фракционирования протеасом (Зайкова и др., 2013), среди ассоциированных с протеасомами белков присутствуют такие белки цитоскелета, как α - и β -тубулины, актин, α -актинин, миозин, филамин. Вестерн-блот анализ с применением моноклональных мышинных антител, специфичных к α -тубулину, подтвердил присутствие данного белка. Однако в комплексе с протеасомами была идентифицирована дополнительная изоформа α -тубулина с молекулярной массой примерно 40 кДа.

Известно, что, помимо полной деградации субстратов, протеасома способна к ограниченному протеолизу. Если субстрат расщепляется не полностью и при этом продукт расщепления остается функционально-активным, происходит так называемый "протеасомный процессинг" (Сорокин и др., 2009). Тем не менее, на сегодняшний день примеров белков, процессируемых протеасомой, всего несколько.

Можно предположить, что укороченная форма α -тубулина, обнаруженная в

комплексе с очищенными протеасомами, возникает в результате процессинга α -тубулина протеасомами.

Цель работы

Исследование роли протеасом в появлении укороченной формы α -тубулина в клетках человека

Задачи

- 1 С помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии определить белки, ассоциированные с протеасомами, аффинно-очищенными из клеток человека линии K562
- 2 Выборочно подтвердить масс-спектрометрические данные Вестерн-блот анализом с помощью специфических антител
- 3 Исследовать протеолиз (или процессинг) α -тубулина протеасомами *in vitro*

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Протеасома. Строение и состав

Протеасома – это белковый комплекс, который занимается в клетке избирательной деградацией белков. Мультисубъединичный белковый комплекс в основном можно разделить на две различные молекулярные разновидности: 26S протеасому, которая деградирует убиквитинированные белки, и ее каталитическое ядро, 20S протеасому (Souh et al., 1994; Rock et al., 1994). Последняя сама по себе не способна деградировать клеточные белки, однако может расщеплять некоторые короткие пептиды и развернутые белки (Bochtler et al., 1999; DeMartino, Slaughter, 1999).

26S протеасома – АТФ-зависимый протеолитический комплекс, обладающий молекулярной массой около 2.5 МДа, – осуществляет специфическую деградацию белков, конъюгированных с убиквитином (Dahlmann, 2005). При исследовании строения этого комплекса методами электронной микроскопии и компьютерной томографии было выявлено, что 26S протеасома представляет собой симметричную гантелеобразную структуру (Baumeister et al., 1998; Walz et al., 1998). Ее центральная часть образована 20S каталитическим ядром (или 20S протеасомой), к которому с одной или с двух сторон присоединены PA700 регуляторные комплексы (или 19S частицы) (рис.1) (Цимоха, 2010).

20S протеасома, по данным рентгеноструктурного анализа выглядит как цилиндр длиной 15-17 нм и диаметром 11-12 нм, который состоит из четырех сложенных в стопку гептамерных колец (Lowe et al., 1995; Groll et al., 1997; Dahlmann et al., 2001; Abramova et al., 2002). В состав 20S протеасомы входят 14 пар субъединиц, мол. масса которых варьирует от 20 до 35 кДа, а суммарная масса всего комплекса составляет около 750 кДа. Каждое из двух внешних колец цилиндра состоит из семи гомологичных субъединиц α -типа, а каждое из двух внутренних колец – из семи похожих консервативных субъединиц β -типа (рис.1). Рентгеноструктурный анализ кристаллизованной 20S протеасомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с разрешением 2.4 А подтвердил организацию протеасомных субъединиц в $(\alpha)_7(\beta)_7(\beta)_7(\alpha)_7$ - комплекс (Groll et al., 1997; Dahlmann, 2005; Groll et al., 2005; Nandi et al., 2006). Четыре собранных кольца образуют три внутренние полости диаметром приблизительно 5 нм (Groll, Huber, 2004). Центральную – протеолитическую полость – формируют два β -кольца, ориентированные «голова к голове», и она отделена от двух внешних полостей, сформированных другими сторонами β -колец и α -кольцами, воротами толщиной 3 нм (Orlowski, Wilk, 2000). Каталитическая полость протеасомы имеет примерный объем 84 нм³ и способна вместить до 70 кДа упакованного белка. Протеолитически активные сайты расположены на N-концах β -субъединиц, находящихся

во внутренней полости цилиндра, а вход субстрата в протеолитическую камеру ограничивают «ворота» с двух сторон 20S протеасомы, образованные N-концами α -субъединиц (Maug et al., 1998).

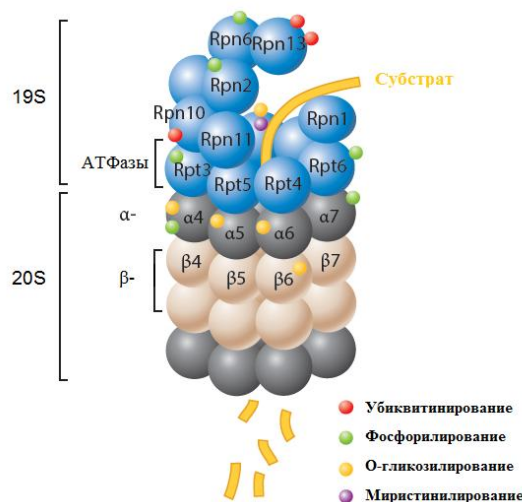


Рис.1. Строение 26S протеасомы и субъединичный состав (Dikić, 2017).

26S протеасома составлена из 20S протеасомы и одного или двух 19S регуляторных комплексов, которые условно делятся на два субкомплекса: "основание" и "крышка". Протеолитически активные сайты расположены в центральных кольцах 20S протеасомы в субъединицах $\beta 1/\beta 1i$, $\beta 2/\beta 2i$ и $\beta 5/\beta 5i$. С помощью 19S регуляторного комплекса 26S протеасома обычно узнает помеченный для деградации субстрат через полиубиквитиновую цепь. Молекула субстрата разворачивается АТФазами 19S регулятора и поступает в протеолитическую камеру 20S протеасомы, где и подвергается расщеплению. Полиубиквитиновая цепочка также разбивается на мономеры с помощью деубиквитирующих ферментов 19S регулятора в течение процесса проталкивания субстрата внутрь (Цимоха, 2010).

Протеасомы эукариот характеризуются сложным субъединичным составом. Их образуют α - и β -субъединицы 7 различных типов, каждая из которых занимает определенное положение в 20S протеасоме (Heinemeier et al., 2004). Сборка эукариотической протеасомы представляет собой достаточно сложный процесс. Из семи β -субъединиц только пять имеют пропептиды, и только три высвобождают активные сайты в результате процессинга. Ранние этапы сборки эукариотических протеасом плохо изучены, ранние предшественники эукариотических протеасом (α -кольца или α/β -димеры) не были выявлены. Но известно, что правильное позиционирование иницирующих сборку α -субъединиц определяется их взаимодействием с β -субъединицами (Heinemeier et al., 2004). Однако до сих пор неизвестно, иницируется сборка протеасом образованием кольца из α -субъединиц или же сначала образуются α/β -димеры (Цимоха, 2010).

Функция регуляторных комплексов – распознавание убиквитинированных белков и подготовка их к деградации в 20S каталитическом ядре протеасомы. Подготовка включает в себя несколько процессов: выбор и связывание субстрата, отщепление убиквитина, разворачивание и перенос субстрата в протеолитическую камеру 20S частицы. Кроме того, открытие/закрытие канала регулирует размер пептидов, образовавшихся в результате протеолиза. Обычно выход продукта заторможен, что необходимо для более эффективного протеолиза и достижения длины пептидов менее 8 аминокислот, которые затем быстро разрушаются клеточными пептидазами (Glickman, Ciechanover, 2002).

19S (PA700 частица) регуляторный комплекс протеасом эукариот, состоящий из 18 различных субъединиц, имеет молекулярную массу около 1 МДа. Регулятор 19S включает в себя две мультисубъединичные структуры – «крышку» (lid) и «основание» (base). «Основание» состоит из шести гомологичных АТФаз, членов AAA-семейства (ATPase Associated with different cellular Activities) и трех неАТФазных субъединиц (Rpn1, 2, 10), «крышка» регуляторной частицы представляет собой комплекс 400 кДа из 6 не-АТФазных субъединиц (Rpn3, 5-9, 11-12) (Finley et al., 1998; Glickman et al., 1998; Smalle, Vierstra, 2004).

Связывание с 19S частицей активирует 20S протеасому и способствует последующему гидролизу конъюгированных с полиубиквитином субстратов. На сегодняшний день название «26S протеасома» употребляют для обозначения как 30S-комплекса, содержащего две 19S частицы (19S-20S-19S), так и самого 26S комплекса, когда 19S регулятор присоединен только с одного конца 20S протеасомы (Hendil et al., 1998).

АТФазные субъединицы «основания» формируют гексамерное кольцо, которое непосредственно взаимодействует с гептамерным α -кольцом 20S протеасомы, открывая вход во внутреннюю протеолитическую камеру, а также выполняют функцию, обратную функции шаперонов, т. е. разворачивают нативные белки (Glickman et al., 1998).

Центральная камера – это место, где происходит протеолиз. Именно там, на внутренней поверхности, располагаются каталитические центры – три основных и два дополнительных. Типы протеолитических активностей, которыми обладают β -субъединицы протасомы:

- химотрипсин-подобная ($\beta 5$, $\beta 5i$ и $\beta 1i$);
- трипсин-подобная ($\beta 2$ и $\beta 2i$);
- каспаза-подобная ($\beta 1$) (Цимоха, 2010).

Эти активные сайты локализованы на трех разных субъединицах каждого β -кольца,

там же находятся и дополнительные. Структура активного центра β -субъединиц необычна: в качестве основного структурного элемента, проводящего катализ, в нем присутствует N-концевой треонин.

Отверстие, ведущее в центральный канал и образованное α -субъединицами 20S протеасомы, по размеру сопоставимо с α -спиралью белка, а кроме того оно закрыто их гидрофобными N-концевыми участками. Именно это и не позволяет цитоплазматическим белкам проникать к месту возможного разрушения. Поэтому 20S протеасома, выделенная в условиях, сохраняющих ее целостность, гидролизует только короткие полипептиды в реакции, которая не требует АТФ как источника энергии (Abramova et al., 2002).

Типы протеасом

Протеасомы не являются неизменной, статичной структурой, а их популяция в клетке гетерогенна. Тип конкретной протеасомы зависит от регуляторных комплексов и структурных субъединиц, входящих в ее состав.

Коровая частица без регуляторных комплексов представляет собой 20S протеасому, способную расщеплять лишь короткие пептиды.

26S протеасома представлена двумя подтипами: с одним (19S-20S) и с двумя (19S-20S-19S) регуляторными комплексами 19S (он же PA700 частица) (рис.2).

Помимо этого, было установлено, что под воздействием внешних факторов, например, при повышении концентрации соли NaCl до 1 М, могут образовываться минорные формы:

- base-CP-RP (основание 19S комплекса-20S-19S);
- base-CP-base (основание 19S комплекса-20S-основание 19S комплекса);
- base-CP (основание 19S комплекса-20S) (Elsasser et al., 2005).

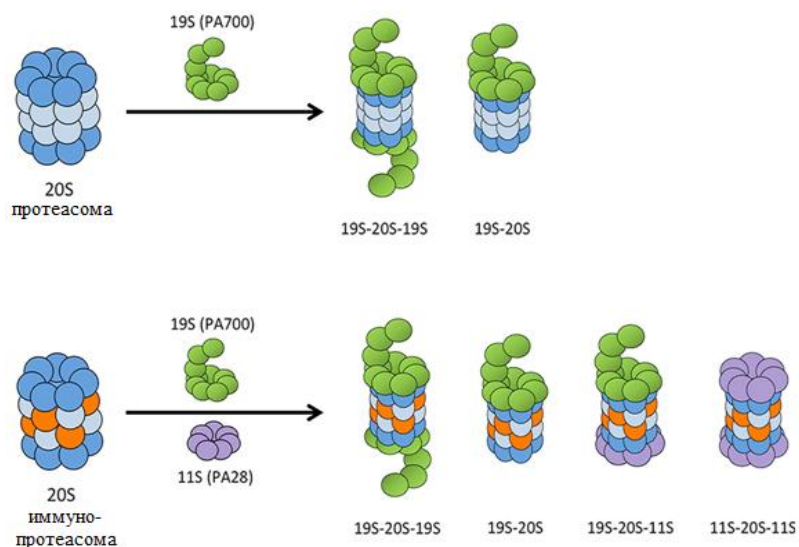


Рис.2. Типы протеасом (McCarthy, Weinberg, 2015).

Помимо конститутивной 20S протеасомы высшие эукариоты могут также образовывать индуцибельные или иммунные протеасомы. Под действием γ -интерферона (γ -IFN) конститутивные каталитические β -субъединицы 20S протеасомы замещаются на индуцибельные (β_i) (рис.3) (Groettrup et al., 2001; McCarthy, Weinberg, 2015). Структура с замещенными конституционными субъединицами получила название иммунопротеасомы. При этом каждая из индуцибельных β_i -субъединиц, считываемых с 3 дополнительных генов, 2 из которых находятся в пределах локуса главного комплекса гистосовместимости, гомологична (почти на 70 %) соответствующей конститутивной β -субъединице и замещает ее во вновь образованной иммунопротеасоме: β_{1i} занимает место β_1 , β_{2i} – β_2 и β_{5i} – β_5 (Hughes, 1997). Было показано, что иммунопротеасома участвует в продукции определенных антигенных пептидов, презентруемых на молекулах главного комплекса гистосовместимости I класса (Kloetzel, 2001).

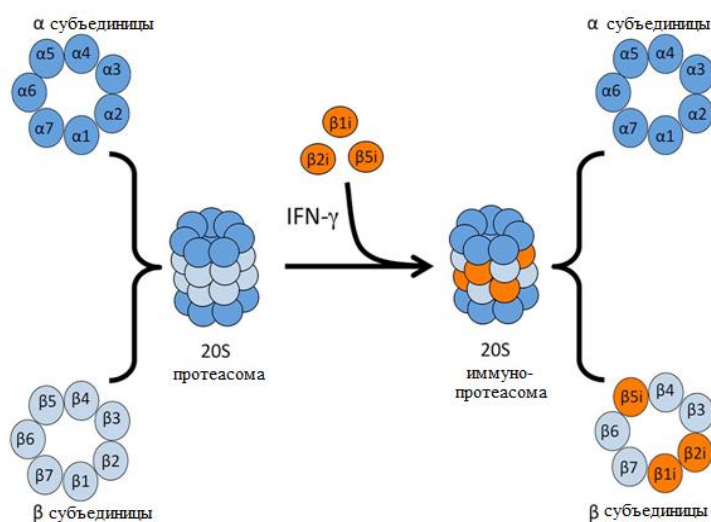


Рис.3. Механизм образования иммунопротеасомы. γ -IFN индуцирует синтез трех новых β_i -субъединиц, которые замещают аналогичные конститутивные β -субъединицы в коровой частице (McCarthy, Weinberg, 2015).

Убиквитин протеасомный путь деградации белков

Деградация белков по убиквитин-протеасомному пути включает в себя два основных этапа – ковалентное присоединение к субстрату полиубиквитиновой цепочки и деградацию помеченного таким образом белка 26S протеасомой (Цимоха, 2010).

Убиквитин (Ub) – маленький белок, присутствующий во всех изученных эукариотических клетках (Pickart, Eddins, 2004). Это высококонсервативный белок: из составляющих его молекулу 76 аминокислот всего лишь 2 аминокислоты отличают молекулу убиквитина растений от молекулы убиквитина дрожжей или 3 от молекулы убиквитина животных (Smalle, Vierstra, 2004; Groll et al., 2005). Убиквитин очень стабилен и образует глобулярную структуру с выдающимся С-концом, на котором находится Gly-76, участвующий в полиубиквитинировании (Hochstrasser, 1996; Groll et al., 2005).

Полиубиквитин присоединяется к молекуле белка – субстрату – за счет формирования изопептидной связи между Gly-76 убиквитина и ϵ -NH₂-группой одного из лизиновых оснований внутри молекулы субстрата путем трехступенчатого каскада с использованием энергии АТФ (Ciechanover, Brundin, 2003).

Реакция убиквитинирования осуществляется E1-E2-E3-каскадом ферментов (рис.4) (Hershko, Ciechanover, 1998; Wolf, 2004; Wolf, Hilt, 2004; Nandi et al., 2006).

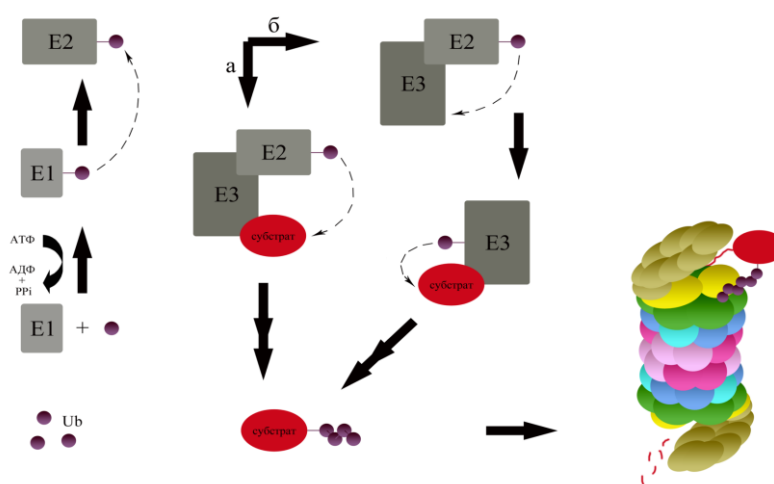


Рис.4. Убиквитин-протеасомная система. Каскад убиквитинирования (Цимоха, 2010).

Начальный этап гидролиза белков 26S протеасомой сопровождается энергетически зависимой активацией молекулы убиквитина Ub-активирующим ферментом E1 с образованием связи между E1 и убиквитином. Затем E1 переносит активированный убиквитин на Ub-конъюгирующий фермент E2, который взаимодействует со следующим ферментом E3. Функция E3 заключается в ковалентном присоединении убиквитина к молекуле субстрата. *a* – фермент E3 функционирует как посредник в переносе убиквитина от фермента E2 к субстрату; *b* – убиквитин переносится с фермента E2 на E3 с последующим переносом на субстрат (рис.4) (Цимоха, 2010).

Молекула убиквитина присоединяется к лизину, находящемуся внутри последовательности белка-мишени. Причем один и тот же белок может быть модифицирован по одному или нескольким лизинам с помощью одной молекулы убиквитина, полиубиквитиновой цепи или их комбинации (Ciechanover, Brundin, 2003).

Моноубиквитинирование во многих случаях служит сигналом деградации белка в лизосоме/вакуоли (Ciechanover, Brundin, 2003), но может также привести к событиям, не связанным с протеолизом: к модификации (например, к последующему метилированию) или к изменению локализации в клетке (Vach, Ostendorff, 2003).

Чаще всего происходит несколько циклов убиквитинирования, причем каждая

последующая молекула убиквитина присоединяется к лизину предыдущей молекулы (Pickart, 2001).

Процессинг

Помимо полной деградации субстратов, протеасома способна к ограниченному протеолизу. Если субстрат расщепляется не полностью и при этом продукт расщепления остается функционально-активным, происходит так называемый "протеасомный процессинг" (Сорокин и др., 2009). Тем не менее, на сегодняшний день примеров белков, процессируемых протеасомой, всего несколько. Например, обнаружено, что субъединица p50 транскрипционного фактора NF-κB образуется из предшественника p105 в результате процессинга протеасомами (Chen, 2005). NF-κB представлен обычно гомо- или гетеродимером, и наиболее распространенной его формой является комплекс p50-p65. Предшественник p50 - p105 может образовывать димеры с белками семейства NF-κB, блокируя свой N-концевой сигнал ядерной локализации, тем самым удерживая транскрипционный фактор в цитоплазме и, таким образом, ингибируя активность NF-κB. Однако было обнаружено, что активация сигнального пути NF-κB запускает процесс убиквитин-зависимого процессинга p105 протеасомой, приводящему к гидролизу его C-конца и высвобождению сигнала ядерной локализации. Это приводит к димеризации p50-p65, с образованием активного комплекса NF-κB, который перемещается в ядро, где осуществляет регуляцию транскрипции. Установлено, что остановка протеасомы при процессинге p105 в p50 осуществляется за счет «стоп-сигнала», состоящего из двух компонент: глицин-богатого участка и следующего за ним плотно уложенного Rel-гомологичного домена (Tian et al., 2005). Однако, механизм процессинга p105 протеасомой все еще активно изучается, так как наряду с частичным протеолизом обнаружена полная деградация данного субстрата. По-видимому, судьба белка определяется типом убиквитин-лигазы, модифицирующей белок, как было показано позднее (Schulman, Harper, 2009).

Еще один пример белкового процессинга протеасомами – ДНК/РНК-связывающий ядерно-цитоплазматический белок клеток животных YB-1, принимающий участие практически во всех ДНК- и мРНК-зависимых процессах. Он расщепляется АТР- и убиквитин-независимо 20S протеасомой по пептидной связи после остатка Glu-219 на два фрагмента (Сорокин и др., 2009).

Другим примером является белок EBNA1 вируса Эпштейна-Барра (EBV), содержащем в своей последовательности ~ 60÷300-аминокислотные фрагменты, богатые аланинами и глицинами (glycine-alanine repeat, GAR). Показано, что протеасома распознает

EBNA1 и происходит начало деградации, но при достижении участком GAr АТФ-азного кольца протеолиз прекращается. Этот процесс помогает вирусу Эпштейна-Барр избежать презентации антигенных пептидов EBNA1 на МНС I класса и, как следствие, иммунного ответа. Предположительно, ароматические- гидрофобные петли (Ar-Ф) АТФ-азных субъединиц не способны к правильному захвату глицинов и аланинов, из-за чего полипептидная цепь проскальзывает, что приводит к остановке транслокации субстрата и образованию частично процессированных продуктов (Hoyt et al., 2006).

Убиквитин-независимый протеолиз

В последнее время стали появляться данные о том, что протеасомы могут разрушать полипептиды, маркированные не убиквитином, а другими специальными белками, выполняющими аналогичную функцию (Orlowski, Wilk, 2003).

Наличие больших количеств свободных 20S протеасом в клетках по сравнению с 26S комплексами свидетельствует о важной роли коровой частицы в протеолизе внутриклеточных белков (Orlowski, Wilk, 2003). Так, деградации с помощью этого комплекса подвергаются белки, не имеющие третичной структуры, некоторые короткоживущие регуляторные белки, долгоживущие белки, а также окисленные, развернутые, мутированные и поврежденные белки. Кроме того, хорошими субстратами 20S протеасомы являются пептиды, не прошедшие процессинг в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) (Orlowski, Wilk, 2003).

Недавно было показано, что МВР - основной белок миелина подвергается расщеплению 26S протеасомой убиквитин-независимо (Belogurov et al., 2014). Миелин – вещество, покрывающее аксоны большим количеством плотноупакованных ламелл в центральной и периферической нервной системе, и способствующее быстрому проведению нервного импульса. Движущей силой деградации МВР протеасомой является аномально высокий положительный заряд белка. Гидролиз МВР протеасомой является АТФ-независимым и ускоряется в присутствии регуляторных элементов REG типа α и γ . (Belogurov et al., 2014).

p21^{Cip} направляет сам себя на деградацию, связываясь своим С-концом с одной из α -субъединиц 20S протеасомы (Touitou et al., 2001). Возможно, участие α -субъединицы в протеолизе указывает на основную причину деградации белков в 20S протеасоме в отсутствие регуляторных комплексов. Кроме того, недавно получены данные о том, что субстраты 20S протеасомы сами открывают канал протеолитической камеры (Liu et al., 2003). Кроме того, 20S протеасома играет исключительную роль в протеолизе окисленных белков, которые не могут быть гидролизованы с помощью 26S протеасомы даже в

присутствии убиквитина и АТФ. Возможно, деградации окисленного субстрата в 20S протеасоме способствует снижение гидрофобности поверхности белка в результате окисления. Также потенциальными субстратами 20S протеасомы могут быть и фрагменты белков, образованные в результате частичного гидролиза другими ферментами (Orlowski, Wilk, 2003).

Участие убиквитин-протеасомной системы в клеточных процессах

Клеточный цикл состоит из нескольких фаз, последовательная смена которых регулируется белками циклинами. Так как на каждой фазе действует собственный регулятор, жизнь его должна иметь определенную продолжительность. 26S протеасома распознает меченные специальным маркером белки и обеспечивает их протеолиз.

Под действием 26S протеасомы расщепляются белковые молекулы. Однако выяснилось, что протеолизу может подвергаться даже отдельная субъединица в сложном белковом комплексе. Частичный протеолиз осуществляется в процессе двухступенчатой активации ядерного фактора (его обозначают NF- κ B), который контролирует транскрипцию. Сначала в результате гидролиза протеасомой образуется из своего предшественника субъединица p50 этого фактора. Затем она, еще одна субъединица – p65 – и белок-ингибитор I κ B объединяются в неактивный комплекс. Транскрипция становится возможной после деградации 26S протеасомой ингибитора I κ B, перед этим фосфорилированного в двух местах (Abramova et al., 2002).

Участие протеасомы в иммунном ответе клетки – один из наиболее активно изучаемых аспектов работы 26S частицы. Гидролизуя аномальные или чужеродные белки до полипептидов, протеасома поставляет некоторые из них (обычно длиной от восьми до 11 аминокислот) в качестве антигенов. Для повышения эффективности защитной активности организма образуются иммунопротеасомы – протеасомы, в которых каталитические β -субъединицы замещены на β i-субъединицы (они называются индуцибельными) (Цимоха, 2010). В результате подобной модификации количество образуемых протеасомой полипептидов – потенциальных антигенов – возрастает в несколько раз.

Запрограммированная клеточная смерть (или апоптоз) – один из важнейших защитных процессов, который обеспечивает контроль за количеством клеток и постоянством состава тканей в организме. Таким способом разрушаются опаснейшие для организма клетки: зараженные вирусами, раковые, с нарушенной ДНК. Механизмы апоптоза очень консервативны, одинаковы у низших эукариот и млекопитающих и представляют собой сложную систему последовательных молекулярных событий,

которые, в конечном счете, приводят к энзиматической фрагментации хромосомной ДНК и смерти клетки. И хотя в апоптозе работают свои специфические протеазы (каспазы), обнаружена связь данного процесса с протеасомной деградацией белков (Цимоха, 2010).

Данную связь изучают при помощи ингибиторов активности протеасомы интенсивнее всего в исследованиях онкогенеза. Оказалось, что, снижая уровень активности ядерного фактора транскрипции (NF- κ B), такие ингибиторы могут запускать апоптоз трансформированных клеток, предотвращать ангиогенез (разрастание кровеносных капилляров в раковой ткани) и метастазирование *in vivo*. Это результат того, что снижение каталитической активности протеасомы приводит к накоплению ингибиторов роста клетки и проапоптозных белков. Неразрушенные ингибированной протеасомой короткоживущие белки, такие как p53 и p27, тоже способны запустить в клетке каскад биохимических и морфологических событий, ведущих к апоптозу. Однако ингибиторы протеасомы могут и предотвращать его, например, в первичных клеточных культурах, если он вызван какими-то другими стимулами (Abramova et al., 2002).

В нормальной здоровой клетке белки, регулирующие скорость транскрипции, во многих случаях определяют ее дальнейшую судьбу – станет ли работать и делиться с запрограммированной для нее скоростью, пойдет ли по пути неконтролируемого злокачественного роста, будет ли разрушена как представляющая опасность. Поэтому такие регуляторные белки в зависимости от обстоятельств могут быть или онкобелками, или же, наоборот, онкосупрессорами. Пример подобных превращений — белок p53, уровнем которого поддерживается в здоровой клетке соотношение между процессами роста и апоптоза. Но все меняется, например, при заражении человека вирусом папилломы: вирусный белок E6 находит белок p53 и сигнализирует строго определенному ферменту из семейства E3 о необходимости присоединить к p53 убиквитиновую цепочку. Фермент выполняет свою функцию, и p53 становится субстратом для протеасомной деградации. В результате его ускоренного разрушения клетка идет по пути злокачественного перерождения (Abramova et al., 2002).

Многообразие тубулинов. Функции.

Белок α -тубулин, ассоциированный с протеасомами, относится к семейству тубулинов, в которое, помимо него, входят β -тубулин, γ - дельта- и ϵ -тубулины.

Основная функция α - и β -тубулинов в клетке – формирование димеров, являющихся структурными компонентами микротрубочек. Одной из главных функций микротрубочек является структурная – поддержание определенной формы клетки. Другой, не менее важной, является двигательная – участие в движении клеточных

органелл с помощью специальных белков, транслокаторов (Gelfand, 1989). Помимо транслокаторов существует целый ряд белков, связывающихся с микротрубочками в клетке. Именно ассоциированные с микротрубочками белки влияют на их свойства и функции, способствуют полимеризации и стабилизации микротрубочек (Vallee, 1984).

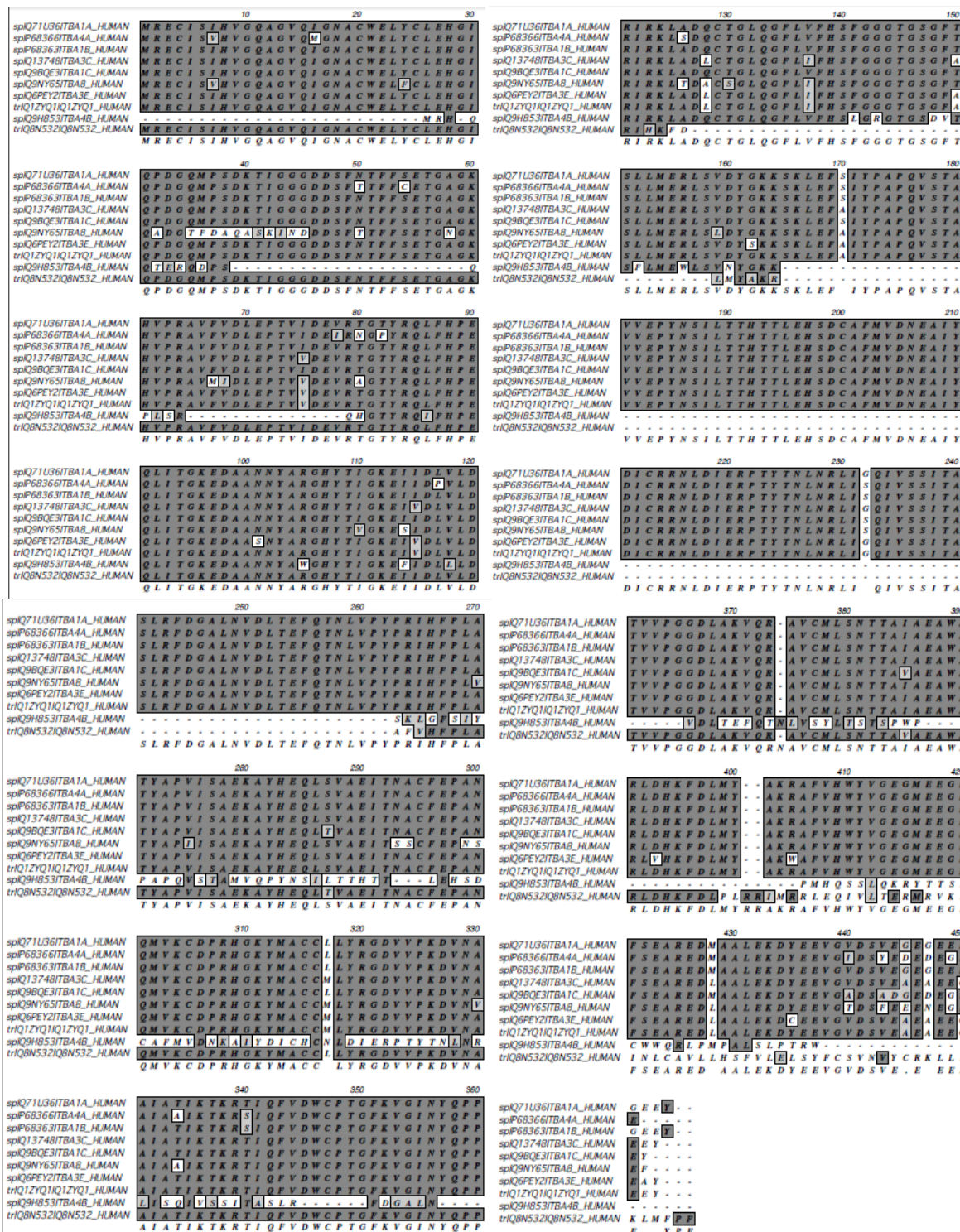


Рис.5. Многообразие и консервативность изоформ человеческого α -тубулина (данные получены из БД Uniprot).

Есть несколько генов α - и β -тубулинов, они высоко консервативны как между собой, так и между видами (Cleveland, Sullivan, 1985). Для многих белков семейства α -

тубулинов (49—50кДа) показано существование различных изоформ в результате альтернативного сплайсинга (Гельфанд, Розенблат, 1977) (рис.5).

Разнообразие изоформ α -тубулина оказывает влияние на динамику сборки микротрубочек. Помимо этого, разнообразие изоформ α - и β -тубулинов оказывает влияние на способность микротрубочек специфически связываться с теми или иными белками, что сказывается на изменении функций микротрубочек.

Важно отметить, что альтернативному сплайсингу подвергаются все α -тубулины кроме α -тубулина 6 (*TUBA1C*). Однако все изоформы α -тубулинов, получающиеся в результате альтернативного сплайсинга, имеют молекулярную массу 46 или 48 кДа – чуть меньшую, чем полноразмерные белки, кроме α -тубулина 1В-фрагмент (*TUBA1B*). В результате альтернативного сплайсинга образуется изоформа этого белка с молекулярной массой около 37 кДа, в которой отсутствуют аминокислоты 108-223. Таким образом, наблюдаемая нами укороченная форма α -тубулина может быть результатом не альтернативного сплайсинга, а протеасомного процессинга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа с клетками эукариот в культуре

Клеточные линии и культивирование клеток

Клетки миелогенной лейкемии человека линии K562 и клетки почки эмбриона человека линии HEK293, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), культивировали при 37 °С в среде соответственно RPMI-1640 и DMEM, содержащей 10 % сыворотки плодов коров, в присутствии пенициллина и стрептомицина. В экспериментах по аффинной очистке протеасом были использованы стабильные клеточные линии K562/ β 7-НТВН (Артамонова и др., 2014) и HEK293/Rpn11-НТВН (Wang et al., 2007), экспрессирующие рекомбинантные протеасомные белки β 7 и Rpn11, слитые на С-конце с полипептидом НТВН.

Молекулярно-биохимические и физико-химические методы

Приготовление клеточного экстракта

Клетки линий K562/ β 7-НТВН и HEK293/Rpn11-НТВН промывали охлажденным PBS и лизировали в буфере (50 мМ Na-фосфат, pH 7.5, 100 мМ NaCl, 10 % глицерина, 5 мМ АТФ, 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, 0.5 % NP-40, ингибиторы протеаз) в течение 30 мин при 4 °С. Клеточные фрагменты удаляли центрифугированием в течение 30 мин при 4 °С.

Аффинная очистка протеасом

Аффинно протеасомы очищали из клеток K562/ β 7-НТВН и HEK293/Rpn11-НТВН согласно описанному ранее протоколу (Wang et al., 2007). К клеточному экстракту добавляли стрептавидин-агарозу (Thermo Scientific, США) и инкубировали при 4 °С в течение ночи при постоянном перемешивании. Далее белки в комплексе со стрептавидин-агарозой осаждали центрифугированием и промывали последовательно 20 объемами лизирующего буфера, 10 объемами буфера ТЕВ (50 мМ Трис_НCl, pH 7.5, 10% глицерин). Затем протеасомы элюировали со стрептавидин-агарозы двумя объемами буфера ТЕВ в присутствии 0.1% TEV_протеазы (Sigma-Aldrich, США) в течение 1.5 ч при температуре 30 °С и концентрировали с помощью фильтров Amicon Ultra-0.5 (Millipore, США).

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-НCl,

250 мМ глицина и 0.1 % SDS. Пробы прогревали в течение 5 мин при 37 °С 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).

Иммуноблоттинг 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 °С. Для специфического выявления белков использовали следующие первичные антитела: anti-alpha7 mouse (1:1000, PW8110, Enzo, США), anti-Rpn2 mouse (1:1000, PW9270, Enzo BML), США, anti-alpha-tubulin mouse (1:6000, T6074, Abcam, США), anti-histidine rabbit (1:2000, ab9108, Abcam, США). После инкубации с первичными антителами мембрану промывали PBSt (3 раза по 10 мин), затем инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с вторичными антителами, после чего промывали мембрану, как описано выше. В качестве вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена использовали козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов (1) кролика (GAR-HRP) (1:10000, Sigma, США) или (2) мыши (GAM-HRP) (1:5000, 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).

Измерение пептидазной активности протеасом

Химотрипсин-подобная активность была измерена с помощью гидролиза флуорогенного пептида Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-амино-4-метилкумарина (АМС) (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 °С в течение часа. Концентрацию продукта гидролиза АМС 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 °С перед добавлением субстрата.

Масс-спектрометрический анализ

MALDI-ICR - масс-спектрометрический анализ проводили согласно описанному ранее протоколу (Артамонова и др., 2014), на ионно-циклотронном масс-спектрометре ионно-циклотронного резонанса с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией Varian 902-MS (Varian, США) в научно-исследовательском комплексе "Нанобиотехнологии" СПбГПУ.

Создание генетических конструкций

Тотальную клеточную РНК получали с использованием раствора Trizol согласно рекомендациям производителя (ThermoFisherScientific, США) из клеток линии K562. 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 Oligo dT или Random праймеров (Thermo Scientific, США) и обратной транскриптазы RT (Promega, США); реакцию проводили согласно протоколу фирмы-производителя. Полученную кДНК хранили при -20⁰С. Последовательность α -тубулина получена с соответствующей кДНК с помощью ПЦР по протоколу производителя (Thermo Scientific, США).

Полученный фрагмент α -тубулина выделен из агарозного геля после электрофоретического разделения и очищен с помощью набора GeneJETGelExtractionKit (ThermoFisherScientific, США). Клонирование в вектор pTriExTM-2 Hygro по сайтам рестрикции BglIII-MluI и NcoI-XhoI проведено с использованием рестриктаз BglIII, MluI, AscI, NcoI, XhoI согласно рекомендациям производителя (Сибэнзим, Россия). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки E. coli. Первичный отбор клонов на наличие вставки нужного размера проводили методом ПЦР с использованием прямого и обратного праймеров к α -тубулину. Отобранные положительные клоны были выделены и проанализированы с помощью рестриктаз EcoRI и AfeI (Сибэнзим, Россия). Плазмиду, содержащую фрагмент нужного размера, выделяли, и нуклеотидную последовательность вставки определяли с помощью финального секвенирования.

Аmplификация фрагментов ДНК методом ПЦР

Аmplификацию проводили по стандартной схеме с учетом температуры отжига праймеров, в соответствии с информацией, указанной в описании к ДНК-полимеразе

Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, США). Объем проб составлял от 20 мкл (скрининг колоний) до 50 мкл (для наработки фрагмента). Для объема 20 мкл реакционная смесь содержала 1 ед. Phusion High Fidelity DNA Polymerase (#F-530S, Thermo Scientific, США), буфер HP полимеразы, 0,5 мкг каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, и 1 мкл продуктов реакции ОТ- ПЦР продолжалась 30 циклов. Каждый цикл состоял из денатурации в течение 15 секунд при 95°C, отжига при соответствующей температуре в течение 30 сек и элонгации в течение 1.5 минут при 72°C.

Был проведен дизайн праймеров и для клонирования рекомбинантного α -тубулина (*TUBA4A*) использованы следующие праймеры:

Tм 69.7 °C прямой 3'BgIII-NcoI-TubA4A

AGCAAGATCTCCATGGGTGAATGCATCTCAGTCCACG

Tм 70.4 °C обратный 5'MluI-STOP-XhoI-TubA4A

CTTTACGCGTТАCTCGAGCTCTTCTCCCTCATCCTCGTC.

Рестрикционный анализ

Реакцию рестрикции проводили в соответствии с методиками производителей ферментов (Сибэнзим, Россия). Рестрикцию ПЦР продуктов проводили в течение 16 часов, плазмидной ДНК в течение 2 часов, в термостате при 37°C. Перед проведением реакции лигирования вектор обрабатывали щелочной фосфатазой FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (#EF0651, Thermo Scientific, США) – обычно добавляя фермент в последние 10 минут рестрикции, поскольку щелочная фосфатаза работает в буферах для рестрикции и это позволяет избежать потерь ДНК, связанных с дополнительной процедурой очистки.

Лигирование

Для лигирования использовали ДНК-лигазу фага T4 и стандартный буферный раствор (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя. Лигирование вели в объеме 10 или 20 мкл, при молярном соотношении вектора и вставки 1:10, в течение 1 часа при 22°C. Очистка фрагментов после энзиматических реакций и из агарозного геля проводилась с помощью набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit и Gene Get Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США). Затем лигазную смесь трансформировали методом теплового шока в компетентные клетки *E.coli* (*Top10*), соответственно. Для трансформации использовали 5-10 мкл лигазной смеси.

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для проведения электрофореза использовали 0.8% агарозный гель,

приготовленный на буфере TAE с добавлением капли бромистого этидия. Электрофорез вели в буфере TAE. Образцы наносили, предварительно смешав их на кусочке парафильма с буфером для нанесения (#R0611, Thermo Scientific, США). Использовали маркер GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific, США). По окончании электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 315 нм на трансиллюминаторе фирмы ETX-20M (Vilber Lourmat, Франция).

Элюция ДНК из геля

Фрагменты ДНК элюировали из агарозного геля. После завершения электрофореза, гель, содержащий бромистый этидий, визуализировали в ультрафиолетовом свете, далее вырезали нужный фрагмент геля. Очитку ДНК из геля осуществляли с помощью наборов Silica Bead DNA Gel Extraction Kit и Gene Get Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Выделение плазмидной ДНК

После трансформации колонии носиком переносили с чашки в 10 мл жидкой среды в 15 мл пробирках, где растили ночь на шейкере при температуре 37°C. Выделение плазмидной ДНК осуществлялось с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителей. Концентрацию полученной плазмиды определяли на спектрофотометре NanoDrop (США) при длине волны 260 нм.

Секвенирование плазмидной ДНК

Секвенирование плазмидной ДНК проводили в компании Евроген (Россия).

Протеолиз белков *in vitro*

Гидролиз белков (1-6 мкг) протеасомой осуществляли в объеме реакции 16 мкл в реакционной смеси, содержащей 20 мМ Tris (pH 7.5), 1 мМ DTT, 1 мМ АТР, 5 мМ MgCl₂, и очищенную 26S протеасому (0.5 мкг). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 24 часов, реакцию останавливали добавлением буфера для нанесения образцов для электрофореза по Лэммли. Образцы анализировали методом SDS-электрофореза с последующим окрашиванием Кумасси, а также Вестерн-блотингом. Был проведен гидролиз рекомбинантного α -тубулина (6 мкг), в качестве контролей использовались белки BSA (1 мкг) (ICN Biomedicals, США) и MBP (3 мкг), выделенный из мозга коровы, любезно предоставленный Кудряевой А.А. (Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.Ф. Овчинникова РАН, Москва). Для контроля за субстратной специфичностью очищенные протеасомы обрабатывали протеасомным

ингибитором MG132 в концентрации 100 мкМ в течение 15 мин при 0 °С перед добавлением субстрата.

Окрашивание геля серебром

В виду низкой концентрации белка 10% SDS ПААГ окрашивали с использованием AgNO₃. Фиксацию проводили в течение 1.5 ч буфере, содержащем 30% этанола, 0.5% уксусной кислоты. Далее гель промывали 40% этанолом 1 ч, 20% этанолом 10 мин. Гель обрабатывали 0.03% Na₂S₂O₃ 1 мин, затем окрашивали 0.2% AgNO₃ в течение 1 ч в темноте. Далее белковые полосы выявляли в проявляющем растворе (3% K₂CO₃, 0.01% Na₂S₂O₃, 0.07% формальдегид). Реакцию проявления останавливали промывкой геля 5% Tris-base, 0.3% уксусной кислоты.

Методы работы с бактериями *Escherichia coli*

Трансформация

Компетентные клетки *E.coli*, предварительно полученные по методу Rubidium Competent Cell Prep – Rich Roberts Lab Group, хранившиеся при -70°C, размораживали на льду. К 50 мкл клеток добавляли 100 нг ДНК, перемешивали, 15 минут инкубировали на льду, 2 минуты прогревали для создания условий теплового шока при температуре 42°C в термостате BIOSAN Bio TDB-120, 5 минут держали на льду. Далее клетки переносили в 1 мл среды LB комнатной температуры без антибиотиков, инкубировали в воздушном термостате при 37°C 1 час для репарации клеточной стенки и начала экспрессии генов устойчивости к селективным антибиотикам. Далее высевали на чашку Петри с добавлением ампицилина, оставляли на 14-16 часов в термостате при температуре 37°C. Анализ клонов проводили методом ПЦР, рестрикции и секвенирования.

Ночная культура

Бактериальную колонию помещали в 5 или 10 мл среды LB или с добавлением селективного ампицилина, наращивали клетки при 37°C и интенсивной аэрацией в течение ночи.

Выделение и очистка рекомбинантного α -тубулина

Для проведения препаративной экспрессии компетентные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) были трансформированы методом теплового шока конструкцией, содержащей нуклеотидную последовательность необходимого рекомбинантного α -тубулина в составе вектора pTriEx™-2 Nugro. Экспрессию белка и его очистку проводили согласно протоколу, описанному ранее (Mane et al., 2013), модифицировав его. Культуру клеток

выращивали в среде LB с добавлением ампицилина (100 мкг/мл) при 37°C до оптической плотности 0.6-0.8 в течение 5-6 часов, затем культуру охлаждали до 25°C и индуцировали экспрессию белка добавлением 0.5 мМ ИПТГ в течение 18 ч при 25°C. Клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 4°C 6000 g, (ротор F630, Allegra, Beckman Coulter, США). Выделение белка проводили из нерастворимых телец включения в денатурирующих условиях. Осадок из 200 мл культуры с экспрессированным тубулином растворяли в 6 мл буфера А (50 мМ Tris, 50 мМ MgSO₄, 50 мМ NaCl, pH 8.8) и лизировали с помощью ультразвука с использованием прибора 130-Watt Ultrasonic Processor (Cole-Parmer, США) в течение 4, 9, 15 секунд при мощности 45% на льду. Затем центрифугировали при 4°C 12000 g в течение 20 минут. После удаления супернатанта, осадок, содержащий тельца включения, последовательно промывали буфером А с добавлением 0.1% Triton X-100, 25% glycerol, 500 мМ NaCl, и 2 М Urea в качестве отдельной добавки при каждой отмывке. После каждой отмывки тельца включения осаждали центрифугированием при 4°C 12000 g в течение 20 минут и убирали супернатант. Очищенный осадок растворяли в буфере В (50 мМ Tris, 50 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, 8 М Urea, 10 мМ beta-mercaptoethanol, pH 8.8) и инкубировали при комнатной температуре в течение 16 часов. На следующий день белок осаждали центрифугированием при 25°C 33000 g в течение 1 часа (Avanti J-E Series, JA 25-50, Beckman Coulter, США). Рефолдинг тубулина проводили методом быстрого разбавления (1:10 V/V) в буфере С (50 мМ Tris, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgSO₄, 1 мМ CaCl₂, pH 8.8) с добавлением 5 мМ имидазола. Далее добавляли предварительно уравновешенные в связывающем буфере Ni-сефарозные шарики (#10236700 GE Healthcare, Швеция) и инкубировали в течение ночи при 4°C при постоянном перемешивании. После связывания шарики промывали буфером D (50 мМ Tris, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgSO₄, 1 мМ CaCl₂, 10 мМ имидазола, pH 7.2) и элюировали тубулин градиентом имидазола 100-500 мМ. Фракции, содержащие белок, были определены с помощью SDS-электрофореза и окрашивания Кумасси. Белок концентрировали с помощью фильтров Amicon Ultra-0.5 (10K NMWL, Millipore, США) и промывали буфером E (25 мМ Tris, 25 мМ NaCl, 10 мМ MgSO₄, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂, pH 7.3). Концентрацию белка измеряли по методу Бредфорд.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Масс-спектрометрический анализ аффинно-очищенных протеасом

Метод аффинной очистки протеасом позволяет добиться быстро и эффективно наиболее высокой степени очистки протеасомных комплексов. Протеасомы были выделены из клеточной линии K562/ β 7-НТВН, стабильно экспрессирующей субъединицу 20S протеасомы β 7, меченную по С-концу сложным полипептидом НТВН (Артамонова и др., 2014). Пептид включает два фрагмента из шести гистидинов (His), специфический сайт расщепления TEV-протеазой и сигнальную последовательность биотинилирования *in vivo* (Wang et al., 2007). В очистке протеасом использовали метод нековалентного связывания – образование комплекса биотина со стрептавидином с последующей элюцией посредством TEV-протеазы. Протеасомные белки комплексов разделяли в системе денатурирующего электрофореза и визуализировали с помощью окрашивания Кумасси G-250 (рис. 6). Для сравнения качества очистки протеасом аффинным методом были использованы протеасомы, очищенные с помощью последовательного фракционирования.

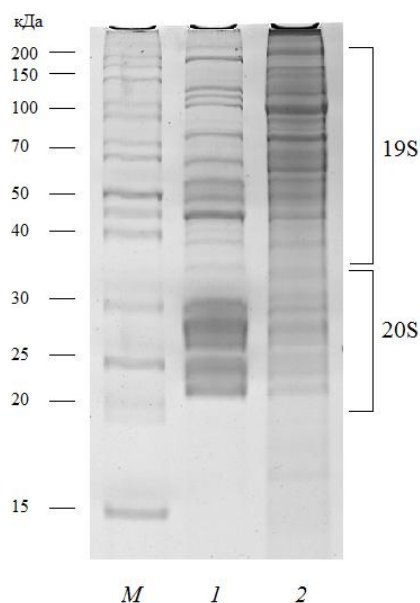


Рис.6. Электрофоретическое разделение белков протеасом, аффинно-очищенных из клеток K562/ β 7-НТВН (1) и очищенных из клеток K562 с помощью последовательного фракционирования (2). Денатурирующий электрофорез в 13% ПААГ 10 мкг очищенных протеасом. Окраска геля Кумасси G-250, М – маркеры мол.масс.

Для подтверждения структурно-функциональной целостности аффинно-очищенных 26S протеасом, был проведен анализ их пептидазной активности по типу химотрипсина (рис. 7) с помощью гидролиза флуорогенного пептида Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-амино-4-метилкумарина (АМС) (3-H2505p, Enzo Life Sciences, США).

Чтобы охарактеризовать белки, ассоциированные с аффинно-очищенными протеасомными комплексами, был проведен MALDI-ICR-масс-спектрометрический

анализ. Белки протеасом, аффинно-очищенных из клеток K562/ β 7-НТВН, разделяли в системе денатурирующего электрофореза и визуализировали в геле окраской Кумасси G-250, после чего окрашенные полосы вырезали из геля (рис. 8).

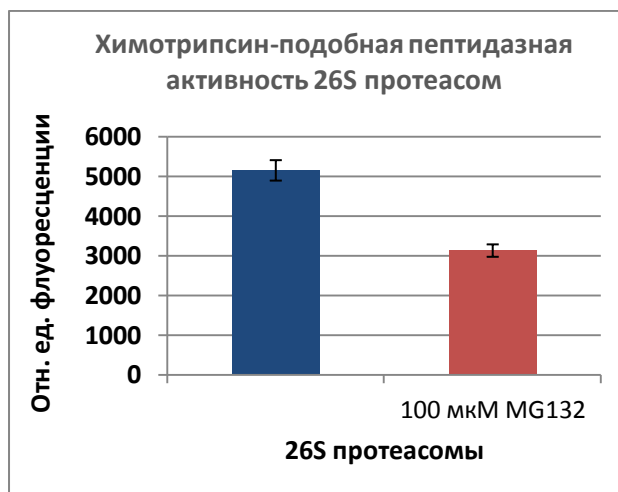


Рис. 7. Измерение химитрипсин-подобной активности аффинно-очищенных 26S протеасом.

Белки, содержащиеся в полосках геля, подвергали воздействию трипсина и анализировали методом MALDI-ICR-масс-спектрометрии. По данным масс-спектрометрического анализа были определены 16 ассоциированных с протеасомами белков, включая такие белки цитоскелета, как актин, α - и β -тубулины, α -актинин 4 (Иванова и др., 2017) (Приложение А). Важно отметить, что в составе аффинно-очищенных протеасом снова был обнаружен α -тубулин, что исключает вопрос о его неспецифическом взаимодействии с протеасомами.

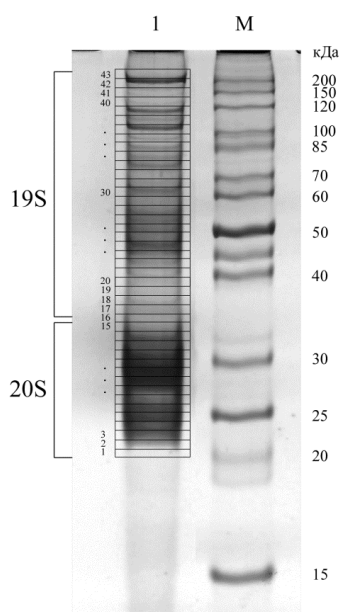


Рис. 8. Электрофоретическое разделение белков протеасом, аффинно-очищенных из клеток K562/ β 7-НТВН. Денатурирующий электрофорез в 13% ПААГ 10 мкг очищенных протеасом (1). Окраска геля Кумасси G-250, М – маркеры мол.масс.

Верификация масс-спектрометрических данных с помощью иммуноблотинга

Проведенный Вестерн-блот анализ с применением антител, специфичных к α -тубулину (*TUBA4A*), показал присутствие в комплексе с аффинно-очищенными протеасомами укороченной формы α -тубулина с молекулярной массой, соответствующей примерно 40 кДа (рис. 9, а). Чтобы исключить возможность того, что наблюдаемое взаимодействие протеасом с укороченной формой тубулина является особенностью лишь миелоидных клеток, были проанализированы протеасомы из клеток почки эмбриона человека линии HEK293/Rpn11-НТВН (Wang et al., 2007). Эта стабильная клеточная линия экспрессирует субъединицу 19S протеасомы Rpn11, меченную по С-концу тем же полипептидом НТВН. Протеасомы также очищали аффинным способом и разделяли в системе денатурирующего электрофореза. Вестерн-блот анализ с использованием антител к α -тубулину вновь выявил присутствие укороченной формы α -тубулина в комплексе с аффинно-очищенными протеасомами (рис. 9, б).

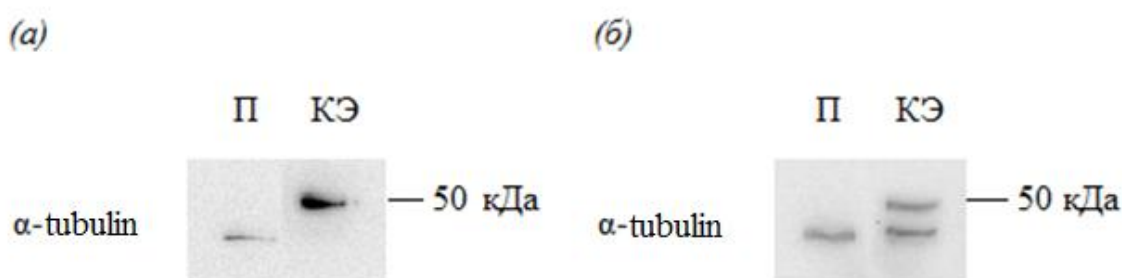


Рис.9. Вестерн-блот-анализ белков, ассоциированных с аффинно-очищенными протеасомами (П) из клеток линии K562/ β 7-НТВН (а) и клеток линии HEK293/ Rpn11-НТВН (б); КЭ - клеточный экстракт.

Наблюдаемая нами укороченная форма α -тубулина может быть как результатом альтернативного сплайсинга, так и следствием процессинга белка при взаимодействии с протеасомами. Данные масс-спектрометрии были проанализированы на предмет анализа аминокислотной последовательности α -тубулина в комплексе с аффинно-очищенными протеасомами. На рис. 10 представлена последовательность α -тубулина (*TUBA4A*), на котором красным цветом выделены пептиды, которые не были обнаружены с помощью масс-спектрометрии. В соответствии с БД Uniprot для α -тубулина (*TUBA4A*) известна одна изоформа белка, полученная в результате альтернативного сплайсинга, в которой отсутствуют 1-15 аминокислотные остатки. В результате проведенного масс-спектрометрического анализа очищенных протеасом не идентифицированы 4 участка последовательности α -тубулина (*TUBA4A*): 1-40 а. к., 124-156 а. к., 165-214 а. к., и 403-448 а. к. Поскольку в идентифицированной с помощью масс-спектрометрии последовательности α -тубулина (*TUBA4A*) отсутствуют оба концевых фрагмента белка, мы не можем

исключать вероятность появления наблюдаемой укороченной формы α -тубулина в результате его процессинга протеасомами.

```
MRECISVHVGQAGVQMGNACWELYCLEHGIQPDGQMP SDKTIGGGD
DSFTTFFCETGAGKHVPRAVFDLEPTVIDEIRNGPYRQLFHPEQLITG
KEDAANNYARGHYTIGKEIDPVLRIKLS DQCTGLQGFLVFH SFGGG
TSGGFTSLLMERLSVDYGGKSKLEFSIYPAPQVSTADVVEPYN SILTTH
TTLEHSDCAFMDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLISQIVSSITASL
RFDGALNVDLTFEQTNLVPYPRIHFPLATYAPVISA EKAYHEQLSVAEIT
NACFEPANQMVKCDPRHGKYM ACCLLYRGDVVPKDVNA AIAAIKTK
RSIQFVDWCPTGFKVGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAIA
EAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYV GEGMEEGEFSEAREDMAALEK
DYEEVGIDS YEDEDEGEE
```

<u>1-40</u>	<u>(-)MRECISVHVGQAGVQMGNACWELYCLEHGIQPDGQMP SDK(T)</u>	N-концевой пептид
124-156 165-214	(R)KLS DQCTGLQGFLVFH SFGGGTSGGFTSLLMER(L) (K)SKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYN SILTTHTTLEHSDCAFMDNEAIYDICR(R)	
<u>403-448</u>	<u>(R)AFVHWYV GEGMEEGEFSEAREDMAALEKDYEEVGIDS YEDEDEGEE</u>	C-концевой пептид

Рис.10. Анализ пептидной последовательности альфа-тубулина, идентифицированной с помощью MALDI-ICR.

Создание генетических конструкций для экспрессии рекомбинантного α -тубулина

Для проверки гипотезы процессинга α -тубулина протеасомами была запланирована очистка экспрессированного в бактериях рекомбинантного α -тубулина человека (*TUB4A4*), у которого концы были бы модифицированы аффинной последовательностью. Для этой цели подобраны специфические для α -тубулина человека (*TUB4A4*) праймеры. С помощью ПЦР последовательность α -тубулина синтезирована с соответствующей кДНК, полученной методом обратной транскрипции с матрицы РНК, очищенной из клеток линии K562 (рис. 11). Интересно, что использование случайных праймеров в реакции обратной транскрипции не позволило амплифицировать последовательность α -тубулина, поэтому для получения кДНК были использованы олиго(дТ) праймеры.

Полученный фрагмент тубулина клонирован в вектор pTriEx™-2 Hygro (рис. 12 а) по сайтам рестрикции BglII-AscI (рис. 12 б) и NcoI-XhoI (рис. 12 в). Данный вектор позволяет экспрессировать встроенный в него экзоген в клетках *E. coli*, насекомых и позвоночных. Такая многосистемная экспрессия возможна благодаря уникальной конструкции ДНК pTriEx-2 Hygro. ДНК pTriEx™-2 Hygro содержит промотор млекопитающего (Chicken b-actin, или CMVie), промотор насекомого (p10) и промотор *E.coli* (T7lac).

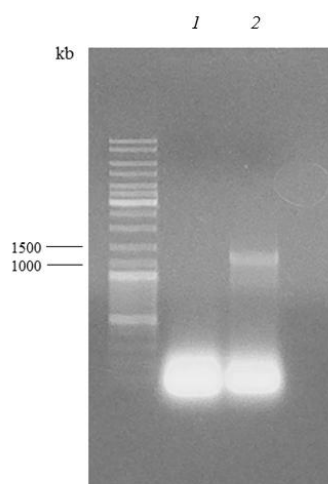


Рис.11. Амплификация с помощью ПЦР гена *TUBA4A* с кДНК, полученной с использованием random primers (1) и oligodT primers (2).

Сигналы инициации трансляции включают сайт связывания рибосом (rbs) для бактериальной экспрессии, за которым следует консенсусная последовательность Козак для экспрессии клеток млекопитающих. ДНК рTriEx™-2 Hygro содержит обширную область клонирования, N-концевые метки слияния (S- и His- последовательности), сигнальные последовательности, сайты расщепления протеазами и С-концевые метки слияния (HSV- и His-последовательности). Стабильный отбор достигается путем трансляции как целевого гена, так и гена селективного маркера нисходящего потока, в частности гигромицина (Hygro).

Таким образом, были созданы два экспрессирующих вектора: один кодирует α -тубулин, слитый с полигистидиновой меткой на N-конце, обозначен как His- α Tub (8459 bp) (рис.12 б), второй – α -тубулин, слитый с полигистидиновой меткой на С-конце, обозначен как α Tub-His (8151 bp) (рис.12 в).

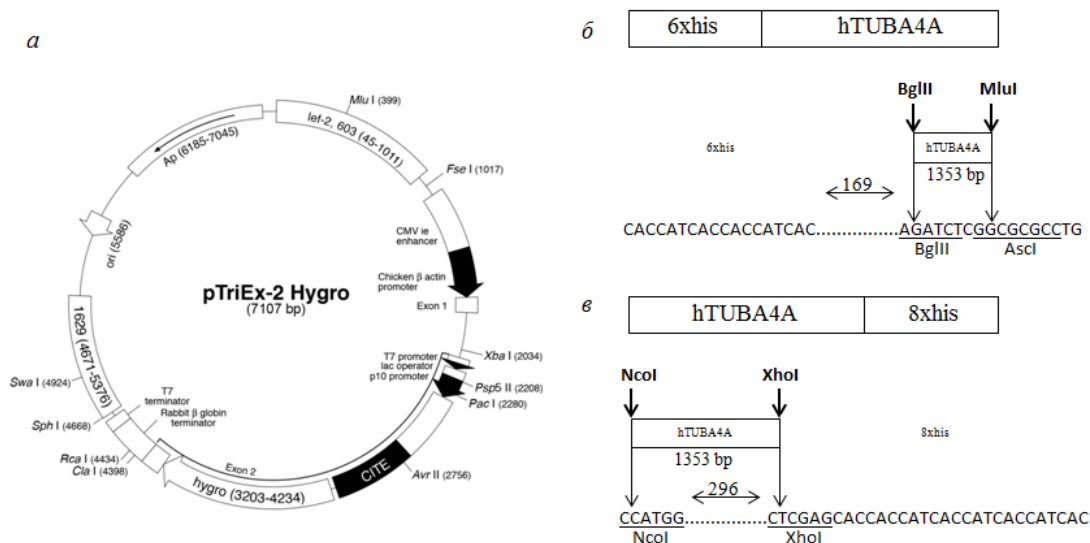


Рис.12. Вектор рTriEx™-2 Hygro (а), дизайн генной конструкции для получения рекомбинантного α -тубулина, слитого с гистидиновой меткой на N-конце (б) и С-конце (в).

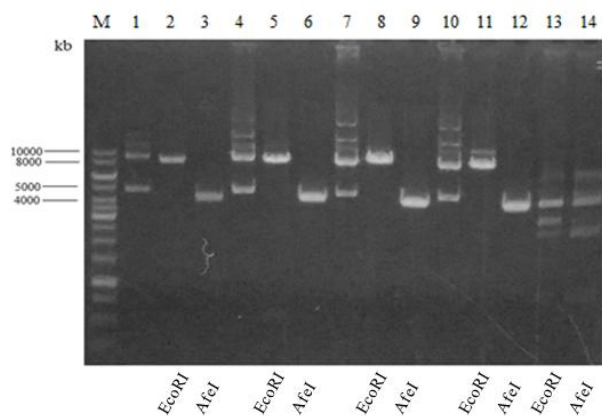


Рис.13. Проверка результатов клонирования рестрикционным анализом с помощью рестриктаз EcoRI и AfeI. М - маркер, дорожки 1-3 вектор рTriEx™-2-His-Tub) клон 7, 4-6 вектор рTriEx™-2- His-Tub клон 14, 7-9 вектор рTriEx™-2-Tub-His) клон 2, 10-12 - вектор рTriEx™-2-Tub-His клон 6, 13,14 - рDNA

Экспрессионные конструкции, кодирующие модифицированный α -тубулин, доставлены трансформацией в бактериальные клетки *E. Coli* для наработки достаточного количества плазмид. Очищенные плазмидные ДНК были проанализированы при помощи рестрикционного анализа (рис.13) по сайтам EcoRI и AfeI и итоговым секвенированием.

Подбор условий для экспрессии и очистки рекомбинантных α -тубулинов

Далее были подобраны условия экспрессии рекомбинантных α -тубулинов в бактериях для последующей их аффинной очистки с использованием никелевых шариков с дальнейшей элюцией белка с аффинного носителя буфером в присутствии имидазола (рис. 14).

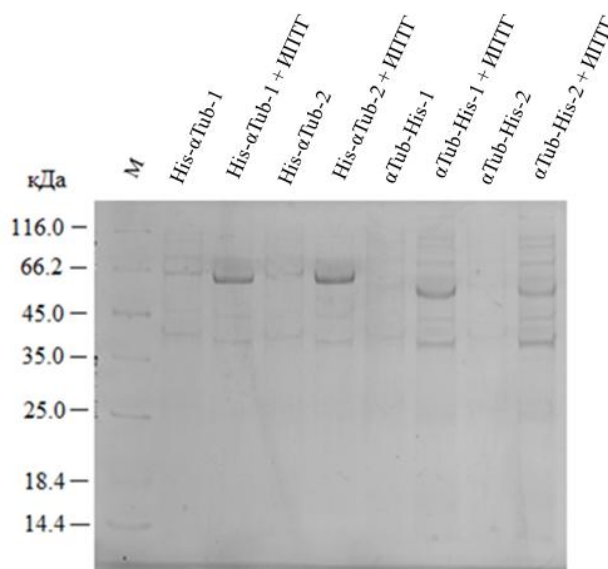


Рис.14. Электрофоретическое разделение белков для проверки эффективности экспрессии рекомбинантного тубулина в бактериях, индуцированной добавлением ИПТГ. М - маркеры мол.масс, His- α Tub - α -тубулин, слитый с полигистидиновой меткой на N-конце (клон 1 и 2), α Tub-His - α -тубулин, слитый с полигистидиновой меткой на С-конце (клон 1 и 2).

Несмотря на высокую индукцию сверхэкспрессии рекомбинантных α -тубулинов в бактериях, обнаружено, что α -тубулин агрегирует с образованием телец включения, представляющих собой нерастворимую фракцию, поэтому очистка таких белков в нативных условиях невозможна. Выделение белков из телец включения возможно в денатурирующих условиях с последующим восстановлением структуры белка одним из способов рефолдинга, как, например, разведение белкового раствора, диализ или хроматография. Выделение белков в денатурирующих условиях и восстановление его четвертичной структуры представляет собой очень трудоемкий процесс, требующий предварительной подготовки и оптимизации процесса, однако, плюсами использования именно бактериальной системы являются отсутствие у *E. coli* эндогенного тубулина и высокий выход рекомбинантного белка (Minoura, 2017). Протокол для экспрессии и очистки рекомбинантного α -тубулина (*TUBA1A*) (Mane et al., 2013) был оптимизирован, что позволило очистить рекомбинантный α -тубулин (*TUBA4A*) слитый с гистидиновой последовательностью на С- или N-конце (рис.15).

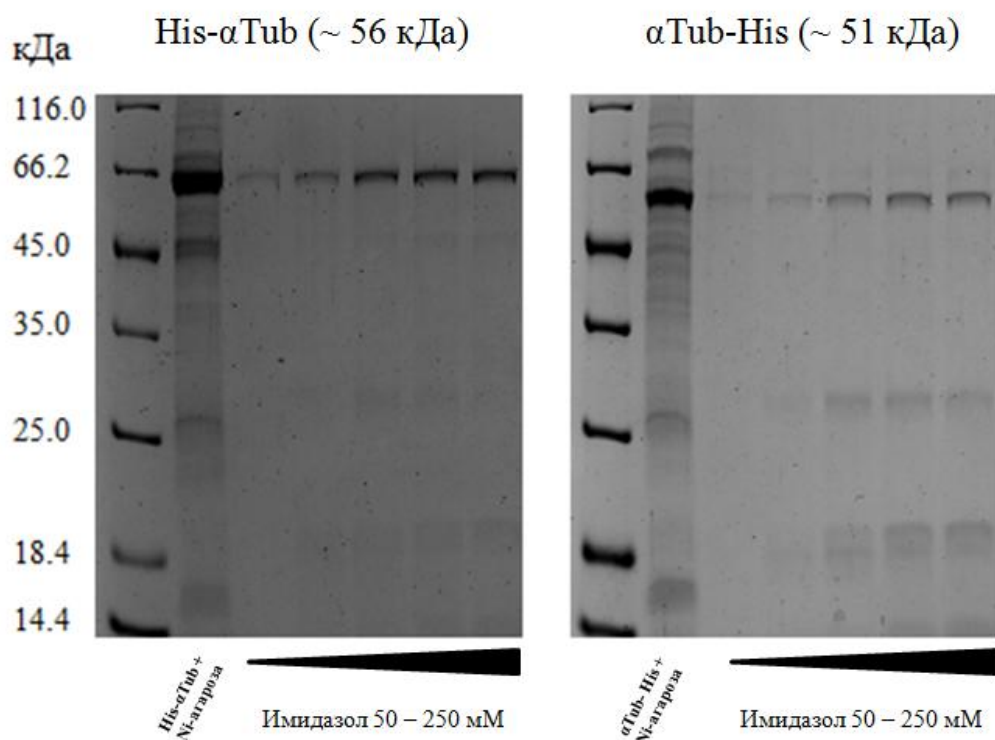


Рис.15. Анализ эффективности очистки рекомбинантного тубулина, экспрессированного в *E.coli*, при помощи разделения белков в системе денатурирующего электрофореза.

Проверка результатов очистки рекомбинантного α -тубулина Вестерн-блот анализом

Очищенные рекомбинантные α -тубулины His-Tub и Tub-His были проверены Вестерн-блотингом с использованием антител, специфичным к α -тубулину и полигистидиновой метке (рис.16).

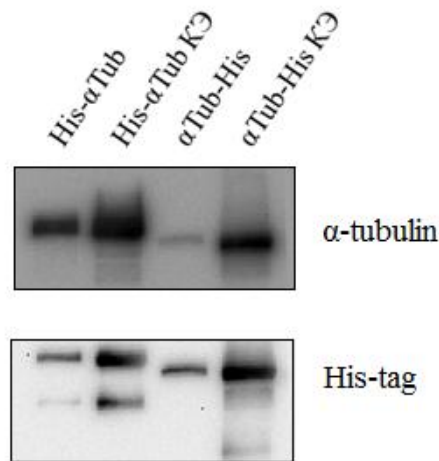


Рис. 16. Вестерн-блот анализ очищенного рекомбинантного α -тубулина и клеточного экстракта (КЭ с применением антител, специфичных к α -тубулину и гистидину. His- α Tub - α -тубулин, слитый с полигистидиновой меткой на N-конце, α Tub-His - α -тубулин, слитый с полигистидиновой меткой на C-конце.

Рекомбинантные α -тубулины His- α Tub и α Tub-His были выявлены на электрофореграмме на ожидаемом уровне, с массами около 60 и 56 кДа, соответственно; обе конструкции так же несли полигистидиновую метку.

Протеолиз α -тубулина протеасомой *in vitro*

Согласно литературным данным α -тубулин расщепляется протеасомой по убиквитин-зависимому пути с участием убиквитин-лигаз parkin (Ren et al., 2003), MGRN1 (Srivastava, Chakrabarti, 2014). Данных об убиквитин-независимом протеолизе, как и о процессинге α -тубулина протеасомами на сегодняшний день нет. Поэтому нашей задачей было проверить убиквитин-независимую деградацию данного белка и возможный процессинг протеасомами в системе *in vitro*.

Очищенный рекомбинантный α -тубулин His- α Tub (8 мкг), несущий полигистидиновую последовательность на N-конце, и α Tub-His (10 мкг), несущий полигистидиновую последовательность на C-конце, инкубировали в специальном буфере с аффинно-очищенными протеасомами при 37°C в течение 24 часов. В качестве контролей использовали не подвергающийся убиквитин-независимому протеолизу протеасомами белки BSA (1 мкг) или лизоцим (1 мкг) Для контроля за субстратной специфичностью использовали специфический для протеасом ингибитор MG132.

В реакции протеолиза α Tub-His протеасомой *in vitro* в течение 6 и 24 часов не выявлено расщепления, и можно заметить, что рекомбинантный белок стабилен при температуре и не подвергается деградации (рис. 17). Однако отсутствие положительного контроля убиквитин-независимого протеолиза протеасомой затрудняло интерпретацию полученных результатов. В качестве положительного контроля нам был любезно

предоставлен к.б.н. А.А.Кудряевой (Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.Ф. Овчинникова РАН, Москва) очищенный белок МВР, выделенный из мозга коровы, для которого показан убиквитин-независимый протеолиз протеасомами (Belogurov et al., 2014). В реакцию протеолиза *in vitro* использовали 3 мкг очищенного белка МВР.

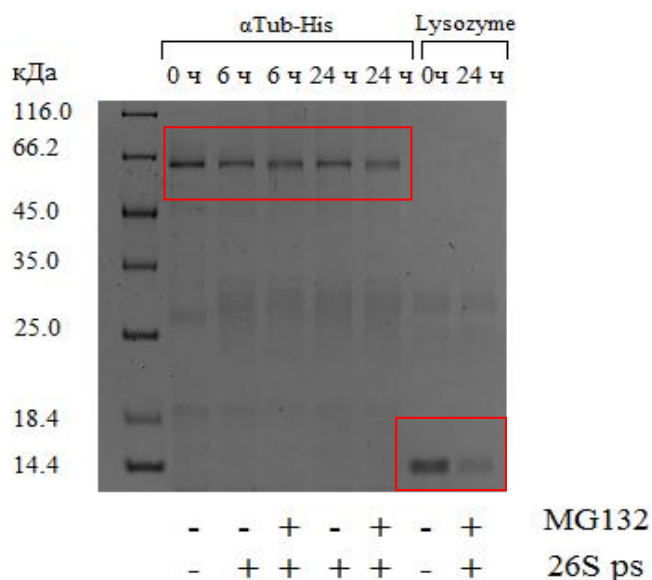


Рис. 17. Результат убиквитин-независимого протеолиза αTub-His и лизоцима протеасомой *in vitro*. Белки разделены в системе денатурирующего электрофореза, окрашивание Кумасси.

Последующие эксперименты протеолиза αTub-His протеасомой *in vitro* подтвердили предыдущий результат (рис.18). Белок αTub-His не подвергся гидролизу или процессингу протеасомой *in vitro*.

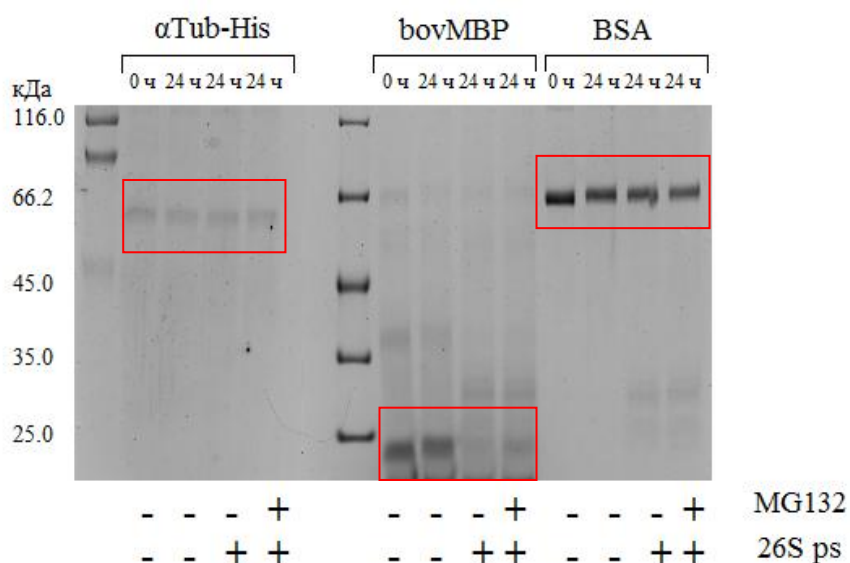


Рис. 18. Результат убиквитин-независимого протеолиза αTub-His, bovMBP и BSA протеасомой *in vitro*. Белки разделены в системе денатурирующего электрофореза, окрашивание Кумасси.

В результате реакции гидролиза *in vitro* His- α Tub оказалось, что и α -тубулин, несущий полигистидиновую метку на N-конце, также не расщепляется протеасомой убиквитин-независимо. Появления укороченной формы также не выявлено. Данный результат был подтверждён Вестерн-блот анализом с использованием антител, специфичным к α -тубулину и полигистидиновой метке (рис. 19).

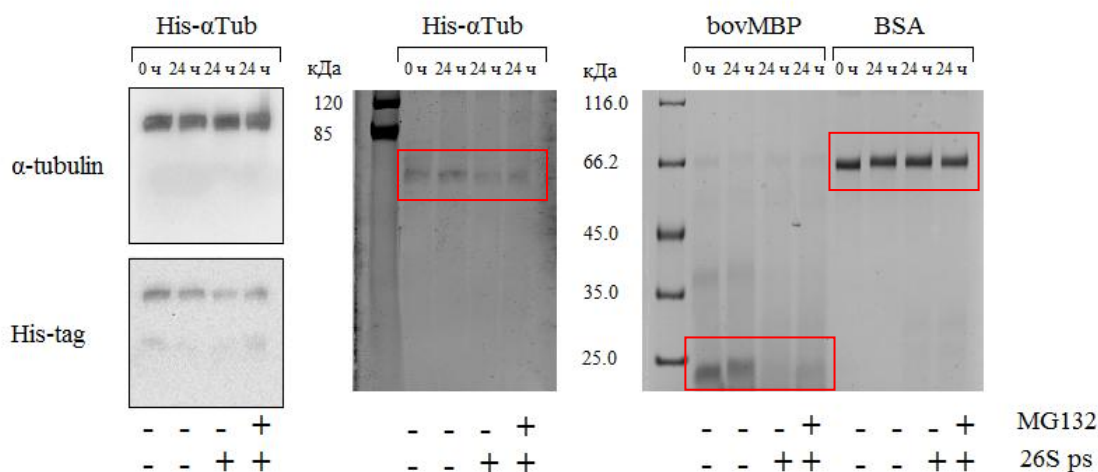


Рис.19. Гидролиз протеасомой His- α Tub, bovMBP и BSA *in vitro*; Вестерн-блоттинг (слева), окрашивание серебром (центр) окрашивание Кумасси (справа).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным, полученным ранее в нашей лаборатории с помощью iTRAQ-масс-спектрометрического анализа очищенных с помощью последовательного фракционирования протеасом из клеток линии K562, были определены 249 ассоциированных с протеасомами белков, среди которых присутствовали такие белки цитоскелета, как α - и β -тубулины, актин, α -актинин, миозин, филамин (Зайкова и др., 2013). Интересно, что подтверждение данных iTRAQ-масс-спектрометрии методом Вестерн-блот-анализа с использованием антител, специфичных к α -тубулину (*TUBA4A*), выявило присутствие в комплексе с очищенными протеасомами укороченной формы α -тубулина с молекулярной массой около 40 кДа, (Зайкова и др., 2013). Важно отметить, что в исследованиях других авторов число белков, ассоциированных с очищенными протеасомами, из других клеток и организмов было значительно меньшим и не превышало 50 (Verma et al., 2000; Guerrero et al., 2006; Horiguchi et al., 2006; Wang et al., 2007; Besche et al., 2009; Tai et al., 2010; Wang et al., 2011; Russell et al., 2013). В силу слишком большого числа выявленных в комплексе с очищенными протеасомами белков в данном исследовании, было предположено, что присутствие укороченной формы α -тубулина могло быть следствием неспецифического взаимодействия, протеолиза или

контаминации из-за недостаточной степени очистки протеасомных комплексов.

В современной литературе встречаются различные способы выделения и очистки протеасом (Leggett et al., 2005). Однако в основе всегда лежит один из трех подходов: биохимический способ очистки протеасом, иммуно-аффинный метод или метод аффинного связывания на сорбенте. Биохимический способ основывается на фракционировании белков с помощью центрифугирования, ступенчатом высаливании сульфатом аммония и последующем применении хроматографических методик. Иммуно-аффинный способ очистки подразумевает использование специфических для протеасом антител. Метод аффинной хроматографии основан на слиянии одной из протеасомных субъединиц со специальной меткой, способной специфически взаимодействовать с соответствующим носителем. Основным преимуществом этого метода является скорость получения очищенных протеасом. Кроме того, аффинная хроматография является наиболее подходящей для определения белков, ассоциированных с протеасомами, так как позволяет добиться наиболее высокой степени очистки в наиболее щадящих условиях (Leggett et al., 2005).

Таким образом, возникла задача использовать стратегию аффинной очистки протеасомных комплексов с последующим масс-спектрометрическим анализом белков, ассоциированных с протеасомой. Масс-спектрометрические эксперименты проводились с помощью MALDI-ICR-масс-спектрометра (ионно-циклотронного резонанса с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией), характеризующегося очень высокой точностью и разрешением.

Протеасомы выделяли из стабильной клеточной линии K562/ β 7-НТВН, экспрессирующей субъединицу 20S протеасомы β 7, меченную по С-концу пептидом НТВН (Артамонова и др., 2014). Пептид включает два фрагмента His₆, специфический сайт расщепления протеазой вируса TEV-протеазой и сигнальную последовательность биотинилирования *in vivo* (Wang et al., 2007). В очистке протеасом использовали метод нековалентного связывания – образование комплекса биотина со стрептавидином с последующей элюцией посредством TEV-протеазы. Протеасомные белки комплексов, очищенных вышеописанным способом разделяли в системе денатурирующего электрофореза и визуализировали с помощью окрашивания Кумасси G-250 (рис. 6).

Чтобы охарактеризовать белки, ассоциированные с аффинно-очищенными протеасомными комплексами, был проведен MALDI-ICR-масс-спектрометрический анализ. Результаты масс-спектрометрического анализа определили все белки 26S протеасомы и 16 ассоциированных с протеасомами белков, включая такие белки цитоскелета, как актин, α - и β -тубулины, α -актинин 4 (Приложение А). Такое небольшое

количество идентифицированных белков, ассоциированных с протеасомами, против 300 белков, идентифицированных ранее с помощью iTRAQ-масс-спектрометрии (Зайкова и др., 2013) доказывает, что метод аффинной очистки протесом для дальнейшего анализа этих комплексов с помощью методов масс-спектрометрии или Вестерн-блот-анализа является наиболее подходящим для изучения ассоциированных с протеасомой белков. Важно отметить, что в составе аффинно-очищенных протесом снова был обнаружен α -тубулин, что исключает вопрос о его неспецифическом взаимодействии с протеасомами.

Проведенный Вестерн-блот-анализ с применением антител, специфичных к α -тубулину (*TUBA4A*), как и ранее, показал присутствие в комплексе с аффинно-очищенными протеасомами укороченной формы α -тубулина с молекулярной массой, соответствующей 40 кДа (рис. 9, а). Для того чтобы исключить возможность того, что наблюдаемое взаимодействие протесом с укороченной формой тубулина является особенностью лишь миелоидных клеток, мы проанализировали протесомы из клеток почки эмбриона человека линии HEK293/Rpn11-НТВН. Эта стабильная клеточная линия экспрессирует субъединицу 19S протесомы Rpn11, меченную по С-концу тем же пептидом НТВН. Протесомы также очищали аффинным способом и разделяли в системе денатурирующего электрофореза. Вестерн-блот-анализ с использованием антител к α -тубулину вновь выявил присутствие укороченной формы α -тубулина в комплексе с аффинно-очищенными протесомами (рис.9, б).

Основная функция α - и β -тубулинов в клетке – формирование микротрубочек. Основными функциями микротрубочек являются структурная и двигательная – участие в движении клеточных органелл с помощью специальных белков, транслокаторов (Gelfand, 1989). Помимо транслокаторов существует целый ряд белков, связывающихся с микротрубочками в клетке. Именно ассоциированные с микротрубочками белки влияют на их свойства и функции, способствуют полимеризации и стабилизации микротрубочек (Vallee, 1984). Есть несколько генов α - и β -тубулинов, они высоко консервативны как между собой, так и между видами (Cleveland, Sullivan, 1985). Для многих белков семейства α -тубулинов (48—49 кДа) показано существование различных изоформ в результате альтернативного сплайсинга (Гельфанд, Розенблат, 1977). Разнообразие изоформ α -тубулина оказывает влияние на динамику сборки микротрубочек (Villasante et al., 1986). Помимо этого, разнообразие изоформ α - и β -тубулинов оказывает влияние на способность микротрубочек специфически связываться с теми или иными белками, что сказывается на изменении функций микротрубочек.

Поскольку обнаруженная нами изоформа α -тубулина находится в комплексе с протесомой, мультисубъединичной протезазой, можно предположить, что это является

следствием частичного гидролиза полноразмерного α -тубулина протеасомами В литературе встречаются данные о процессинге белков в протеасомах (Сорокин и др., 2009). Например, обнаружено, что субъединица p50 транскрипционного фактора NF- κ B образуется из предшественника p105 в результате процессинга протеасомами (Chen, 2005). Еще один пример белкового процессинга протеасомами – ДНК/РНК-связывающий ядерно- цитоплазматический белок клеток животных YB-1, принимающий участие практически во всех ДНК- и мРНК-зависимых процессах. Он расщепляется АТР- и убиквитин-независимо 20S протеасомой по пептидной связи после остатка Glu- 219 на два фрагмента (Skabkin et al., 2006). Другой пример - процессинг факторов инициации трансляции - eIF4G и eIF3A (Jackson, 2005).

Наблюдаемая нами укороченная форма α -тубулина может быть как следствием процессинга белка при взаимодействии с протеасомами, так и результатом альтернативного сплайсинга. Важно отметить, что альтернативному сплайсингу подвергаются все α -тубулины кроме α -тубулина 6 (*TUBA1C*). Однако все изоформы α -тубулинов, получающиеся в результате альтернативного сплайсинга, имеют молекулярную массу 46 или 48 кДа – чуть меньшую, чем полноразмерные белки, кроме α -тубулина 1B-фрагмент (*TUBA1B*). В результате альтернативного сплайсинга образуется изоформа этого белка с молекулярной массой около 37 кДа, в которой отсутствуют аминокислоты 108-223. Таким образом, наблюдаемая укороченная форма α -тубулина может быть результатом не альтернативного сплайсинга, а протеасомного процессинга.

Данные масс-спектрометрии были проанализированы на предмет анализа аминокислотной последовательности α -тубулина в комплексе с аффинно-очищенными протеасомами. На рис. 10 представлена последовательность α -тубулина (*TUBA4A*), на котором красным цветом выделены пептиды, которые не были обнаружены с помощью масс-спектрометрии. В соответствии с БД Uniprot для α -тубулина (*TUBA4A*) известна одна изоформа белка, полученная в результате альтернативного сплайсинга, в которой отсутствуют 1-15 аминокислотные остатки. В результате проведенного масс-спектрометрического анализа очищенных протеасом не идентифицированы 4 участка последовательности α -тубулина (*TUBA4A*):

1. 1-40 а. к.

(-)MRECISVHVGQAGVQMGNACWELYCLENHGIQPDGQMPSDK(T)

2. 124-156 а. к.

(R)KLSDQCTGLQGFLVFHSFGGGTGSGFTSLLMER(L)

3. 165-214 а. к.

(K)SKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFMDNEAIYDICR(R)

4. 403-448 а. к.

(R)AFVHWYVGEGMEEGEFSEAREDMAALEKDYEEV GIDSYEDEDEGE(-)

Поскольку в идентифицированной с помощью масс-спектрометрии последовательности α -тубулина (*TUBA4A*) отсутствуют оба концевых фрагмента белка, мы не можем исключить вероятность появления наблюдаемой укороченной формы α -тубулина в результате его процессинга протеасомами.

Для проверки гипотезы о частичном протеасомном протеолизе α -тубулина была создана экспрессионная конструкция, кодирующая человеческий α -тубулин (*TUBA4A*), слитый с полигистидиновой последовательностью на С- или N-конце (рис. 12). Рекombинантный α -тубулин был экспрессирован и очищен в *E.coli* с использованием взаимодействия полигистидиновой метки с Ni^{2+} (рис. 15).

При проверке очищенного тубулина Вестерн-блот-анализом со специфическим для α -тубулин (*TUBA4A*) антителами рекомбинантные α -тубулины были выявлены на ожидаемом уровне, с массами около 60 и 56 кДа, соответственно; также было подтверждено наличие полигистидиновой метки в обоих белках (рис.16).

Согласно литературным данным α -тубулин расщепляется протеасомой по убиквитин-зависимому пути с участием убиквитин-лигаз parkin (Ren et al., 2003), MGRN1 (Srivastava, Chakrabarti, 2014). Данных о убиквитин-независимом протеолизе, как и о процессинге α -тубулина протеасомами на сегодняшний день нет. Поэтому нашей задачей было проверить убиквитин-независимую деградацию данного белка и возможный процессинг протеасомами в системе *in vitro*.

Для этого была проведена реакция гидролиза *in vitro* рекомбинантного α -тубулина, несущего полигистидиновую последовательность на С- и N-конце. В качестве положительного контроля был использован МВР - основной белок миелина, выделенный из мозга коровы, который расщепляется 26S протеасомой убиквитин-независимо (Belogurov et al., 2014). Миелин – вещество, покрывающее аксоны большим количеством плотноупакованных ламелл в центральной и периферической нервной системе, и способствующее быстрому проведению нервного импульса. (Belogurov et al., 2014).

При протеолизе помеченного на С-конце меткой α Tub-His протеасомой *in vitro* в течение 6 и 24 часов не выявлено расщепления белка и, можно заметить, что рекомбинантный белок стабилен при температуре и не подвергается деградации (рис. 17). Последующие эксперименты протеолиза белка α Tub-His протеасомой *in vitro* подтвердили отсутствие убиквитин-независимого расщепления или процессинга α Tub-His протеасомами (рис.18).

В результате реакции гидролиза *in vitro* His- α Tub оказалось, что и этот модифицированный на N-конце полигистидиновой меткой белок не расщепляется протеасомой убиквитин-независимо. Появления укороченной формы также не выявлено. Данный результат был подтверждён Вестерн-блот-анализом с использованием антител, специфичным к α -тубулину (*TUBA4A*) и полигистидиновой метке (рис. 19). Таким образом, можно сделать вывод о том, что рекомбинантный α -тубулин человека, экспрессированный в *E.coli*, не подвергается расщеплению 26S протеасомой убиквитин-независимо в системе *in vitro*. Поскольку в результате эксперимента не удалось идентифицировать появление укороченной формы α -тубулина (*TUBA4A*), факт протеасомного процессинга этого белка *in vitro* также не подтвержден.

ВЫВОДЫ

- 1 С помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии в комплексе с протеасомами, аффинно-очищенными из клеток человека линии K562, определены 16 белков, среди которых присутствуют белки убиквитин-протеасомной системы, шапероны, белки цитоскелета и участники метаболизма
- 2 Масс-спектрометрические данные подтверждены Вестерн-блот анализом с помощью специфических антител к α - и β -тубулинам, β -актину, БТШ70. Обнаружено, что с аффинно-очищенными протеасомами ассоциирована укороченная форма α -тубулина
- 3 В результате реакции протеолиза α -тубулина протеасомой установлено, что в системе *in vitro* экспрессированный в *E.coli* α -тубулин человека не подвергается процессингу и расщеплению протеасомой убиквитин-независимо

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артамонова Т. О., Ходорковский М. А., Цимоха А. С. 2014. Масс-спектрометрический анализ аффинно-очищенных протеасом из клеток миелогенной лейкемии человека линии K562. Биоорганическая химия. 40 (6): 720-734.
2. Гельфанд В. И., Розенблат В. А. 1977. Микротрубочки: Их структура, химия и функциональная роль. Итоги науки и техники. Сер. Биол. науки. 11: 78-144.
3. Зайкова Ю. Я., Куличкова В. А., Ермолаева Ю. Б., Боттрилл А., Барлев Н. А., Цимоха А. С. 2013. Характеристика внеклеточных протеасом и ассоциированных с ними белков методом iTRAQ-масс-спектрометрии. Цитология. 55 (2): 111-122.

4. *Иванова Е. Ю., Артамонова Т. О., Зайкова Ю. Я., Ходорковский М. А., Цимоха А. С. 2017.* В комплексе с очищенными протеасомами обнаружена укороченная форма альфа-тубулина. *Цитология.* 59 (3): 194-198.
5. *Сорокин А. В., Ким Е. Р., Овчинников Л. П. 2009.* Протеасомная система деградации и процессинга белков. *Успехи биологической химии.* 49: 3-76.
6. *Цимоха А. С. 2010.* Протеасомы: участие в клеточных процессах. *Цитология.* 52 (4): 277-300.
7. *Wang X., Chen C. F., Baker P. R., Chen P. L., Kaiser P., Huang L. 2007.* Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex. *Biochemistry.* 46 (11): 3553-3565.
8. *Abramova E., Sharova N., Karpov V. 2002.* The proteasome: destroy to live. *Molecular Biology.* 36 (5): 613-624.
9. *Bach I., Ostendorff H. P. 2003.* Orchestrating nuclear functions: ubiquitin sets the rhythm. *Trends in biochemical sciences.* 28 (4): 189-195.
10. *Baumeister W., Walz J., Zühl F., Seemüller E. 1998.* The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell.* 92 (3): 367-380.
11. *Belogurov A., Kudriaeva A., Kuzina E., Smirnov I., Bobik T., Ponomarenko N., Kravtsova-Ivantsiv Y., Ciechanover A., Gabibov A. 2014.* Multiple sclerosis autoantigen myelin basic protein escapes control by ubiquitination during proteasomal degradation. *Journal of Biological Chemistry.* 289 (25): 17758-17766.
12. *Besche H. C., Haas W., Gygi S. P., Goldberg A. L. 2009.* Isolation of mammalian 26S proteasomes and p97/VCP complexes using the ubiquitin-like domain from HHR23B reveals novel proteasome-associated proteins. *Biochemistry.* 48 (11): 2538-2549.
13. *Bochtler M., Ditzel L., Groll M., Hartmann C., Huber R. 1999.* The proteasome. *Annual review of biophysics and biomolecular structure.* 28 (1): 295-317.
14. *Chen Z. J. 2005.* Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nature cell biology.* 7 (8): 758-765.
15. *Ciechanover A., Brundin P. 2003.* The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron.* 40 (2): 427-446.
16. *Cleveland D. W., Sullivan K. F. 1985.* Molecular biology and genetics of tubulin. *Annual review of biochemistry.* 54 (1): 331-366.
17. *Coux O., Nothwang H., Pereira I. S., Targa F. R., Bey F., Scherrer K. 1994.* Phylogenic relationships of the amino acid sequences of prosome (proteasome, MCP) subunits. *Molecular and General Genetics MGG.* 245 (6): 769-780.
18. *Dahlmann B. 2005.* Proteasomes. *Essays in biochemistry.* 41: 31-48.

19. *Dahlmann B., Ruppert T., Kloetzel P. M., Kuehn L. 2001.* Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie.* 83 (3-4): 295-299.
20. *DeMartino G. N., Slaughter C. A. 1999.* The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry.* 274 (32): 22123-22126.
21. *Dikic I. 2017.* Proteasomal and autophagic degradation systems. *Annual review of biochemistry.* 86: 193-224.
22. *Elsasser S., Schmidt M., Finley D. 2005.* Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis. *Methods in enzymology.* 398: 353-363.
23. *Finley D., Tanaka K., Mann C., Feldmann H., Hochstrasser M., Vierstra R., Johnston S., Hampton R., Haber J., McCusker J. 1998.* Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particle. *Trends in biochemical sciences.* 23 (7): 244-245.
24. *Gelfand V. 1989.* Cytoplasmic microtubular motors. *Current opinion in cell biology.* 1 (1): 63-66.
25. *Glickman M. H., Ciechanover A. 2002.* The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews.* 82 (2): 373-428.
26. *Glickman M. H., Rubin D. M., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Baumeister W., Fried V. A., Finley D. 1998.* A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell.* 94 (5): 615-623.
27. *Groettrup M., Khan S., Schwarz K., Schmidtke G. 2001.* Interferon- γ inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie.* 83 (3-4): 367-372.
28. *Groll M., Bochtler M., Brandstetter H., Clausen T., Huber R. 2005.* Molecular machines for protein degradation. *Chembiochem.* 6 (2): 222-256.
29. *Groll M., Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H. D., Huber R. 1997.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 386 (6624): 463-471.
30. *Groll M., Huber R. 2004.* Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.* 1695 (1-3): 33-44.
31. *Guerrero C., Tagwerker C., Kaiser P., Huang L. 2006.* 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. *Molecular & Cellular Proteomics.* 5 (2): 366-378.
32. *Heinemeyer W., Ramos P., Dohmen R. 2004.* Ubiquitin-proteasome system. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS.* 61 (13): 1562-1578.

33. *Hendil K. B., Khan S., Tanaka K. 1998.* Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochemical Journal.* 332 (Pt 3): 749-754.
34. *Hershko A., Ciechanover A. 1998.* The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425-479.
35. *Hochstrasser M. 1996.* Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual review of genetics.* 30 (1): 405-439.
36. *Horiguchi R., Dohra H., Tokumoto T. 2006.* Comparative proteome analysis of changes in the 26S proteasome during oocyte maturation in goldfish. *Proteomics.* 6 (14): 4195-4202.
37. *Hoyt M. A., Zich J., Takeuchi J., Zhang M., Govaerts C., Coffino P. 2006.* Glycine-alanine repeats impair proper substrate unfolding by the proteasome. *The EMBO journal.* 25 (8): 1720-1729.
38. *Hughes A. L. 1997.* Evolution of the proteasome components. *Immunogenetics.* 46 (2): 82-92.
39. *Jackson R. 2005.* Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochemical Society Transactions.* 33 (6): 1231-1241.
40. *Kloetzel P.-M. 2001.* Ubiquitin and proteasomes: Antigen processing by the proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2 (3): 179-188.
41. *Laemmli U. K. 1970.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature.* 227: 680-685.
42. *Leggett D. S., Glickman M. H., Finley D. 2005.* Purification of proteasomes, proteasome subcomplexes, and proteasome-associated proteins from budding yeast. *Ubiquitin-Proteasome Protocols:* 57-70.
43. *Liu C.-W., Corbooy M. J., DeMartino G. N., Thomas P. J. 2003.* Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science.* 299 (5605): 408-411.
44. *Lowe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W., Huber R. 1995.* Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science.* 268 (5210): 533-539.
45. *Mane J. Y., Semenchenko V., Perez-Pineiro R., Winter P., Wishart D., Tuszynski J. A. 2013.* Experimental and Computational Study of the Interaction of Novel Colchicinoids with a Recombinant Human α I/ β I-Tubulin Heterodimer. *Chemical biology & drug design.* 82 (1): 60-70.
46. *Mayr J., Seemüller E., Müller S. A., Engel A., Baumeister W. 1998.* Late events in the assembly of 20S proteasomes. *Journal of structural biology.* 124 (2-3): 179-188.
47. *McCarthy M. K., Weinberg J. B. 2015.* The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Frontiers in microbiology.* 6: 21.

48. *Minoura I.* 2017. Towards an understanding of the isotype-specific functions of tubulin in neurons: Technical advances in tubulin expression and purification. *Neuroscience research.* 122: 1-8.
49. *Nandi D., Tahiliani P., Kumar A., Chandu D.* 2006. The ubiquitin-proteasome system. *Journal of biosciences.* 31 (1): 137-155.
50. *Orlowski M., Wilk S.* 2000. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Archives of biochemistry and biophysics.* 383 (1): 1-16.
51. *Orlowski M., Wilk S.* 2003. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 415 (1): 1-5.
52. *Pickart C. M.* 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry.* 70 (1): 503-533.
53. *Pickart C. M., Eddins M. J.* 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.* 1695 (1-3): 55-72.
54. *Ren Y., Zhao J., Feng J.* 2003. Parkin binds to α/β tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *Journal of Neuroscience.* 23 (8): 3316-3324.
55. *Rock K. L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A. L.* 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 78 (5): 761-771.
56. *Russell J. D., Scalf M., Book A. J., Ladror D. T., Vierstra R. D., Smith L. M., Coon J. J.* 2013. Characterization and quantification of intact 26S proteasome proteins by real-time measurement of intrinsic fluorescence prior to top-down mass spectrometry. *PloS one.* 8 (3).
57. *Schulman B. A., Harper J. W.* 2009. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nature reviews Molecular cell biology.* 10 (5): 319-332.
58. *Skabkin M., Liabin D., Ovchinnikov L.* 2006. Nonspecific and specific interaction of Y-box binding protein 1 (YB-1) with mRNA and posttranscriptional regulation of protein synthesis in animal cells. *Molekuliarnaia biologii.* 40 (4): 620-633.
59. *Smalle J., Vierstra R. D.* 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 555-590.
60. *Srivastava D., Chakrabarti O.* 2014. Mahogunin-mediated α -tubulin ubiquitination via noncanonical K6 linkage regulates microtubule stability and mitotic spindle orientation. *Cell death & disease.* 5 (2).
61. *Tai H.-C., Besche H., Goldberg A. L., Schuman E. M.* 2010. Characterization of the brain 26S proteasome and its interacting proteins. *Frontiers in molecular neuroscience.* 3: 12.

62. Tian L., Holmgren R. A., Matouschek A. 2005. A conserved processing mechanism regulates the activity of transcription factors *Cubitus interruptus* and NF- κ B. *Nature Structural and Molecular Biology*. 12 (12): 1045-1053.
63. Touitou R., Richardson J., Bose S., Nakanishi M., Rivett J., Allday M. J. 2001. A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 α -subunit of the 20S proteasome. *The EMBO journal*. 20 (10): 2367-2375.
64. Vallee R. B. 1984. MAP2 (microtubule-associated protein 2). *The Cytoskeleton*, Springer: 289-311.
65. Verma R., Chen S., Feldman R., Schieltz D., Yates J., Dohmen J., Deshaies R. J. 2000. Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Molecular biology of the cell*. 11 (10): 3425-3439.
66. Villasante A., Wang D., Dobner P., Dolph P., Lewis S., Cowan N. 1986. Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: testis-specific expression of two sister genes. *Molecular and Cellular Biology*. 6 (7): 2409-2419.
67. Walz J., Erdmann A., Kania M., Typke D., Koster A. J., Baumeister W. 1998. 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *Journal of structural biology*. 121 (1): 19-29.
68. Wang D., Zong C., Koag M.-c., Wang Y., Drews O., Fang C., Scruggs S. B., Ping P. 2011. Proteome dynamics and proteome function of cardiac 19S proteasomes. *Molecular & Cellular Proteomics*. 10 (5): M110-006122.
69. Wolf D. H. 2004. Ubiquitin-proteasome system. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61 (13): 1601-1614.
70. Wolf D. H., Hilt W. 2004. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1695 (1): 19-31.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А - Идентифицированные с помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии белки, ассоциированные с аффинно-очищенными из клеток K562/ β 7-НТВН протеасомами

Белок	Номер белка в базе данных Uniprot ^a	Ген	Мол. масса, кДа	Доля покрытия, %	Число пептидов
Белки убиквитин-протеасомной системы:					
Убиквитин-60S-рибосомный белок L40	P62987	<i>UBA52</i>	14.7	36	4
Убиквитин-40S рибосомный белок S27a	P62979	<i>RPS27A</i>	17.9	27	5
Убиквитин-С-концевая гидролаза L5/UCH37	Q9Y5K5	<i>UCHL5</i>	37.6	15	3
Убиквитин-лигаза E3A	Q05086	<i>UBE3A</i>	100.7	5	4
Белки теплового шока (Hsp):					
Hsp70	P11142	<i>HSPA8</i>	70.9	31	18
Глюкоза-регулируемый белок 78 кДа	P11021	<i>HSPA5</i>	72.3	36	17
Hsp 90- β	P08238	<i>HSP90AB1</i>	83.3	23	14
Hsp 60, митохондриальный	P10809	<i>HSPD1</i>	61.1	18	8
Hsp 70 1A/1B	P08107	<i>HSPA1A</i>	70.1	17	10
Hsp 70, митохондриальный	P38646	<i>HSPA9</i>	73.7	16	8
Белки цитоскелета:					
Актин цитоплазматический 1	P60709	<i>ACTB</i>	41.7	45	14
Тубулин (α -1C фрагмент)	Q9BQE3	<i>TUBA1C</i>	49.9	26	7
Тубулин (β фрагмент)	P07437	<i>TUBB</i>	49.7	26	8
α -актинин-4	O43707	<i>ACTN4</i>	104.9	21	39
Белки-участники метаболизма:					
Метилкротонил-КоА карбоксилаза (β фрагмент), митохондриальная	Q9HCC0	<i>MCCC2</i>	61.3	27	12
L-лактатдегидрогеназа (C фрагмент)	P07864	<i>LDHC</i>	36.3	9	3

^aБаза данных Uniprot: <http://www.uniprot.org>

