

Санкт-Петербургский Государственный университет

Горбач Дарья Петровна

Анализ изменений в протеасомо-ассоциированном протеоме клеток множественной миеломы человека при сочетанной обработке специфическими препаратами-ингибиторами.

Выпускная квалификационная работа

По направлению подготовки 06.03.01
основная образовательная программа бакалавриата «Биология»
профиль «Биохимия»

Работа выполнена:
в лаборатории регуляции экспрессии генов
ФГБУН Институт цитологии РАН
(зав. лаб.: д. б. н., Барлев Н. А.)

Научный руководитель:
к.б.н., доцент Романовская Е. В.

Научный консультант:
к.б.н. Миттенберг А. Г.

Санкт-Петербург
2018

Оглавление	
Введение	3
Цели и задачи	5
Цель работы	5
Задачи	5
Обзор литературы	6
Протеасома	6
Строение протеасомы	8
Механизмы деградации белка.....	12
Роль протеасом в клеточных нарушениях	16
Множественная миелома человека.....	17
Типы биомаркеров	17
Ингибиторы протеасом.....	19
Терапевтические агенты других типов	21
Масс-спектрометрические методы в протеомике	23
Количественная протеомика и поиск возможных опухолевых биомаркеров	24
Материалы и методы исследования	26
1. Выделение белка слияния.....	26
2. Аффинная хроматография белков слияния на глутатион-сефарозе.....	27
3. Аффинная хроматографическая очистка (GST pull down; аффинная адсорбция)	28
4. Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях	29
5. Пробоподготовка для масс-спектрометрии	30
6. Хроматографическое разделение белков	32
7. Масс-спектрометрический анализ.....	32
8. Биоинформатический анализ	32
9. Иммуноблоттинг	33
Результаты и обсуждение	34
1. Выделение рекомбинантного белка GST- $\alpha 7$ и его очистка методом аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе.....	34
2. Обработка клеток ММ несколькими сочетаниями препаратов-ингибиторов	36
3. Выделение экстрактов цитоплазмы и нуклеоплазмы из культуры клеток множественной миеломы человека (Im9) в контроле и после сочетанных обработок. Связывание белка слияния на глутатион-сефарозе с протеасомо-ассоциированными белками цитоплазматических и ядерных экстрактов (GST pull-down).	37
4. Идентификация выделенных белков методом тандемной масс-спектрометрии.	38
5. Выборочное подтверждение результатом масс-спектрометрии иммуноблоттингом	39
6. Оценка влияния различных типов сочетанных обработок на клетки ММ, на основании различий белковых профилей полученных проб.	39
Идентификация возможных белков-мишеней для терапии ММ.	45
Белок-регулятор клеточного цикла и апоптоза 2 (DBC1)	46

Рибосомальные белки	47
Фасцин.....	48
Гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины (hnRNPs)	48
Белки-регуляторы фолдинга	49
Ретикулон.....	49
P72.....	50
Выводы	51
Список сокращений	51
Список литературы	55

Введение.

В диагностике любого онкологического заболевания ключевую роль играет определение характерного для него набора клеточных биомаркеров. Развитие протеомных методов позволило усовершенствовать процесс поиска и обнаружения биомаркеров, при этом расширив наши знания о работе клетки в целом. Для пациентов это не означает полное излечение, однако гарантирует значительное улучшение течения болезни и лучший прогноз в долгосрочной перспективе. Однако, несмотря на значительный прогресс в терапии злокачественных новообразований, некоторые заболевания остаются неизлечимыми, а их патогенез во многом неясным. К таким болезням, в частности, относится множественная миелома человека (ММ).

Множественная миелома человека – иммунопролиферативное заболевание, заключающееся в аномальной трансформации и пролиферации моноклональных плазмочитов красного костного мозга (Willenbacher et al., 2018). За последние 30 лет, во многом благодаря методам протеомики, достигнуты значительные успехи в терапии ММ. Так, был идентифицирован ряд клеточных мишеней ММ, в числе которых протеасомный аппарат белковой деградации, что привело к разработке таких высокоэффективных терапевтических агентов, как собственно ингибиторы протеасом (PIs), а также ингибиторы гистоновых деацетилаз (DACIs), моноклональные антитела (mAbs) и ряд других.

В терапии ММ протеасомные ингибиторы приобрели особое значение по нескольким причинам. Во-первых, подавляющее число биомаркеров ММ это белки. Логично предположить, что особое значение будет иметь именно система внутриклеточного протеолиза. Кроме того, большое число протеасомных субстратов и сам протеасомный аппарат вовлечены в ключевые для жизнедеятельности клетки процессы, нарушение

которых как раз и может приводить к онкотрансформации клеток и их неконтролируемой пролиферации. Поэтому наиболее изученными биомаркерами ММ являются белки, так или иначе участвующие в онкогенезе (Cosemans et al., 2018). Более того, в клинических экспериментах показана повышенная чувствительность опухолевых клеток к препаратам-ингибиторам протеасом.

Первым из открытых, и долгое время наиболее эффективным препаратом-ингибитором протеасом был *Velcade (бортезомиб)*. На сегодняшний день это один из немногих терапевтических агентов, прошедший все этапы клинических испытаний FDA. Также к числу таких препаратов относится *карфилзомиб*. Применение этих препаратов играет важную роль не только в клинике, но и в фундаментальных исследованиях. Так, изменение белкового профиля клетки после ее обработки ингибиторами протеасом, дает информацию о субстратах убиквитин-зависимого и убиквитин-независимого путей деградации протеасомным комплексом, а в случае клеток миеломных линий – информацию о том, могут ли такие субстраты быть потенциальными биомаркерами ММ.

Однако, ряд особенностей патогенеза ММ делает использование какого-либо одного типа препаратов практически бесполезным. Так, среди пациентов с ММ возрос процент возникновения резистентности к препаратам-ингибиторам протеасом, что послужило стимулом к поиску новых терапевтических агентов, а также попыткам сочетания препаратов разной природы. При лечении ММ именно последний метод оказался наиболее успешным (Attal et al., 2017; Orłowski, 2004). В настоящее время исследования по поиску и тестированию новых сочетаний терапевтических препаратов разных классов проводятся достаточно широко, что указывает на актуальность этого направления (Kumar et al., 2018).

Сравнение эффективности сочетаний препаратов проводится в разных направлениях: важно не только доказать дополнение и усиление терапевтического эффекта одного из препаратов при сочетанной обработке, но и провести сравнительный анализ действия двух препаратов одного класса с каким-то определенным препаратом другого класса на одну и ту же мишень. Примером такого эксперимента являются проводимые в данный момент клинические испытания сочетаний *бортезомиб-доксорубицин* и *карфилзомиб-доксорубицин* – причем уже показано, что последнее сочетание оказывает более сильный терапевтический эффект на клетки ММ (Dimopoulos et al., 2017). Кроме того, перспективным направлением является использование соединений, воздействующих на клеточный цикл, в частности, ингибиторов циклин-зависимых киназ. К таким препаратам относится, например, *флавопиридол*, также проходящий клинические испытания на клетках ММ (Hofmeister et al., 2014). К другим препаратам, используемым в сочетанной терапии

ММ относятся: *ресвератрол*, фитопротектор, показавший противоопухолевую активность на клетках животных (Porat et al., 2013) и *камптотецин*, ингибитор топоизомеразы I, активно использующийся в терапии различных онкологических заболеваний (Gokduman, 2016).

Кроме самих сочетаний препаратов значительный интерес представляет анализ их воздействия на разные клеточные линии – например, на миеломные линии RPMI 8226 и Im9, различающиеся по статусу экспрессии проапоптотического онкосупрессора p53.

Селекция наиболее эффективных сочетаний была проведена с помощью МТТ теста и проточной цитометрии – так отбираются не только сами варианты обработок, но и оптимальные концентрации препаратов, приводящие к преимущественному апоптозу миеломных клеток. В данной работе были использованы три сочетания вышеописанных препаратов, и проведен сравнительный анализ белковых профилей обработанных клеток с помощью метода LC-MALDI TOF/TOF масс-спектрометрии.

Цели и задачи.

Цель работы:

Проанализировать интерактом субъединицы PSMA3 в цитоплазме и нуклеоплазме клеток ММ (клеточная линия Im9), полученный путем связывания с рекомбинантным белком GST- $\alpha 7$ после обработки клеток разными сочетаниями препаратов-ингибиторов.

Задачи:

1. Выделение рекомбинантного белка GST- $\alpha 7$ и его очистка методом аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе;
2. Обработка клеток ММ несколькими сочетаниями препаратов-ингибиторов
3. Выделение экстрактов цитоплазмы и нуклеоплазмы из культуры клеток множественной миеломы человека (Im9) в контроле и после сочетанных обработок;
4. Связывание белка слияния на глутатион-сефарозе с протеасомо-ассоциированными белками цитоплазматических и ядерных экстрактов (GST pull-down);
5. Идентификация выделенных белков методом tandemной масс-спектрометрии

6. Оценка влияния различных типов сочетанных обработок на клетки ММ, основываясь на различии белковых профилей полученных проб.

Обзор литературы.

Протеасома

Протеасома – центральный компонент убиквитин-зависимой и убиквитин-независимой систем внутриклеточного протеолиза. Кроме непосредственно деградации, протеасома участвует в контроле концентрации многих регуляторных белков и координирует процессы генной экспрессии. Как компонент UPS, протеасома была описана еще в 1977 году (Etlinger et al., 1977), и была идентифицирована в клетках всех эукариот, ряда архей и актинобактерий. Клетки большинства типов бактерий не содержат 20S протеасом, однако, в них экспрессируются так называемые ClpQ/HslV-комплексы – АТФ-зависимые протеазы, которые считаются эволюционными предшественниками эукариотических протеасом (Vochtlер et al., 1999).

По механизму действия протеасома охарактеризована, как N-концевая гидролаза (нуклеофилом является остаток Thr в активном центре). Основным субстратом являются белки, поврежденные в результате мутаций, окислительного стресса, теплового шока, а также ряд короткоживущих регуляторных белков. В процессе убиквитин-зависимой деградации полиубиквитиновые цепи маркируют белок как субстрат для протеасомы, которая в свою очередь воспринимает этот сигнал и инициирует протеолиз с неструктурированного участка белка. Стоит также заметить, что эта реакция является АТФ-зависимой.

Структура и субъединичный состав протеасом варьирует в зависимости от специфичности осуществляемых реакций, типа ткани или типа клеток, обеспечивая каталитическую деграцию большинства белков цитоплазмы, ядра и мембранных белков. Такую универсальность во многом обеспечивает разнообразие регуляторных комплексов, ассоциированных с 20S протеасомой, таких как 19S (PA700), 11S (PA28 $\alpha\beta$), PA28 γ , PA200, EMC29, PI31 (ингибирующий регулятор) и других. Эти регуляторы формируют, например, 26S (19Sreg - 20Sprot), 30S (19Sreg - 20Sprot - 19Sreg), (19Sreg - 20Sprot - PA28; гибриды) и PA28(PA28 - 20Sprot - PA28) протеасомы, кроме того, существует и множество других комбинаций регуляторных частиц (Jung et al., 2009). Однако, также показано, что около половины 20S протеасом функционируют без участия регуляторов – в таком случае модификациям может подвергаться коровая частица.

Филогенетический анализ, включавший в себя обработку геномов множества организмов из основных супергрупп эукариот (Opisthokonta, Amoebozoa, Excavata, Archaeplastida, SAR, Cryptophyta, Haptophyta) показал высокую степень консервативности протеасомных регуляторов на протяжении на протяжении всего эволюционного развития группы эукариот. В частности, все компоненты субъединичного состава наиболее распространенного регулятора 19S (PA700) были найдены во всех исследуемых организмах вплоть до общего предка эукариот (LECA, Last Eukaryotic Common Ancestor), а ингибирующий регулятор PI31 намного менее консервативен по составу или вовсе отсутствует в ряде эукариотических групп (Fort et al., 2015).

К настоящему моменту описаны четыре субпопуляции – стандартные, промежуточные, иммунопротеасомы, имеющие разные конфигурации для β -субъединиц – $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL-1), и $\beta 5i$ (LMP7), а также тимопротеасомы, найденные в кортикальных эпителиальных клетках тимуса. Авторы предполагают, что они играют важную роль на этапе позитивной селекции CD8⁺ Т-клеток. Для тимопротеасом конфигурация β -субъединиц кора обозначается как $\beta 1i$ - $\beta 2i$ - $\beta 5t$ – при этом отмечено что химотрипсинподобная активность у этой субпопуляции протеасом снижена по сравнению со «стандартной» конфигурацией 26S протеасомы (Dahlmann, 2016).

Комплексы иммунопротеасом экспрессируются как в специфических органах, тканях и клетках иммунной системы (селезенка, тимус, антиген-презентирующие клетки (АПК)), так и в тканях и клетках, не относящихся к иммунной системе, в ответ на стимулы различной природы – от интерлейкинов (il) и IFN- γ до стрессовых факторов. Интересно, что протеолитическая активность иммунопротеасомы может меняться в сторону преимущественного расщепления основных и гидрофобных связей – предположительно, это приводит к увеличению сродства иммунопротеасомы к МНС I (Heinemeyer et al., 2004). Кроме того, для иммунопротеасом характерен особый набор регуляторных частиц, в частности PI31 – регулятор, участвующий в образовании антигенных пептидов и, предположительно, в созревании самих иммунопротеасом (Zaiss et al., 2002).

Анализ протеасом, взятых из разных тканей и клеток, показывает, что каждая отдельная 26S протеасома может быть «гибридом», включающим в себя одновременно «стандартные» и «иммуносубъединицы» (Dahlmann, 2016).

Что касается клеточной локализации протеасом, показано их примерно равномерное распределение по клеточным компартментам, однако в клетках дрожжей встречаются преимущественно в ядре. Это объясняется сравнительно коротким клеточным циклом у дрожжей и, следовательно, необходимостью своевременного удаления короткоживущих регуляторных белков, участвующих в делении, а кроме того, удобством сборки предшественников 20S протеасом прямо на месте синтеза их субъединиц (Eisenkel et al., 1998).

Строение протеасомы

Рассматриваемая в данной работе «стандартная» 26S протеасома обладает тремя протеолитическими активностями (трипсиноподобной, химотрипсиноподобной и каспазоподобной) и состоит из двух частей – 20S-корового комплекса, образованного четырьмя гептамерными кольцами, и 19S-регуляторной частицы (Budenholzer et al., 2017).

20S-коровый комплекс – бочонкообразная структура, состоящая из семи высокомолекулярных α -субъединиц, формирующих пору (внешние кольца кора), и семи β -субъединиц, образующих протеолитическую камеру (внутренние кольца), при этом α -субъединицы более консервативны по сравнению с β -субъединицами.

В коровом комплексе пропускание белка через пору, определяется работой N-концевых участков молекул α -субъединиц, объединенных в гептамер – так называемые «ворота». Ключевую роль в пропускании белкового субстрата через «ворота» играет $\alpha 3$ -субъединица (Groll et al., 2003). Механизм пропускания белковых молекул через пору – результат взаимодействия α -субъединиц со специфическими активаторами, например, 19S, PA28 или PA200.

Внутренняя часть протеасомы сформирована двумя гептамерными «кольцами» β -субъединиц. Стоит также отметить, что ферментативной активностью обладают $\beta 1$ -, $\beta 2$ - и $\beta 5$ -субъединицы внутреннего кольца – N-концевые участки Thr этих субъединиц выходят в центральную пору и проводят нуклеофильную атаку пептидной связи. Именно эти субъединицы обеспечивают *трипсиноподобную* (гидролиз пептидной связи после остатков Lys или Arg), *химотрипсиноподобную* (гидролиз между остатками Phe и любым другим аминокислотным остатком), и *каспазоподобную* (гидролиз пептидной цепи после остатков Glu) протеолитические активности протеасомы. Таким образом, каждая зрелая протеасома содержит 6 протеолитических сайтов со всеми тремя типами протеолитических

активностей. Стоит отметить и существование дополнительных протеолитических активностей у протеасом – их активность направлена на расщепление белков, содержащих аминокислоты с разветвленными цепями.

При осуществлении протеолиза химотрипсиноподобная активность протеасомы является лимитирующей. Ингибирование трипсин- и каспазоподобной активности оказывает гораздо меньшее влияние на скорость гидролиза полипептидной цепи. Поскольку все три каталитические субъединицы являются частью единого комплекса, очевидно, что они аллостерически влияют на активность друг друга. Так, связывание субстрата химотрипсиноподобной активности увеличивает каспазоподобную активность, а связывание субстрата каспазоподобной активности ингибирует химотрипсиноподобную активность. Предполагается, что гидролиз полипептидной цепи начинается с активации химотрипсиноподобного сайта ($\beta 5$), затем он аллостерически инактивируется и каспазоподобный сайт ($\beta 1$) расщепляет образовавшиеся на первой стадии пептиды на более мелкие фрагменты, после чего активные центры освобождаются и цикл повторяется (Kisselev et al., 1999).

Интересно, что разнообразие модификаций α -субъединиц служит для контроля и модуляции работы 20S-корового комплекса протеасомы и некоторых ее регуляторов. Во-первых, как было сказано выше, N-концевые участки α -субъединиц определяют, попадет ли белковый субстрат в протеолитический «бочонок» - поэтому, для предотвращения неконтролируемого протеолиза эти гидрофобные участки блокируют попадание белков в протеасому, и в норме протеасома находится в неактивном состоянии (Groll et al., 2000). Во-вторых, несмотря на то, что сама активация протеолиза обусловлена связыванием α -субъединицы с регулятором, именно комплекс α -субъединиц обеспечивает способность 20S протеасомы работать без 19S регулятора (и без любого другого вообще). Неоднозначная роль α -субъединиц подтверждается и их способностью связывать множество различных небиквитинированных белковых субстратов. Кроме того, некоторые авторы указывают на роль α -субъединиц в определении субклеточной локализации протеасомы – за счет наличия сигнала ядерной локализации (NLS) (Ogiso et al., 2002). Стоит заметить, однако, что функциональность NLS α -субъединиц пока отмечена только *in vitro*.

Непосредственно протеолиз осуществляется коровым комплексом, тогда как дополнительная модуляция происходит за счет регуляторной частицы.

19S-регуляторный комплекс (PA700) - АТФ-зависимая ассоциация ферментов, содержит около 20 субъединиц. Субъединицы регуляторной части распознают белковый субстрат, разворачивают и переносят его к коровому комплексу. Можно выделить две составные части: основание и крышку. В протеасомах дрожжей две эти части соединены через субъединицу Rpn10, а у млекопитающих – ее ортологом, S5a.

Центр 19S-основания формируют 6 АТФазных субъединиц (Rpt1 – Rpt6), а крышка состоит из ряда не-АТФазных субъединиц: Rpn2-9, Rpn 11, Rpn 12, Rpn 15, снаружи Rpt1 – Rpt6 кольца, образующие «подкову», а также Rpn11, убирающая полиубиквитиновую цепь перед протеолизом в коре протеасомы. Субъединицы Rpn10 и Rpn13 (Adrm1), служащие рецепторами к убиквитину (наряду с Rpn1), распознают белки, маркирование для протеолиза в протеасоме. Субъединица Rpn2 служит связующим звеном между 19S-регулятором и 20S-коровым комплексом. Основная функция крышки – распознавание полиубиквитинового сигнала, и деубиквитинирование поступающих субстратов. Последнюю функцию выполняют деубиквитинирующие белки (DUBs), о которых будет сказано ниже.

В результате, такой субъединичный ансамбль стабилизирует работу протеасомы, обеспечивая аллостерическую регуляцию и координацию ее протеолитических активностей в процессе деградации белков (Livneh et al., 2016).

Последние результаты, полученные с помощью криоэлектронной микроскопии, показали, что протеасомный комплекс – это динамичная гетерогенная структура, и обладает как минимум тремя «конформационными» состояниями (Unverdorben et al., 2014). Свободная форма (не осуществляющая протеолиз) – S1 – наиболее распространена в клетке. Присоединение субстратов вызывает конформационные перестройки и переход комплекса в форму S3 (связанную с субстратом).

Сборка протеасомы происходит в ЭПР и начинается с объединения α -субъединиц в кольцо – этот процесс контролируется двумя комплексами шаперонов: PAC1-PAC2 и PAC3-PAC4. Согласно одной из предполагаемых моделей сборки, первыми объединяются субъединицы $\alpha 5$ и $\alpha 7$ (под действием PAC1-PAC2), а далее тот же комплекс присоединяет остальные α -субъединиц, одновременно с этим предотвращая их спонтанную димеризацию (Hirano et al., 2005). Более того, комплекс PAC1-PAC2 остается связанным с α -субъединицей вплоть до полного формирования 20S-корового комплекса, чтобы не допустить преждевременного связывания α -субъединиц с ее активаторами (Stadtmueller et al., 2012). Комплекс PAC3-PAC4 работает совместно с комплексом PAC1-PAC2 на ранних стадиях сборки α -

субъединичного кольца, контролируя и корректируя порядок присоединения субъединиц (Hirano et al., 2006). Шапероны PAC1-PAC2 крепятся снаружи α -субъединицы, а PAC3-PAC4 – на внутренней ее стороне.

Кольцо α -субъединиц служит основой для формирования внутренних колец β -субъединиц. β -субъединицы изначально синтезируются в неактивной форме (проферментативной), чтобы предотвратить их преждевременную протеолитическую активность. Сборка кольца β -субъединиц начинается с $\beta 2$ и далее по порядку, останавливаясь после присоединения $\beta 7$ -субъединицы – одновременно с этим начинается димеризация двух частей-полупротеасом. По окончании сборки шапероны сами процессируются новой протеасомой (Gu et al., 2014).

Процесс сборки 19S-регулятора пока не до конца ясен. На сегодняшний день известно, что крышка и основание собираются независимо. Так же, как и для сборки кора, для сборки регулятора необходимы шапероны (Tomko et al., 2013). Впервые шапероны, участвующие в сборке 19S-регулятора были описаны на дрожжевой модели, однако позднее их гомологи были найдены и в клетках млекопитающих, и были названы: S5b/Hsm3, p27/Nas2, ганкирин/p28 и Rpn14/PAAF1 (АТФазо-ассоциированный фактор протеасом 1) (Рис.1).

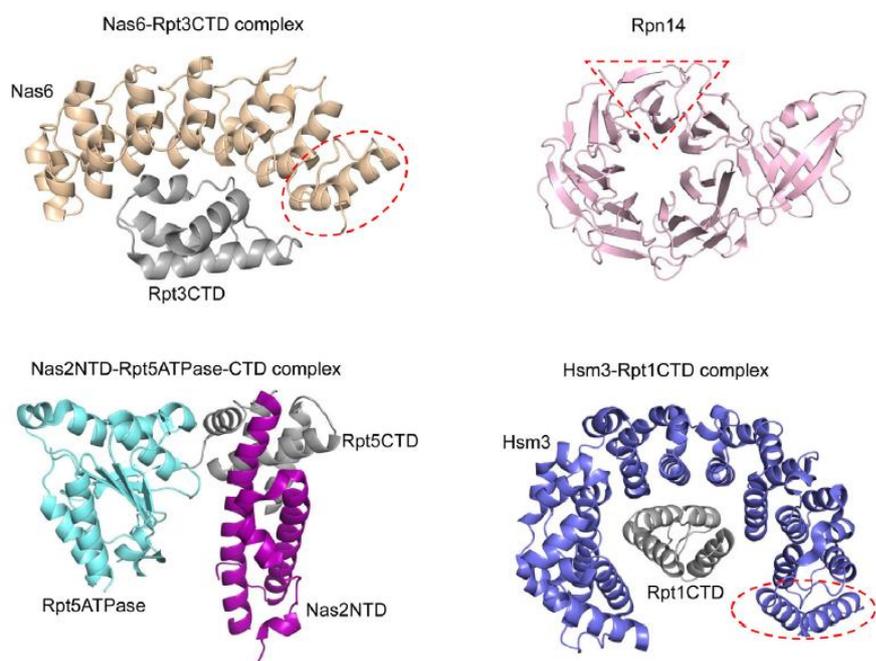


Рис.1 Шапероны, участвующие в сборке 19S-регулятора в клетках *S. cerevisiae* и имеющие гомологи в клетках млекопитающих (Budenholzer et al., 2017).

Регуляция синтеза протеасомы как происходит как транскрипционно, а так и пост-транскрипционно, за счет фосфорилирования. Известно, что биосинтез субъединиц протеасом строго лимитирован, и отдельные субъединицы редко, либо совсем не встречаются в клетках в свободном состоянии (пока что такие данные получены только для субъединиц Rpn10 и $\alpha 5$). Из-за этого сложно оценить уровень экспрессии отдельных субъединиц, однако, уже доказано, что он может повышаться в ответ на стрессорные факторы (Sha et al., 2014). Кроме того, как крупный и сложно устроенный ферментативный

комплекс, протеасома является мишенью для множества пост-трансляционных модификаций, действие которых может перекрываться и дополнять друг друга (Hirano et al., 2016). Перечень некоторых пост-трансляционных модификаций собран в обзоре 2016 года (Livneh et al., 2016).

Механизмы деградации белка

Адекватная работа клетки требует постоянного и строго регулируемого потока поступающих и используемых ею белков, при этом время полужизни большинства белков меньше, чем время жизни клетки, даже в случае их активной пролиферации. Составляя около 1% от всей белковой фракции клетки, протеасомы участвуют в деградации более чем 80% внутриклеточных белков. Протеолитическая активность протеасом задействована как в ликвидации поврежденных белков и белков с нарушенным фолдингом, так и в регуляции клеточного цикла, управлении путями внутриклеточного сигналинга, реорганизации хроматина (Mccann et al., 2014). Также играют ключевую роль в презентации антигена и запуске иммунного ответа, благодаря своей аффинности к молекулам МНС класса I.

Однако, ключевая функция протеасом – деградация широкого класса поврежденных, аномальных, потерявших функциональность или токсичных белков. В частности, для корректной жизнедеятельности клетки необходимо своевременная элиминация короткоживущих регуляторных белков, задействованных в пролиферации и дифференцировки клетки, а также окисленных и сверхэкспрессированных (Hwang, 2007).

Необходимым элементом этой системы является полиубиквитинирование, дающее сигнал к деградации отправляемым к протеасоме белкам. Хотя каноническим считается убиквитин-зависимый протеолиз, при котором белки маркируются полиубиквитиновыми цепями или «дегронами», наряду с ним существует и убиквитин-независимый путь.

Механизм убиквитин-зависимого протеолиза включает в себя две стадии: ковалентное последовательное присоединение мономеров убиквитина к белку с формированием полиубиквитиновой цепи, и собственно деградация белка, меченного полиубиквитиновой меткой.

Процесс полиубиквитинирования достаточно сложен и вариативен. Полиубиквитиновые цепи формируются за счет работы комплекса из трех ферментов: убиквитин-активирующего (E1), убиквитин-связывающего (E2) и убиквитинлигазы (E3). Кроме того, в конце прошлого века был обнаружен дополнительный фермент E4, участвующий в

элонгации коротких цепей убиквитина – однако, он не является обязательным (Koepl et al., 1999).

Структура полиубиквитиновых цепей нерегулярна как по строению, так и по длине. Классическая схема строится на присоединении полиубиквитиновой цепи к протеасоме через Lys-48, давая сигнал к деградации белка. Кроме этого пути, возможно присоединение полиубиквитиновой цепи через Lys-63 – однако у Lys-48-связанные цепи обладают большей аффинностью к сайтам связывания с протеасомой, чем Lys-63-связанные цепи. Метка по Lys-48 является сигналом к деградации белка, присоединение молекул убиквитина по Lys-63 играет важную роль при переносе регуляторных белков в процессе трансляции, внутриклеточной сигнализации; зачастую встречается при переносе белковых комплексов ESCRT, связанных с перестройками и транспортом мембран, а также в процессе межклеточного и внутриклеточного сигналинга с участием бактериальных NOD-факторов и T-клеточных рецепторов млекопитающих (Nathan et al., 2013).

Деградация белка во многом зависит от количества присоединенных мономеров убиквитина, что необходимо при последовательном протеолизе, например, регуляторных белков в процессе роста клетки. Показано, что субстраты, которые несут более длинную цепь убиквитина деградируют раньше, чем белки, связанные с более короткой цепью. Считается, что минимальная длина полиубиквитиновой цепи, достаточная для протеасомной деградации субстрата, составляет 4 мономера убиквитина (Thrower, 2000). Немаловажную роль в этом играет и фосфорилирование сайта E3-убиквитинлигазы, который непосредственно взаимодействует с переносимыми ею субстратами (Deshaies et al., 2009).

Присоединение к протеасоме также осуществляется опосредованно через E3-убиквитинлигазу, однако важно отметить, что даже это действие субстрат- и процесс-специфично – на это указывает и разнообразие представителей класса убиквитинлигаз (Paо et al., 2018). При этом взаимодействие происходит с так называемыми DUB-ферментами на «крышке» 19S-регуляторного комплекса протеасомы. В клетках млекопитающих это семейство представлено белками Usp14 (Ubp6), Rpn11 и Uch37 (Collins et al., 2017), которые последовательно отрезают части полиубиквитиновой цепи, таким образом определяя время, в течении которого белковый субстрат прикреплен к протеасоме. Таким образом предотвращается «засорение» протеасомы белками, которых сложно подвергнуть деградации (Lee et al., 2010). При этом стоит отметить, что эффекты ингибирования DUB-ферментов схожи с эффектами классических PI3 (бортезомиб; см. ниже) при терапии множественной миеломы человека (Kisselev et al., 2012).

Распознавание субстратов, маркированных полиубиквитиновыми цепями осуществляют субъединицы Rpn10 и Rpn13 19S-частицы. Стоит заметить, что распознавание субстратов субъединицами Rpn10 и Rpn13 и распознавание с помощью DUB-белков – два отдельных механизма, работающих одновременно для одного и того же субстрата.

После контакта протеасомы с маркированным субстратом инициируется деградация, начинающаяся с неструктурированного участка белковой молекулы (инициаторный участок). Этот регион сходен по строению как у белков млекопитающих, так и у субстратов клеток бактерий и архей – это позволяет предположить, что инициация деградации происходит примерно одинаково и у протеасом, и у их предполагаемых эволюционных предшественников – AAA+ протеаз бактерий (Sauer et al., 2011). Такие аминокислотные последовательности, или дегроны относят к семейству IDP (intrinsically disordered proteins) (Babu et al., 2011). Также показано, что сам процесс убиквитинилирования способен деструктурировать участок молекулы субстрата, делая его доступным для протеолиза. Однако, разворачивание белкового субстрата до первичной структуры осуществляется в первую очередь Rpt – АТФазами 19S-регуляторной частицы. После прохождения линейной белковой молекулы через канал, образованный кольцом α -субъединиц, она попадает в камеру протеолиза и подвергается деградации (Inobe et al., 2014).

Кроме сигнального участка для молекулы убиквитина и инициаторного участка белковые субстраты могут содержать сайты, позволяющие отправлять на протеолиз связанные с ними белки – при этом содержащая такой сайт молекула не подвергается деградации, сохраняя способность присоединять новые молекулы белка с полиубиквитиновой меткой (Elsasser et al., 2004). Такие сайты получили название UbL-UBA (по названию доменов: Ubiquitin-like и Ubiquitin-associated соответственно). Домен UbL взаимодействует с протеасомой, а домен UBA - с полиубиквитиновой цепью (Elsasser et al., 2005). Этот эффект был исследован на дрожевых белках Rad23, демонстрирующих аномально высокую устойчивость к протеасомному протеолизу. Клетки дрожжей также содержат белки Dsk2 и Ddi1, в то время как в клетках млекопитающих это семейство представлено несколько шире. Домен UbL (длиной около 40 аминокислот) расположен на N-конце молекулы-адаптора, причем аминокислотная последовательность близка по составу к соответствующему участку убиквитина (Su et al., 2009). Соответственно, такие молекулы способны связываться с теми же субъединицами протеасомы, что и убиквитин.

Большинство исследователей разделяют гипотезу об использовании данного механизма при деградации отдельных белков в комплексах. Действительно, долгое время было не

ясно, каким образом осуществляется избирательная деградация регуляторных белков клеточного сигналинга или белков-ингибиторов клеточного цикла. Именно по такому механизму происходит протеолиз ингибитора циклин-зависимой киназы Sic1 из комплекса с циклином и циклин-зависимой киназой в клеточном цикле дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Verma et al., 2001). Из вышеописанного следует, что протеасома способна деградировать и субстраты, не взаимодействующие с ней напрямую. Это позволяет предположить, что именно протеасома, а не полиубиквитиновая цепь, обеспечивает избирательность деградации.

Кроме убиквитин-зависимой деградации существует и вторая форма протеасомного протеолиза белков – убиквитин-независимая. Этот путь является основным при деградации белков в клетках бактерий и архей с помощью 20S протеасомы, что указывает на равнозначность этого процесса по сравнению с каноническим. Таким образом очевидно, что в клетках эукариот убиквитин-независимый протеолиз также осуществляется самим 20S-коровым комплексом.

Существует ряд протеасомных субстратов, включающий орнитин-декарбоксилазу (ODC), p53, p73, который подвергается убиквитин-независимому протеолизу. Такие субстраты должны обладать либо собственной меткой, определяющей их деградацию, либо использовать другие белки-маркеры помимо убиквитина. На примере орнитин-декарбоксилазы (для которой впервые было доказано существование подобного пути деградации) показано наличие как неструктурированного N-концевого участка длиной в 37 аминокислот, характерного для большинства субстратов убиквитин-независимого пути, так и специального маркерного белка, так называемого *антизима*, впервые найденного именно для ODC. Такой аминокислотный регион способен самостоятельно взаимодействовать с АТФазами регуляторной частицы протеасомы без помощи полиубиквитиновой метки, а также инициировать деградацию связанных субстратов (Erales et al., 2014).

В убиквитин-независимом протеолизе зачастую задействованы другие типы активаторных частиц, не имеющие АТФазной активности и сайтов связывания с убиквитином. К ним относится, например, семейство REG комплексов (11S или PA28, упомянутые выше), подразделяемые на три компонента – α , β и γ . REG α и REG β – гетерогептамеры, наиболее часто встречаемые в иммунных клетках, осуществляя в них процессинг эпитопов антигенов, а REG γ – гомогептамер – задействован в процессах деградации регуляторных белков клеточного цикла, в частности, p21^{Cip1}, p16^{Ink4a} и p19^{Arf}, а также в деградации коротких пептидов. Наиболее подробно этот процесс рассмотрен для регуляторного белка p21^{Cip1} (Chen et al, 2007).

Отдельно рассматриваются белки, чей протеолиз напрямую зависит от $\alpha 7$ -субъединицы коры (PSMA3). К их числу можно отнести: опухолевый супрессор pRb, регуляторы Egr-1 и p53, α -синуклеин, I κ B α , а также целый ряд белков, включающий в себя разнообразные метаболические регуляторы, транскрипционные факторы (Geng et al., 2012), факторы процессинга и сплайсинга РНК, белки, участвующие в репарации ДНК (Russell et al., 1999) – с уверенностью можно сказать, что этот список будет пополняться.

Несмотря на то, что общие принципы, на основании которых белок отправляется на тот или иной путь деградации, уже достаточно понятны, все еще остаются неясными причины, по которым отдельные белки подвергаются «нетипичному» для них протеолизу. В частности, онкосупрессор p53 с одинаковой эффективностью процессируется как с участием полиубиквитинирования, так и без него (Tsvetkov et al., 2010). В настоящее время предложено несколько гипотез, одна из которых постулирует то, что убиквитин-независимый путь используется клеткой для протеолиза белков, не содержащих лизин. Так во многих вирусных белках лизин отсутствует, поэтому возможно предположить, что путь деградации, связанный с REG γ позволяет контролировать вирус-индуцированный патогенез в клетке (Ben-Saadon et al., 2004).

Роль протеасом в клеточных нарушениях

Разнообразие функций протеасом и сложная регуляция их работы в клетке позволяет использовать их как модельный объект в целом ряде фундаментальных исследований.

Сейчас уже не вызывает сомнений то, что функциональность протеасом зависит не только от активности ее каталитически активных субъединиц и пост-трансляционных модификаций субъединиц протеасом, но и от типа клетки, клеточной локализации, где может понадобиться только одна, строго определенная, функция или активность, что выражается в многообразии клеточных изоформ протеасомных комплексов.

В последние несколько десятилетий протеасомы привлекли внимание исследователей в области онкологии. Так показано, подавление активности протеасомного аппарата (как в целом, так и на уровне отдельных этапов или элементов протеолиза) помогает выявить специфические белки-участники формирования патогенеза при том или ином онкологическом заболевании.

Поскольку субстратами для протеасомной деградации являются онкосупрессоры, компоненты их сигнальных путей и другие белки, непосредственно вовлеченные в

процессы злокачественной трансформации клеток, перспективным видится подход с использованием ингибиторов активности протеасом в качестве компонентов химиотерапии. Так, для химиотерапии множественной миеломы человека (ММ) используется препарат Velcade (бортезомиб), селективно подавляющий протеолитическую активность протеасомы.

Множественная миелома человека

Среди злокачественных иммунопролиферативных заболеваний особое место занимает множественная миелома (ММ). Это заболевание характеризуется сверхэкспрессией легких цепей иммуноглобулинов и однородных иммуноглобулинов, а также аномальной пролиферацией плазматических клеток (дифференцированных В-клеток) в костном мозге. При ММ наблюдается повышенный дефектный иммунный ответ, вследствие повышения количества поврежденных иммуноглобулинов, при этом экспансия миеломных клеток в костный мозг подавляет работу нормальных плазматических клеток – выработка нормальных иммуноглобулинов понижается (Cosemans et al., 2018).

Типы биомаркеров

Основными биомаркерами являются М-протеины (дефектные, в результате мутации кодирующем гене, иммуноглобулины), гемоглобин, β 2-микроглобулины, а также альбумины и С-реактивный белок. Кроме того, прогностическим признаком является потеря онкосупрессора TP53, при наличии мутаций в 17 хромосоме. Маркером ММ может являться и повышенная секреция некоторых цитокинов, в частности, IL-6, IGF-1 и TNF α .

К цитогенетическим биомаркерам относятся: хромосомные транслокации (50% случаев), например t(4;14) или t(14;16), гипердиплоидия нечетных хромосом (50% случаев). Кроме того, ММ характеризуется учащением однонуклеотидных полиморфизмов в регионах 3p, 2p, 6p, 7p, 17p. Для поздней стадии заболевания характерны мутации, инактивирующие регуляцию NF- κ B (транскрипционного фактора). NF- κ B регулирует экспрессию молекул адгезии, контролирующих прикрепление миелоидных клеток к стромальным клеткам красного костного мозга.

Эпигенетические маркеры включают в себя гиперметилирование ДНК на ранних стадиях, и абнормальное ацетилирование гистонов на поздних стадиях ММ. Также, метилирование

ДНК на поздних стадиях специфично для генов, регулирующих клеточный сигналинг, клеточную адгезию, и, в частности, генов, определяющих устойчивость тканей к дексаметазону. Показано, что гиперметилование ДНК при ММ приводит к повышенной экспрессии ряда онкогенов.

В общем виде, все случаи заболевания ММ можно разделить на два типа: гипердиплоидные, к которым относятся все трисомии нечетных хромосом, и негипердиплоидные, характеризующиеся транслокациями в генах, кодирующих тяжелые цепи иммуноглобулинов. Клиническая практика показывает, что пациенты, имеющие гипердиплоидный фенотип, могут рассчитывать на лучший прогноз, чем обладающие негипердиплоидный фенотип.

Сам диагноз ставится на основании следующих критериев: оценка морфологии костного мозга (более 10% опухолевых колоний от общего числа колоний плазмоцитов), наличие моноклональных иммуноглобулинов в сыворотке крови или моче (в основном IgA и IgG), а также при наличии специфических повреждений кости.

Таким образом, терапия ММ зависит от определения генетических нарушений у каждого конкретного пациента. Также цитогенетические характеристики помогают сформировать специфические группы риска.

Да недавнего времени, основными методами лечения были конвенциональные противораковые препараты и глюкокортикостероидная терапия. Сейчас же активно используются такие таргетные препараты, как: иммуномодуляторы (IMiDs), в частности, леналедомид, ингибиторы гистоновых деацетилаз (DACIs) (Eckschlager et al., 2017), моноклональные антитела (mAbs), а также ингибиторы протеасом (PIs).

Стоит упомянуть, что, несмотря на множество разнообразных препаратов, используемых в терапии, ММ все же остается неизлечимым заболеванием. Одной из причин является быстро возникающая резистентность клеток к терапевтическим агентам. Это явление пока изучено слабо, однако, уже найдены некоторые сигнальные белки, возможно участвующие в возникновении такой резистентности. Кроме того, многие авторы считают, что механизмы резистентности уникальны для каждого типа препаратов, что, конечно, заметно затрудняет процесс лечения.

Так как в данной работе мы использовали именно PIs в качестве терапевтических агентов, их химическое строение и механизм действия будут рассмотрены подробно.

Ингибиторы протеасом

Активность протеасом может быть заблокирована полностью, либо селективно, по отдельным протеолитическим сайтам. На данный момент существуют ингибиторы для всех β -субъединиц, однако наибольшей популярностью пользуются блокаторы β 2-субъединицы (трипсин-подобная активность).

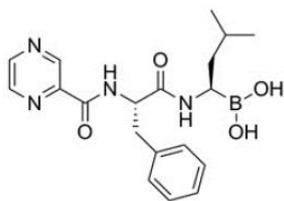
Различают 2 класса протеасомных ингибиторов, в зависимости от их структуры и механизма действия, в частности, от их возможности ковалентно связываться с активным центром ферментативных субъединиц протеасомы. В то время, как нековалентные ингибиторы в клинической практике уже не используются, среди ковалентных ингибиторов наиболее широкое применение получили три класса (по структуре) – боронаты, эпоксикетоны и β -лактоны (Teicher et al., 2015). Ряд препаратов, в том числе Карфилзомиб (см. ниже), уже прошел клинические испытания (проводимые FDA), показав свою эффективность, что в настоящее время позволяет использовать его в терапии. Клинические испытания проводили на разных типах опухолей, в том числе и на клетках множественной миеломы человека, используемых нами.

Пептидные производные борной кислоты (боронаты)

Обратимые ингибиторы химотрипсин-подобной активности. За счет малого размера молекулы способны лучше связываться в сайтом-мишенью, а также обладают лучшей растворимостью и способны проходить через клеточные мембраны - делает их одними из наиболее удобных терапевтических агентов.

Bortezomib (PS-341) – первый в ряду синтезированных ингибиторов, селективно блокирующий химотрипсинподобную активность кора протеасомы, осуществляемую субъединицей β 5 (как упоминалось выше, эта протеолитическая активность является лимитирующей, что объясняет эффективность и, следовательно, популярность бортезомиба в подавлении протеасомной активности). Блок ферментативной активности происходит на счет связывания группы-производного борной кислоты с треонином и лизином активного центра протеасомного кора, причем наблюдается дополнительное связывание второй боронатной группы с N-концевым Thr. По химической природе бортезомиб является дипептидным боронатом (Adams et al., 2004). Было показано, что бортезомиб индуцирует апоптоз во многих типах раковых клеток, в том числе и в клетках множественной миеломы человека. Также влияет на экспрессию транскрипционного фактора NF- κ B, некоторые

цитокиновые взаимодействия, а также влияет на изменение микроокружение красного костного мозга (Jagannath et al., 2004).

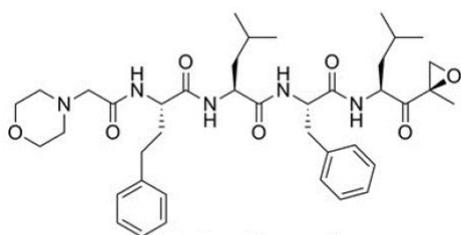


PS-341

Эпоксикетон-производные пептидов

Этот класс ингибиторов отличается от предыдущего тем, что необратимо ингибирует активность протеасомы.

Carfilzomib (PR-171) – селективный ингибитор 20S корового комплекса протеасомы. Он необратимо связывается с N-терминальным треонином активного центра, блокируя таким образом химотрипсин-подобную активность протеасомы. Накопление полиубиквитинилированных белков, не подвергнувшихся деградации в протеасоме, в результате приводит к остановке клеточного цикла, апоптозу и замедлению роста опухоли. По химической природе является тетрапептидэпоксикетоном.

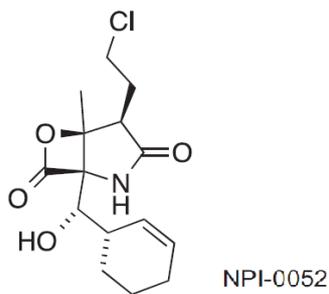


PR-171

Производные лактонов

Также являются необратимыми ингибиторами и связываются с сайтом химотрипсин-подобной активности ($\beta 5$).

Marizomib (NPI-0052) – необратимый ингибитор трех ферментативных активностей 20S-кора протеасомы. В доклинических испытаниях показал высокую цитотоксичность для клеточных линий RPMI 8226 (миеломная клеточная линия). По химической природе является γ -лактам- β -лактоном.

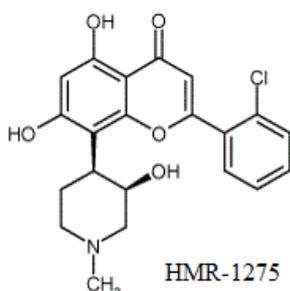


Однако, в настоящее время для успешного лечения ММ недостаточно воздействия только на одну клеточную мишень, поэтому активно разрабатываются подходы, основанные на эффекте синергии между PIs и препаратами-ингибиторами других типов. Предпосылками для этого послужило возникновение лекарственной резистентности к протеасомным ингибиторам.

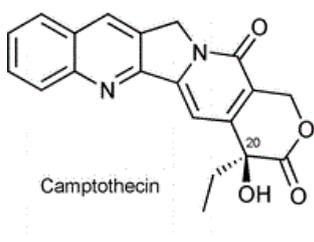
Терапевтические агенты других типов

Как уже упоминалось выше, кроме непосредственно протеасомных ингибиторов в сочетанной терапии используются: стероиды, иммуномодуляторы (IMiDs), ингибиторы гистоновых деацетилаз (DACIs) и моноклональные антитела (mAbs) (Moreau, 2017). В частности, DACIs влияют на прохождение репликации и клеточного цикла в целом, поэтому использование таких ингибиторов может приводить к нарушению клеточного цикла, остановке пролиферации и апоптозу (Moreau et al., 2017). В сочетанной терапии ММ возможны различные сочетания этих агентов и составление систем из двух и более препаратов разной природы. Например, сравнительно недавно показано, что сочетанная обработка клеток ММ генотоксическими препаратами и Бортезомибом значительно повышала эффект терапии.

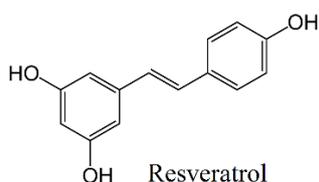
Flavopiridol (HMR-1275) – ингибитор циклин-зависимых киназ. По химической природе является флавоноидом. Клинические испытания показали специфическое ингибирование *in vitro* – при этом наблюдали остановку клеточного цикла в точках G1/S и G2/M. Также, Флавопиридол может участвовать в индукции программируемой клеточной смерти, ингибировании ангиогенеза и регуляции процессов транскрипции.



Camptothecin – ингибитор ДНК-топоизомеразы I. Ковалентно связывается с топоизомеразой и ДНК, с образованием водородных связей. Гидроксильная группа Е-кольца (20е положение) связывается с остатком аспарагиновой кислоты (Asp-533), лактон в составе того же кольца ковалентно связывается с остатком аргинина (Arg-364). С ДНК взаимодействует с D-кольцо, образуя связи с цитозином. Комплекс СРТ, топоизомеразы и ДНК приводит к превращению одностранных разрывов в двустранные, а также предотвращает лигирование цепи, что впоследствии приводит к гибели клетки путем апоптоза.



Resveratrol (3,5,4-тригидрокси-транс-стильбен) – природный фитоалексин, синтезируемый в клетках растений в качестве антибактериального агента. Показано, что ресвератрол обладает онкосупрессорными свойствами, снижает риск сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. В качестве онкосупрессора ресвератрол участвует в индукции апоптоза, подавляет ангиогенез и пролиферацию трансформированных клеток (Akinwumi et al., 2017)



Поскольку большинство биомаркеров ММ имеют белковую природу, логично использовать для их поиска методы протеомики, в последние 20 лет фундаментально изменившей академические и клинические исследования. Особенно широкое применение в этой области получило использование масс-спектрометрии, позволяющей анализировать и сравнивать протеомы целых клеток – что в свою очередь помогло исследователям идентифицировать широкий спектр биомаркеров для различных видов онкологических заболеваний.

Масс-спектрометрические методы в протеомике

Поиск новых терапевтических мишеней и, соответственно, агентов воздействия на них в клетках ММ требует комплексного анализа жизнедеятельности этих клеток. До недавнего времени геномный анализ охватывал все цели и задачи, поставленные перед исследователями. Однако, фактически, он способен показать только количество мРНК, в клетке, то есть уровень экспрессии некоторых генов – а кроме этого необходима информация о действительном количестве белков, их активности, стабильности и структуре. Как известно, в геноме человека закодированы последовательности сотен тысяч белков. Кроме самой аминокислотной последовательности, биохимические характеристики этих белков определяются множеством пост-трансляционных модификаций – и впоследствии экспериментально было доказано, что количество мРНК в клетке (транскриптом) не соответствует количеству белка в клетке. Поэтому новым многообещающим методом стал протеомный анализ, впервые использованный Марком Уилкинсом в 1994 году. Перспективность этого подхода в возможности сравнительного анализа целых протеомов здоровых и поврежденных тканей, и расширения пространства поиска новых биомаркеров того или иного заболевания – в нашем случае, поиск терапевтических мишеней для терапии множественной миеломы человека.

В настоящее время, при работе с протеомами используются такие методы как: иммуноферментный анализ, белковое микрочипирование, а также масс-спектрометрия. Последний метод является, пожалуй, наиболее универсальным и точным для решения задач современной протеомики.

Существует два равнозначных по эффективности способа масс-спектрометрического анализа: лазерная десорбция/ионизация на матрице (MALDI) и ионизация распылением в электрическом поле (ESI) (Fenn et al., 1989).

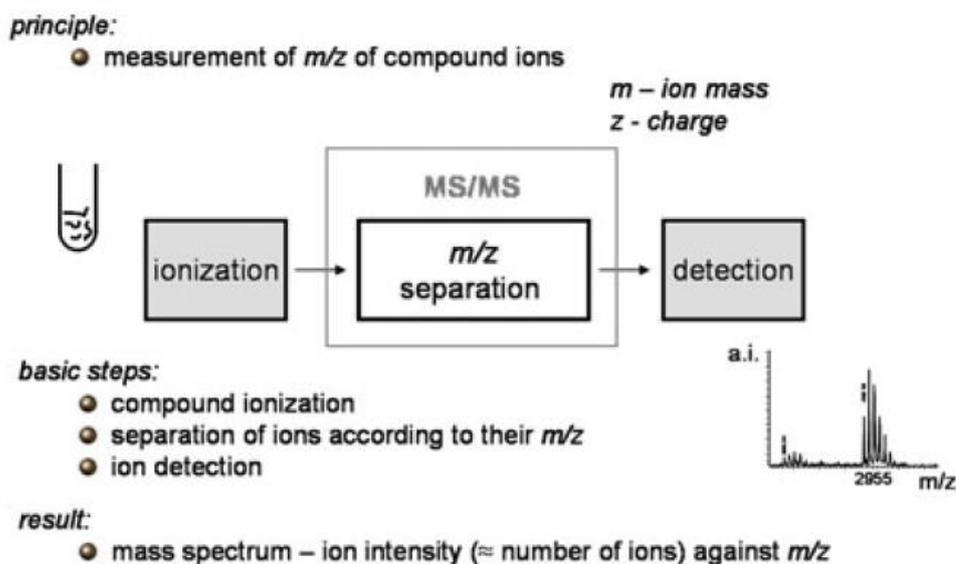


Рис.2 Принцип масс-спектрометрического анализа.

Метод MALDI основан на ко-кристаллизации вещества матрицы с пробой и последующей ионизацией этой смеси короткими лазерными импульсами в вакууме (Parker et al., 2010), а метод ESI заключается в приложении высокого напряжения к выходящей из конического капилляра жидкости - тогда эта жидкость превращается в аэрозоль, а при испарении жидкости из частиц аэрозоля (например, в потоке инертного газа) электрический заряд может переходить на растворенные в этом аэрозоле биомолекулы.

Хотя масс-спектрометрия крайне важна для поисков новых биомаркеров и анализа целых протеомов, например, для выявления ранних признаков заболевания, ее использование связано с множеством нюансов. Так, успешность всего исследования зависит от качества пробоподготовки – при этом нужно учитывать не только количество компонентов пробы, но и их концентрацию относительно друг друга. Очевидно, что эта особенность не дает составить один универсальный протокол пробоподготовки для всех типов протеомов, однако основные этапы повторяются: получение самого образца, выделение интересующей белковой фракции и селективное обогащение отдельных ее компонентов (Brymora et al., 2004). Не лишним будет заметить и роль контаминации кератинами кожи и волос самого исследователя – это может нарушить не только соотношение кератинов в пробе, но и затруднить анализ всей пробы (Plowman, 2007).

Количественная протеомика и поиск возможных опухолевых биомаркеров

В настоящее время постановка диагноза особенно в случае подозрения на онкологическое заболевание, невозможно без комплексного сравнения протеомов здоровых и поврежденных клеток, и последующего выявления характерных для данного заболевания

биомаркеров. Более того, сами биомаркеры могут использоваться не только для определения того или иного заболевания, но и для дальнейшего прогноза (Micallef et al., 2010).

Например, в качестве биомаркеров можно рассматривать ауто-антитела: иммунный ответ на аномально пролиферирующие клетки приводит к все возрастающему количеству таких антител в плазме, и это количество можно детектировать как ранний признак заболевания. Важно и то, что возможный биомаркер должен обладать не только опухолевой специфичностью, но и тканевой – это облегчает локализацию опухоли (Hanash et al., 2008).

Поиск биомаркеров проводится и с помощью специфической обработки клеток различными типами терапевтических агентов (или их сочетаниями). Такой подход позволяет оценить эффективность терапии, выявить значимые изменения в протеомном профиле клетки – и, возможно, выделить новые специфические молекулярные мишени для конкретного типа терапии, и определить причины возникновения резистентности к тому или иному препарату, (что крайне важно при терапии, например, ММ. Чаще всего для обработки клеток используются ингибиторы протеасом (PIs), однако в последние десять лет набирает популярность метод сочетанных обработок, что повторяет общую тенденцию в лечении и изучении множественной миеломы человека.

Методы количественной протеомики с помощью LC-MALDI применены на многих заболеваниях человека, однако нас интересуют именно результаты, полученные на клетках ММ (Koomen et al., 2008). Например, по данным литературы, одним из достоверных биомаркеров является отсутствие экспрессии одной из киназ (GSK), причем контрольные и ММ пробы сравнивались до и после обработки ингибитором протеасом Бортезомибом (см. выше) – в результате, было показано, что Бортезомиб подавляет экспрессию некоторых белков репарации (Mitsiades et al., 2003). Такие результаты получены именно из масс-спектрометрического анализа. Также, некоторые интересные результаты получены из глобального протеомного анализа, целью которого было получить характеристики дексаметазон-активированного апоптоза клеток ММ человека (Rees-Unwin et al., 2007). Идентификация полученного протеома показала снижение экспрессии белков, участвующих в процессах клеточного роста и дифференцировки, в частности, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) – кофактор ДНК-полимеразы, задействованный в репарации ДНК, фортилин – один из клеточных регуляторов апоптоза, SUMO-1 – регулятор количества белковых молекул в клетке. В свою очередь, повышение экспрессии наблюдалось для белков, так или иначе задействованных в процессах посттрансляционной модификации, фолдинга белков, и их транспорта по клетке.

Еще одно исследование основывалось на ставшим в последствии очень распространенным методе совмещения ВЭЖХ и LC-MALDI (Hsieh et al., 2009). Целью было предсказать ответ организма на терапию бортезомибом. Так, было показано, что уровень аполипопротеина С-I значительно повышен в клетках, резистентных к действию бортезомиба.

К перспективным биомаркерам относят и белки-участники Notch-сигналинга, в частности, лиганд Notch – белок Jagged1. Показано, что активация Notch через это лиганд является одной из причин возникновения приобретенной резистентности к бортезомибу (Muguruma et al., 2017). Кроме того, этими же авторами обнаружено, что тот же лиганд активирует Notch-РКС-сигналинг, при этом модуляция активности РКС может стать успешной стратегией нейтрализации эффекта резистентности, характерного для патогенеза ММ.

Материалы и методы исследования.

Объектом исследования были выбраны клетки линии множественной миеломы человека (Im9), часть которых предварительно обрабатывали препаратами *Carfilzomib*, *Bortezomib*, *Resveratrol*, *Camptothecin*, *Flavopiridol*.

Клетки ММ (линии Im9), полученные из Российской коллекции клеточных культур (ИНЦ РАН), культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в среде RPMI1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 0.004% гентамицина. Обработку клеток комбинациями RB, CmB, FC – бортезомиб (2.5 нМ), карфилзомиб (2.5 нМ), камптотецин (1 мкМ), флавопиридол (250 нМ), ресвератрол (25 мкМ) – проводили в течение 20 ч.

Методы

1. Выделение белка слияния

1.1. Приготовление селективных сред для *E. coli*

При наращивании культур *E. coli* использовали среду LB (жидкую и агаризованную).

Состав жидкой среды: 1.5% LB (дрожжевой экстракт, NaCl, пептон) (Luria et al., 1960). LB-среду, содержащую агар, готовили в расчете на 5 чашек Петри (100 мл: 1.5% LB, 1,5% агара). Банки с селективными средами автоклавировали. После остывания среды в нее добавляли ампициллин (0.01%).

1.2. Трансформация компетентных клеток *E. coli* (штамм Rosetta)

Компетентные клетки размораживали на льду и брали аликвоту 100 мкл, после чего добавляли плазмидную ДНК (плазида GST-PSMA3, содержащая вектор устойчивости к ампициллину), в концентрации 20 нг/мкл. Далее инкубировали пробы на льду (30 мин), подвергали тепловому шоку (45 сек при 42 °С в термостате), затем оставляли инкубироваться на льду (10 мин). Добавив LB-среду с ампициллином, оставляли в термостате на час при 37 °С при постоянной аэрации.

Клетки центрифугировали (6000 об/мин, 1 мин; радиус ротора 8.8 см). Отбирали часть супернатанта, остаток ресуспендировали и высевали на чашки Петри с застывшей агаризованной LB-средой. Чашки оставляли на ночь при 37 °С.

1.3. Нарращивание белков слияния

С чашек отбирали колонии, растущие на среде с ампициллином, а, следовательно, несущие нужные плазмиды. Из каждой чашки в отдельную пробирку с LB-средой, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), переносили колонии с определенной плазмидой. Пробирки ставили на ночь в термостат при покачивании (37°С).

На следующий день содержимое пробирок переносили в больший объем среды LB (400 мл) и оставляли в термостате до достижения оптической плотности растворов 0.4-0.6 (длина волны 600 нм, спектрофотометр BioRad). После этого в каждую бутылку с растущими бактериями добавляли IPTG (изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид, конечная концентрация в среде 1 мМ), для индукции экспрессии интересующих нас белков. Спустя каждый час отбирали 1 мл среды с бактериями для проведения почасового скрининга методом электрофореза; таким образом аликвоты отбирали каждый час в течение 4 часов, чтобы убедиться, что необходимый белок экспрессируется в клетках – пробы для скрининга хранили на 4°С, электрофорез проводили на следующий день.

Затем оставшуюся среду с бактериями переносили в пробирки на 50 мл и центрифугировали (2000 об/мин, 7 мин, +4°С; радиус ротора 17.2 см). Супернатант сливали, пробирки с осадками хранили при температуре -70 °С.

2. Аффинная хроматография белков слияния на глутатион-сефарозе

2.1. Приготовление лизирующего буфера

Лизирующий буфер содержал 130 мкг/мл лизоцима, разведенного в PBS, 0,1%-ный NP-40 и 1 мМ PMSF.

2.2. Отмывка белков слияния

Клетки бактерий, содержащие белки слияния, ресуспендировали в лизирующем буфере и инкубировали на льду 15-20 мин. Затем пробы обрабатывали ультразвуком на холоду (Ultrasonic Processor, амплитуда 90%; обработка каждой пробы 3 раза по 10 секунд).

Клеточные экстракты центрифугировали (20 мин, 15000 g, +4 °C). К супернатанту, отобранному в новые эппендорфы, добавляли 300 мкл суспензии глутатион-сефарозы (около трети от объема конкретной пробы), предварительно промытой от спирта раствором PBS. Смесь инкубировали 1 ч при постоянном вращении на +4 °C. Далее, иммобилизованные на глутатион-сефарозе белки центрифугировали (1000 g, 5 мин), затем промывали буфером для отмывки на основе PBS, содержащий 1 мМ PMSF, 0.1 % NP-40 (pH 8.0) (5 раз), а после – раствором PBS (5 раз). Пробы хранили на +4°C.

3. Аффинная хроматографическая очистка (GST pull down; аффинная адсорбция)

На данном этапе проводили выделение и очистку протеасомо-ассоциированных белков из экстрактов цитоплазмы и нуклеоплазмы с помощью белков слияния на глутатион-сефарозе (Smith et al., 1988). Для получения белковых экстрактов цитоплазмы и нуклеоплазмы использовали два буферных раствора: А (10 мМ трис-НСl, (pH 7.9), 1.5 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 0.5 мМ DTT, 0.5 мМ PMSF, коктейль ингибиторов протеаз Roche) и С (20 мМ трис-НСl, (pH 7.9), 1.5 мМ MgCl₂, 0.2 мМ PMSF, 20% глицерин, 420 мМ NaCl, коктейль ингибиторов протеаз Roche).

В эппендорфы с клетками добавляли равные объемы буферного р-ра А. Пробы инкубировали на льду в течение 15 мин. После инкубации пробы переносили в стеклянный гомогенизатор Поттера, перетирали пробы 15 раз. Затем пробы центрифугировали (5000 g, 10 мин). Супернатант отбирали в новые пробирки. К оставшимся в эппендорфах осадкам добавляли буферный р-р А для промывки осадков ядер; ресуспендированную смесь центрифугировали (5000 g, 10 мин). Супернатант отбирали; к осадкам добавляли буферный р-р С, после чего всю смесь переносили в гомогенизатор. Пробы с ядерными экстрактами после обработки в гомогенизаторе оставляли для инкубации на льду (25-30 мин), после чего эти пробы центрифугировали (19000 g, 20 мин). Затем отбирали супернатант, к осадкам

добавляли буферный раствор С и обрабатывали пробы ультразвуком на холоду (Ultrasonic Processor, амплитуда 90%; обработка каждой пробы 3 раза по 10 секунд). Далее пробы центрифугировали (19000 g, 20 мин). После этого супернатант снова отбирали и объединяли с предыдущими ядерными экстрактами.

Чтобы провести связывание специфических белков из экстрактов цитоплазмы и ядра с белками слияния, пробы инкубировали с буферным р-ром для связывания БДС (15%-ный глицерин, 50 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 5 mM DTT, коктейль ингибиторов протеаз Roche). Далее, в каждую из проб вносили аликвоту глутатион-сефарозу с иммобилизованным на ней GST (с целью предотвращения неспецифического связывания). Инкубировали час на +4 °С, затем пробы центрифугировали (2000 об/мин, 3 мин, радиус ротора 17.2 см). Супернатант отбирали в новые пробирки, после чего добавляли аликвоты глутатион-сефарозы с иммобилизованными на ней белками слияния (GST- α 7). Экстракты инкубировали на +4 °С при постоянном вращении в течение ночи.

После инкубации пробы центрифугировали (2000 об/мин, 3 мин, радиус ротора 17.2 см), далее осадки три раза промывали 1х БДС с 0.5% NP-40 и центрифугировали (2000 об/мин, 3 мин; радиус ротора 8.8 см). Затем, в буфер (БДС) добавляли NaCl до конечной концентрации 150 mM и центрифугировали пробы. Для снятия белков с сефарозы в пробы вносили р-р для экстракции (20 mM глутатиона, 100 mM трис-HCl, 0.1% NP-40, 140 mM NaCl, pH 8.0). Пробы с глутатионовым буфером инкубировали при постоянном вращении в течение 30 мин на +4 °С, после чего центрифугировали (2000 об/мин, 3 мин; радиус ротора 8.8 см). Супернатанты концентрировали и обессаливали центрифугированием на микроконцентраторах Amicon-0.5 10K (Millipore). Концентрацию белка в пробах оценивали по методу Брэдфорд. Полученные пробы хранили на -20°C.

4. Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях

Анализ выделенных белков проводили с помощью электрофореза по методу Лэммли с модификациями (Laemmli, 1970).

Растворы:

- ПААГ 10% (соотношение AA/бис-AA - 37.5:1); использовали сток-растворы акриламида 50 % и метилен-бисакриламида 2,5 %
- буфер В (1.5 M трис-HCl, pH 8.8-8.9, 0.4 % SDS) 2^x

- PSA 0.44 ‰
- TEMED 1.1‰

В качестве электродного буфера использовали трис-глициновый буфер pH 8,3 1^x (25 мМ трис, 192 мМ глицин и 0,1 ‰ SDS).

Пробы смешивали с буфером Лэммли (4% SDS, 0,5 М трис-HCl, pH 6.8) в соотношении 3:1, добавляли DTT до конечной концентрации 50 мМ; инкубировали 10 мин (37 °C). В качестве стандарта молекулярных масс использовали предокрашенный маркер PageRuler 10-200 kDa

Электрофорез вели в камере Mini-PROTEAN® Tetra (BioRad) при напряжении 40 В. Через 15-20 минут напряжение увеличивали до 130 В.

Гели окрашивали раствором Кумасси (0,125 ‰ Coomassie Brilliant Blue G250, 10 ‰ уксусной кислоты, 45 ‰ этанола) в течение 30 минут, а затем отмывали от красителя с помощью 7 %-ной уксусной кислоты (кислоту в ванночках обновляли не менее двух раз).

5. Пробоподготовка для масс-спектрометрии

5.1. Трипсинолиз в геле

Растворы:

1) Раствор I:

Феррицианид калия 30 мМ

Тиосульфат натрия 100 мМ

2) Раствор II:

Ацетонитрил 50%

Бикарбонат аммония 100 мМ

3) Раствор III:

Бикарбонат аммония 10 мМ

DTT 10 мМ

4) Раствор IV:

Йодацетамид 50 мМ

5) Раствор V:

Бикарбонат аммония 50 мМ

Трипсин 0,0001 % (0.01% трипсина в 0.25% р-ре уксусной к-ты, из которого в р-р бикарбоната аммония 50 мМ добавляли сотую часть)

Полосы, содержащие белок, вырезали из геля скальпелем и переносили в заранее подписанные пробирки. В каждую пробирку с пробой добавляли р-р I в соотношении 2:1 и инкубировали 5 минут до окрашивания частиц геля в желтый цвет. После этого р-р I отбирали и промывали пробирки водой, добавляя тот же объем воды, до исчезновения окраски.

1. Добавляли такой же объем (в соотношении 2:1) р-ра II, инкубировали 2 раза по 10 минут, отбирая надосадочную жидкость после каждого раза.
2. Добавляли 100% ацетонитрил для дегидратации гелей
3. Пробы сушили с помощью ротационного вакуумного концентратора (Martin Christ RVC 2-33 IR) в течение 30 минут.
4. Добавляли р-р III после чего инкубировали пробы при температуре 57°C в течение 40 минут, далее р-р III отбирали.
5. Добавляли р-р IV и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 20 минут
6. Повторяли пункты 1, 2, 3.
7. Добавляли р-р V и оставляли пробы на ночь при температуре 37°C (трипсинолиз в геле)

5.2. Экстракция пептидов из геля

1) Раствор VI:

ТФУ 0,1 %

2) Раствор VII:

ТФУ 0,1 %

Ацетонитрил 50 %

3) Раствор VIII:

Ацетонитрил 95 %

ТФУ 0.1 %

1. Последовательно добавляли р-ры VI, VII и VIII, инкубируя в течение 20 минут. Для более эффективной экстракции пептидов инкубацию проводили в термощейкере при комнатной температуре
2. Экстракты сушили в ротационном вакуумном концентраторе до полного высыхания проб (в среднем 3-4 часа).
3. Осадки растворяли в р-ре VI, осветляли центрифугированием и наносили на хроматографическую колонку.

6. Хроматографическое разделение белков

Проводили в системе ВЭЖХ на приборе Миллихром, совмещенным с МАЛДИ-споттером. Использовали колонку с обращенной фазой JupiterProteo C12, мертвый объем колонки 350 мкл (7 минут). Пептиды с колонки смывали градиентом ацетонитрила (от 10 % до 50 %) с 0,1% трифторуксусной кислоты в объеме 2,3 мл. Скорость потока выставляли 50 мкл/мин, хроматографию проводили в течение 45 минут.

7. Масс-спектрометрический анализ

Проводили на приборе AB Sciex TOF/TOF 5800 в режиме рефлектрона (МС) и tandemной масс-спектрометрии (МС/МС). Управление масс-спектрометром осуществляли с помощью программы TOF/TOF Series Explorer, в результате чего были получены пики масс-спектров, соответствующие определенному соотношению массы к заряду. Данные о масс-спектрах направляли в программу Protein Pilot, использующую поисковую машину Mascot, для анализа масс-спектров с помощью международных баз данных (SwissProt, UniProt, NCBI) для идентификации пептидов и определения белков.

8. Биоинформатический анализ

Проводили с использованием языка программирования R и базы данных Uniprot, а также платформы STRING (для определения сети взаимодействий между белками полученных протеомов) и программы GO (Gene Ontology). Поиск участков внутренней неупорядоченности проводили с помощью платформы CSpritz (<http://protein.bio.unipd.it/cspritz/>).

9. Иммуноблоттинг

Для выборочного подтверждения масс-спектрометрической идентификации белков использовали метод вестерн-блоттинга.

Растворы:

1) Буфер для переноса:

Трис 25 мМ

Глицин 192 мМ

Метанол 10 %

SDS 0,1 %

2) Фосфатно-солевой буфер (PBS):

3) PBST:

NaCl 0,137 М

KCl 0,0027 М

Фосфаты 0,01 М

Твин 20 0,1%

ПААГ для Вестерн-блоттинга готовили по упомянутой выше методике для электрофореза по Лэммли (Laemmli et al., 1970) с модификациями. Сэндвич для переноса составляли из:

- хроматографической бумаги Whatman 3ММ

- ПВДФ мембраны Immobilon P (Millipore)

- ПААГ

Перед сборкой сэндвича мембрану активировали в метаноле. Каждый из компонентов сэндвича инкубировали в буфере для переноса в течение 10 минут. Блоттинг проводили в течение 1,5 часов при 400 мА со стабилизацией по току.

После переноса ПВДФ мембрану помещали в фосфатно-солевой буфер, промывали на качалке в течение 5 минут. Для блокирования сайтов неспецифического связывания мембрану инкубировали при покачивании в 5 %-ном растворе сухого обезжиренного молока в буфере PBST в течение 1 часа.

Мембрану погружали в первичные антитела (в необходимом разведении в буфере PBST с 5 % сухого обезжиренного молока) и инкубировали в течение ночи при температуре +4°C, после чего мембрану отмывали в 6 сменах PBST. Вторичные антитела (конъюгированные с пероксидазой хрена) в разведении 1:15000 также растворяли в PBST буфере с 5 % сухого

обезжиренного молока; инкубацию вели при комнатной температуре в течение 1,5 часов. От избытка вторичных антител мембрану отмывали в 6 сменах PBST. Связавшиеся антитела визуализировали с помощью набора ECL-реагентов SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo scientific), хемилюминесценцию детектировали с использованием установки ChemiDoc (BioRad).

Результаты и обсуждение.

Целью данной работы было выявить и проанализировать белки, взаимодействующие с субъединицей $\alpha 7$ 20S корового комплекса протеасомы, то есть, потенциальные белки-мишени убиквитин-независимого пути протеолиза. Для этого рекомбинантный GST-PSMA3 наращивали в компетентных клетках *E.coli*, производили его аффинную очистку на глутатион-сефарозе и проводили инкубацию с экстрактами ядра и цитоплазмы клеток MM.

1. Выделение рекомбинантного белка GST- $\alpha 7$ и его очистка методом аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе

Клетки *E.coli* (штамм Rosetta) были трансформированы плазмидой, несущей последовательность ДНК, кодирующую белок слияния GST-PSMA3. На рисунке 1 приведена электрофореграмма почасового скрининга после индукции экспрессии белка слияния.

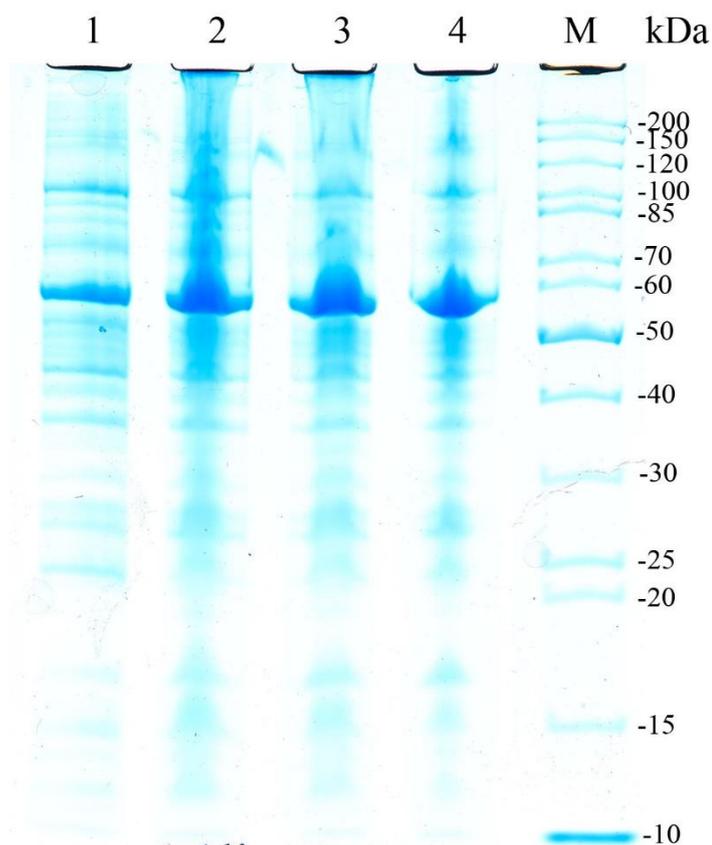


Рис.1 Электрофореграмма почасового скрининга рекомбинантного белка GST-PSMA3. Цифрами указаны стандартные молекулярные массы белка.

1 – аликвота среды с *E.coli* спустя 1 ч после добавления IPTG

2 – аликвота среды с *E.coli* спустя 2 ч после добавления IPTG

3 – аликвота среды с *E.coli* спустя 3 ч после добавления IPTG

4 – аликвота среды с *E.coli* спустя 4 ч после добавления IPTG

M – маркер (PageRuler 10-200 kDa)

Осветленные центрифугированием лизаты клеток инкубировали с суспензией глутатион-сефарозы, после чего промывали фосфатно-солевым буфером. Аликвоты глутатион-сефарозы после инкубации и отмывок наносили на ПААГ.

На рис. 2 показаны результаты аффинной хроматографической очистки рекомбинантного белка GST-PSMA3.

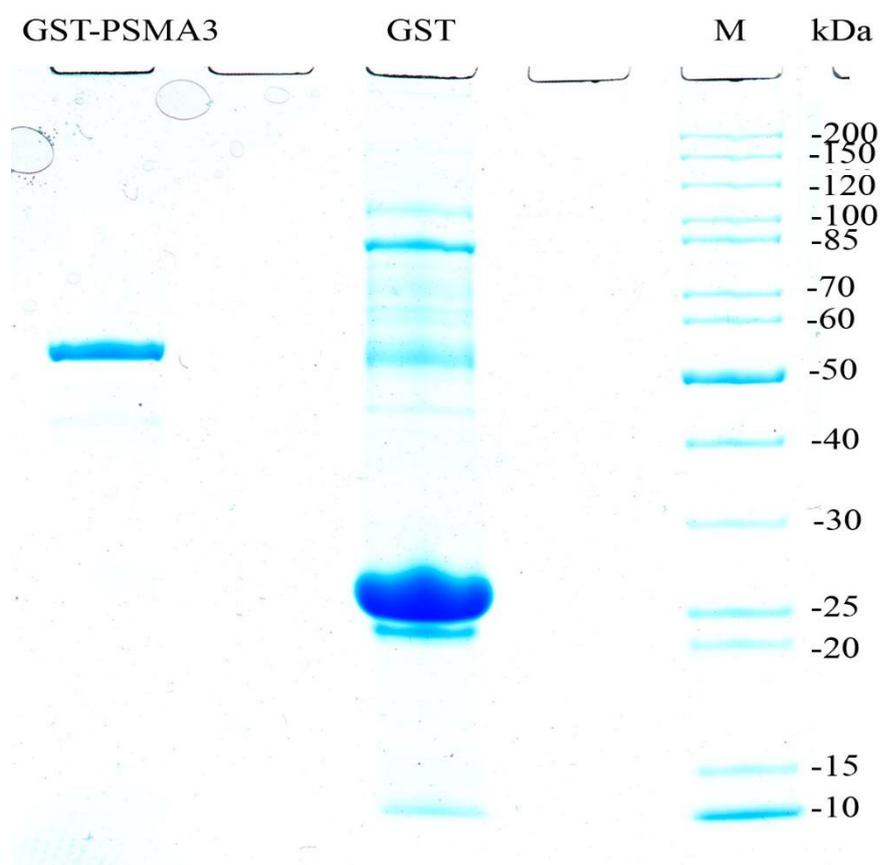


Рис.2 Электрофореграмма продуктов аффинной очистки рекомбинантного белка GST-PSMA3. Цифрами указаны стандартные молекулярные массы белка.

GST-PSMA3 – очищенный рекомбинантный белок слияния

GST – фракция бактериального белка (25 kDa)

M – маркер (PageRuler 10-200 kDa)

В итоге, с помощью SDS-электрофореза показано наличие рекомбинантного белка GST-PSMA3 в пробах, а также эффективность используемого метода (АХ). Минорные фракции большей массы могут свидетельствовать о недостаточной отмывке проб от несвязавшегося материала

В дальнейшем, аффинно очищенный рекомбинантный белок был использован для выделения протеасомо-связанных белков цитоплазмы и нуклеоплазмы.

2. Обработка клеток ММ несколькими сочетаниями препаратов-ингибиторов

В соответствии с ранее проведенными проточной цитометрией и МТТ тестом (для проверки эффективности индукции апоптоза выбранными сочетаниями препаратов) были отобраны три варианта сочетанных обработок: CmB (камптотецин/бортезомиб), RB (ресвератрол/бортезомиб), FC (флавопиридол/карфилзомиб). Данные сочетания были

выбраны, исходя из их комплексного действия на клетку: протеасомные ингибиторы (бортезомиб, карфилзомиб) подавляют протеолитическую активность протеасом, приводя к накоплению короткоживущих регуляторных белков, а цитотоксические агенты (ресвератрол, камптотecin, флавопиридол) обеспечивают специфичность наборов таких белков, в зависимости от механизма цитотоксичности данных препаратов.

3. Выделение экстрактов цитоплазмы и нуклеоплазмы из культуры клеток множественной миеломы человека (Im9) в контроле и после сочетанных обработок. Связывание белка слияния на глутатион-сефарозе с протеасомо-ассоциированными белками цитоплазматических и ядерных экстрактов (GST pull-down).

На данном этапе получали экстракты нуклеоплазмы и цитоплазмы клеток MM в контроле и после обработок (см. Материалы и методы).

Сначала проводили пре-инкубацию экстрактов с GST для предотвращения неспецифического связывания белков только с одной из частей белка слияния. Таким образом, можно с уверенностью сказать, что в итоговых пробах присутствуют только те белки, которые взаимодействуют с PSMA3. После чего экстракты инкубировали с иммобилизованным на глутатион-сефарозе белком GST-PSMA3.

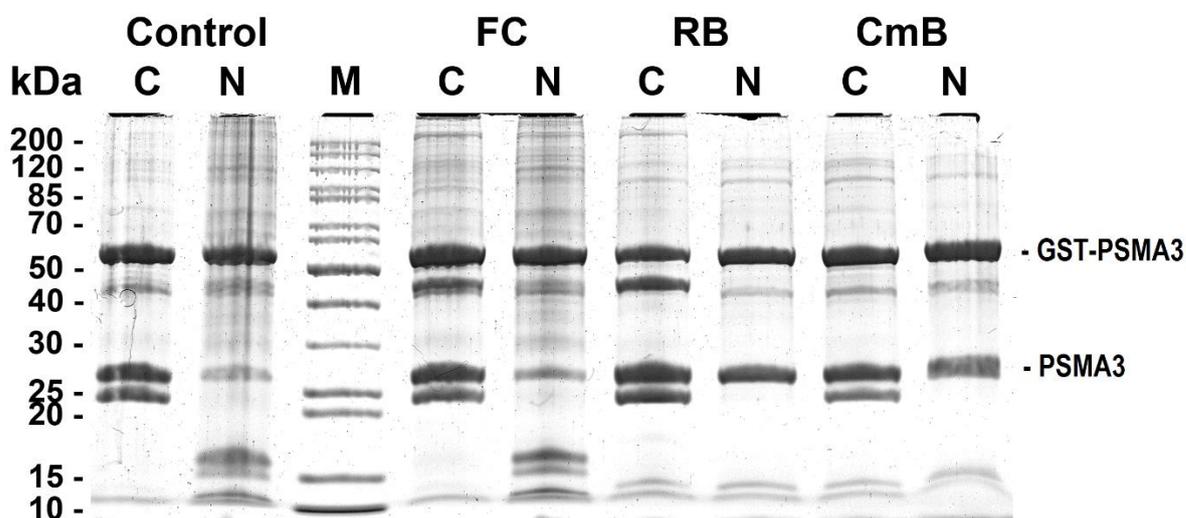


Рис.3 Электрофореграмма продуктов аффинной хроматографической очистки (GST pulldown). Цифрами указаны стандартные молекулярные массы белка.

C, N – цитоплазматические и ядерные экстракты соответственно

Control – контрольная группа

FC, RB, CmB – типы обработок

На рис. 3 показаны результаты электрофоретического разделения очищенных интерактомов PSMA3 цитоплазмы и ядра, как из контрольных проб, так и после сочетанных обработок.

В результате данного этапа получены гетерогенные группы белков, специфически взаимодействующих с $\alpha 7$ -субъединицей 20S корового комплекса протеасомы в клетках множественной миеломы человека линии Im9. При этом, получены отдельные популяции белков как для контрольных проб, так и для каждого из типов обработок.

4. Идентификация выделенных белков методом тандемной масс-спектрометрии.

Следующий этап работы заключался в выделении интересующих нас белков из геля и их анализ методами масс-спектрометрии. Полосы геля (GST-PSMA3) вырезали и подвергали трипсинолизу, получая в результате смесь пептидов 800-4000 Да. Далее полученные таким образом пептиды экстрагировали из геля с помощью смеси ТФУ и ацетонитрила.

Результаты ВЭЖХ для контрольной пробы показаны на рисунке 4.

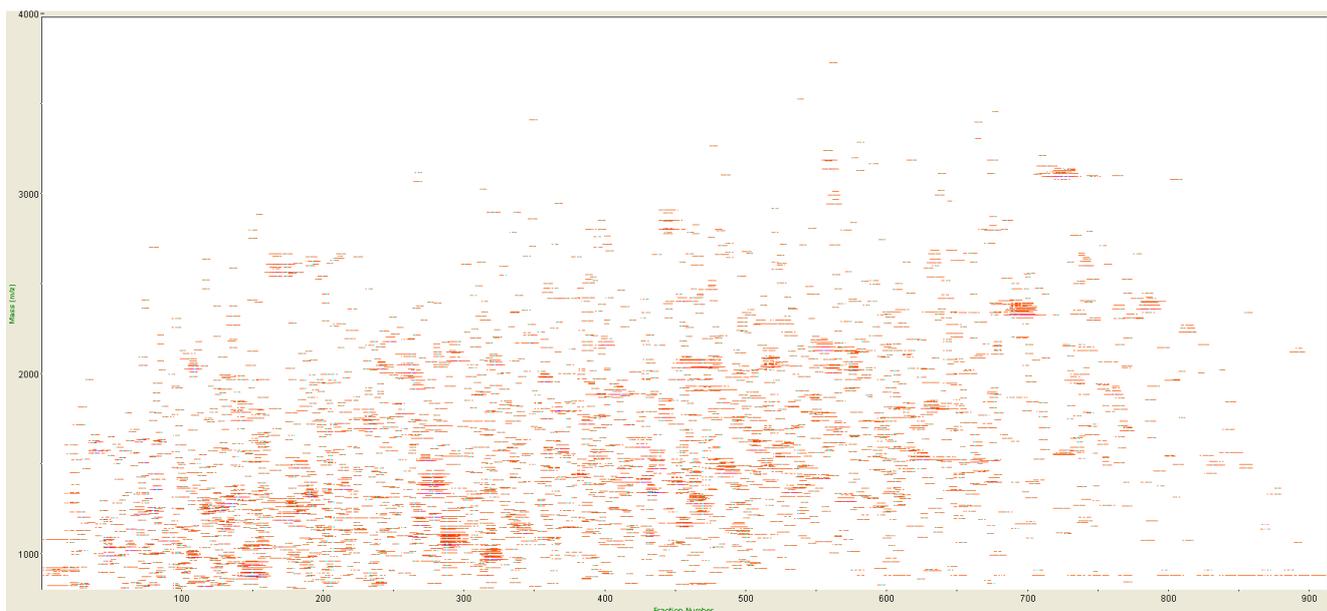


Рис.4 Хромато-масс-спектр, показывающий разделение компонентов пробы по градиенту концентрации ацетонитрила в смеси с ТФУ. Проба ИКС (клеточная линия Im9, контроль, экстракт цитоплазмы). По оси абсцисс отложены номера фракций, по оси ординат – отношение массы к заряду (m/z); заряд равен 1, то есть по оси ординат отложены массы родительских ионов.

Масс-спектрометрический анализ специфических протеомов давно зарекомендовал себя, как эффективный инструмент исследования. Наиболее общая схема анализа белковых фракций должна включать в себя очистку и обогащение пробы интересующими белками,

разделение пробы электрофоретически и/или хроматографически, трипсинолиз белковых образцов и масс-спектрометрическую идентификацию образцов, с получением MS и MS/MS спектров, соответствующим определенным пептидам.

5. Выборочное подтверждение результатом масс-спектрометрии иммуноблоттингом

Результаты масс-спектрометрического анализа были выборочно подтверждены методом иммуноблоттинга. Взятые антитела к тем белкам, роль которых в канцерогенезе была ранее подтверждена в литературе. Например, большое количество экспериментальных данных указывают на РНК-связывающий ядерный белок ELAVL1 (HuR), как на одного из ключевых участников канцерогенеза и малигнизации клеток при развитии ряда онкологических заболеваний (Wang et al., 2016). По результатам иммуноблоттинга выявлено его преимущественная локализация в нуклеоплазме, что согласуется с литературными данными. Большой интерес представляет и митохондриальный белок прохибитин, заявленный многими исследователями, как потенциальный онкосупрессор, влияющий на уровень клеточной пролиферации и регуляцию апоптоза (Ross et al., 2017).

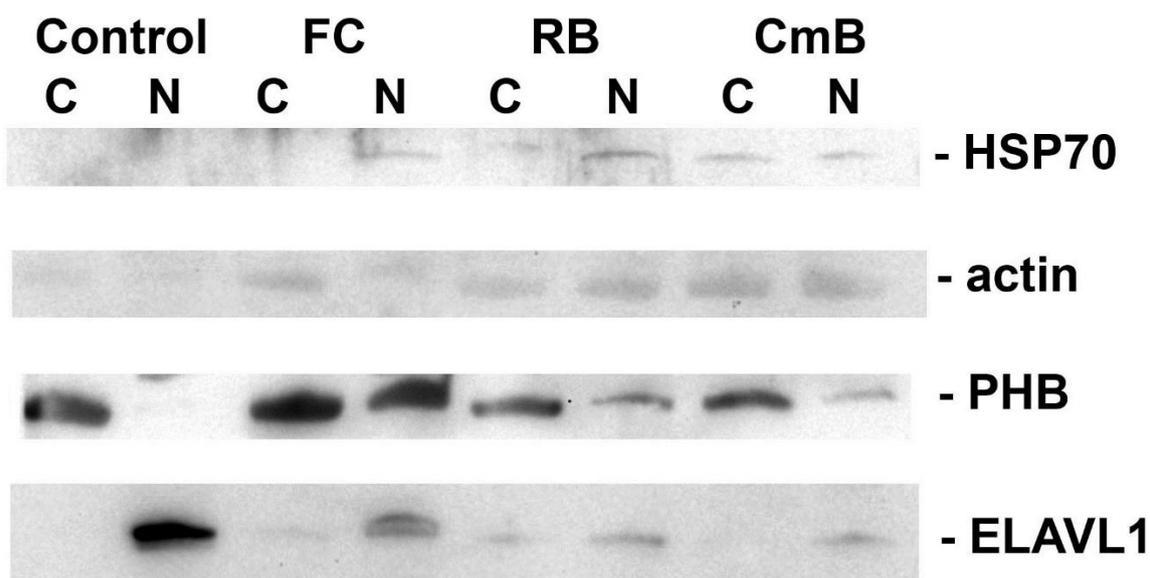


Рис.5 Результаты иммуноблоттинга для смеси белков, взаимодействующих с PSMA3.

6. Оценка влияния различных типов сочетанных обработок на клетки ММ, на основании различий белковых профилей полученных проб.

Для данной работы наибольший интерес представляли короткоживущие регуляторные белки. Их динамика в клетках, обработанных различными сочетаниями препаратов-ингибиторов, могла бы наглядно продемонстрировать как эффекты синергии между препаратами одного типа обработки, так и разницу в терапевтическом эффекте между препаратами разных типов обработок.

Так, в результате тандемной масс-спектрометрии были идентифицированы 373 белка, уникальных для контрольной группы, 9 белков, уникальных для обработки препаратами бортезомиб и камптотецин, 15 белков, уникальных для обработки препаратами бортезомиб и ресвератрол, и 33 белка, уникальных для обработки препаратами карфилзомиб и флавопиридол. В дальнейшем, среди этих уникальных белков были отобраны потенциальные белки-мишени для терапии ММ (см. Таблица 1).

Таблица 1. Список белков-потенциальных мишеней для терапии множественной миеломы человека

Тип обработки	Ген	Белок-мишень	Клеточные процессы	Терапевтический агент (при наличии)	Ссылки
СмВ	RPS4X	X-связанный 40S рибосомальный белок (40S ribosomal protein S4, X isoform)	регуляция пролиферации	-	(Watanabe et al., 1991)
	HNRNPU	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин U (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U, SAF-A)	организация хроматина, сплайсинг мРНК, регуляция транскрипции, ответ на повреждения ДНК	-	(Vizlin-Hodzic et al., 2011)
	CCAR2	Белок-регулятор клеточного цикла и апоптоза 2 (Cell cycle and apoptosis regulator protein 2)	регуляция апоптоза при повреждениях ДНК, регуляция клеточного цикла	-	(Giguere et al., 2016)
	HSP90AB1	Шаперон HSP90 (Heat shock protein HSP 90-beta)	клеточный ответ на стрессовые факторы	Гельданамицин (Geldanamycin)	(Garcia-Carbonero et al., 2013)
FC	PDIA6	Дисульфидизомераза A6 (Protein disulfide-isomerase A6)	Регуляция апоптоза, регуляция фолдинга белка, регуляция Wnt-сигналинга	MG-132 (ингибитор протеасом, косвенно регулирующий активность PDIA6)	(Gao et al., 2016)
	SLC25A6	АТФ/АДФ-транслоказа 3 (ADP/ATP translocase 3)	регуляция апоптоза по митохондриальному пути	-	(Verrier et al., 2003)
	DDX17	p72 (Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17)	участие в процессах сплайсинга мРНК, регуляция транскрипции	-	(Dardenne et al., 2014)
	RTN4	Ретикулон (Reticulon-4)	регуляция апоптоза	-	(Tagami et al., 2000)

	RPS3	Рибосомальный белок S3 (40S ribosomal protein S3)	клеточный ответ на повреждения ДНК, эндонуклеазная активность	Брефельдин А (Brefeldin A), Туникамицин (Tunicamycin)	(Kim et al., 2016)
RB	RPS7	Рибосомальный белок S7 (40S ribosomal protein S7)	регуляция трансляции, негативная регуляция убиквитин-зависимого протеолиза	-	(Chen et al., 2007)
	RPS17	Рибосомальный белок S17 (40S ribosomal protein S17)	регуляция трансляции, процессинг рРНК	-	(Kenney et al., 2015)
	FSCN1	Фасцин (Fascin)	регуляция миграции клеток, связывание актиновых филаментов	-	(Hashimoto et al., 2011)
	SYNCRIP	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин Q (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q)	Регуляция транскрипции, регуляция апоптоза	-	(Kim et al., 2012)

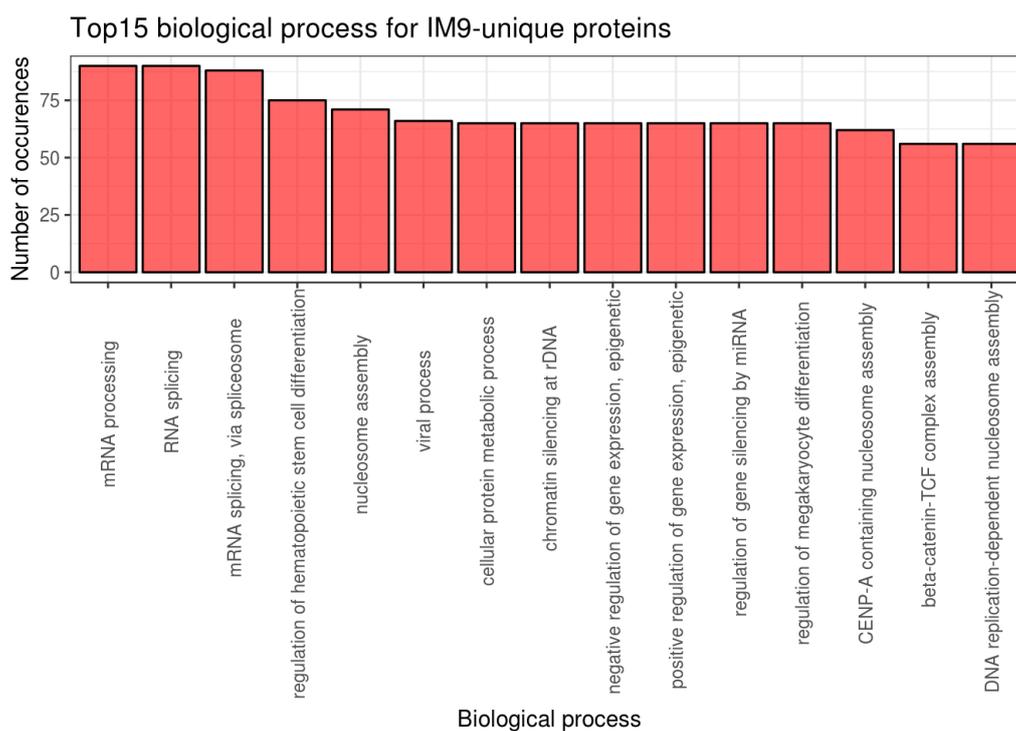


Рис. 6 Гистограмма распределения биологических процессов, в которых задействованы белки, уникальные для контрольной группы клеток линии Im9. Очевидно преобладание процессов, связанных с метаболизмом нуклеиновых кислот.

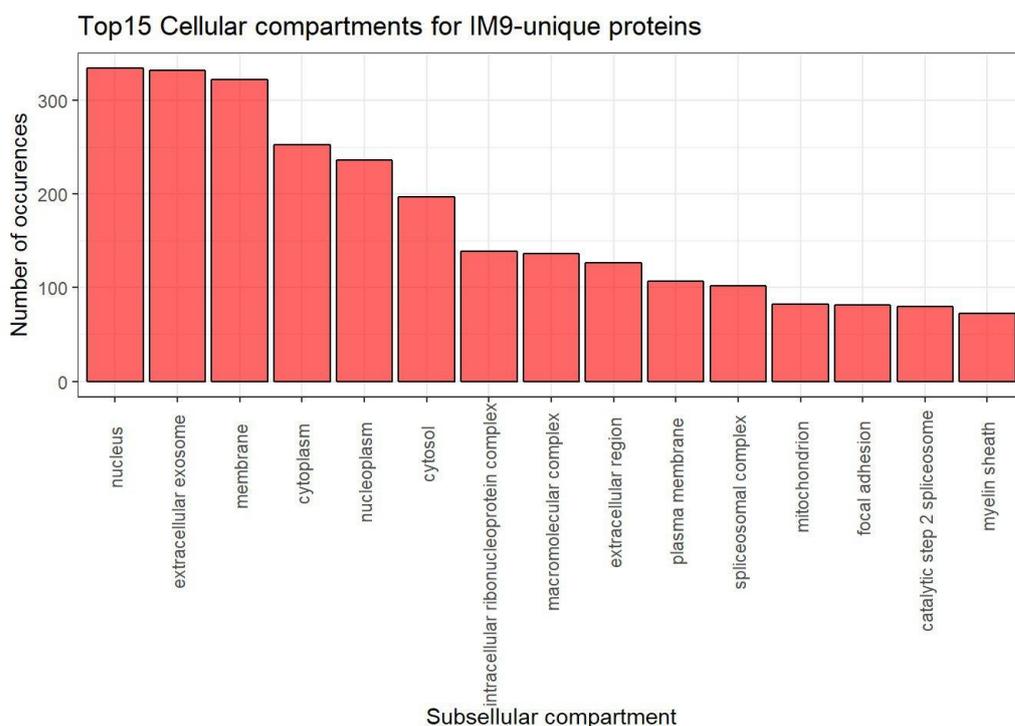


Рис. 7 Гистограмма GO, показывающая распределение идентифицированных белков по клеточным компартментам контрольной группы клеток линии Im9. Присутствие большого количества мембранных белков может быть связано с недостаточной эффективностью экстракции белков.

Общие характеристики протеасомо-ассоциированных протеомов, полученные с помощью платформы GO, таковы:

1. Контрольная группа характеризуется наибольшим числом белков, и, соответственно, большим разнообразием их функций и биологических процессов, в которых задействованы эти белки. При этом значительное количество идентифицированных белков участвуют в процессинге, сплайсинге и транспорте мРНК (рис. 6). Стоит отметить, что примерно такое же функциональное распределение характерно и для белков, идентифицированных в пробах, обработанных препаратами-ингибиторами.
2. Во всех пробах присутствует большое количество цитоскелетных белков, причем их распределение не зависит от клеточного компартмента или типа обработки клеток. Кроме того, найден ряд белков, связанных с реорганизацией цитоскелета. Известно, что протеасомы тесно взаимодействуют с белками цитоскелета (Otero et al., 2014), однако не исключено и образование белковых комплексов, что является одним из недостатков метода pull-down.

3. Во всех пробах имеется значительное количество белков, связанных с экзосомальным транспортом. На рис.7 показано, что белки, характерные для внеклеточных экзосом, обнаруживаются среди исследуемых протеомов так же часто, как белки клеточного ядра. Можно предположить, что такие белки относятся к так называемым *онкосомам* (термин, впервые примененный к экзосомальным везикулам клеток глиомы, а позднее заимствованный для обозначения экзосом клеток других типов опухолей (Al-Nedawi et al., 2008)). Показано, что для клеток ММ характерна секреция везикул, содержащих микроРНК, которые в свою очередь, вовлечены в межклеточные взаимодействия и сигнальные пути, задействованные в патогенезе ММ (Yamamoto et al., 2018).
4. Учитывая вышесказанное, логично было предположить, что одновременно высокое содержание РНК-связывающих белков и белков внеклеточных экзосом взаимосвязаны и являются своеобразным маркером патогенеза ММ, однако это направление требует более детального изучения.
5. Стоит также отметить большое количество белков-участников процессов транскрипции и трансляции. Это может быть как характеристикой клеток линии Im9, так и особенностями выделения белковых фракций в методе pull-down.

Мы предположили, что определенный интерес может представлять не только сравнение общего белкового состава контрольной и экспериментальных групп (функциональные характеристики обнаруженных белков, биологические процессы, в которых они участвуют), но и анализ тех белков, которые по какой-то причине не связались с рекомбинантным белком (или изначально отсутствовали) в какой-либо из обработанных проб, хотя были идентифицированы в контрольной группе. Также мы обратили внимание на белки, появившиеся в экспериментальных группах, но отсутствовавшие в контрольной, так как их накопление могло быть непосредственным ответом на воздействие препаратов-ингибиторов.

1. Общий функциональный состав белков из интерактомов PSMA3 после сочетанных обработок отличается от контрольной группы незначительно, однако наблюдались изменения количества белков в пробах. Так, в группах CmB и RB после обработки пропадало более двух третей белкового состава контрольной группы. В группе FC отсутствовало чуть больше половины белков контрольной группы.
2. Большинство белков, перестающих связываться с рекомбинантными белками (то есть, с PSMA3) после обработки CmB, относятся к РНК-связывающим белкам. В основном, это белки – участники метаболизма, сплайсинга и процессинга РНК.

Белки этой группы можно подразделить на два кластера относительно биологических процессов, в которых они задействованы: ядерные РНК-связывающие белки (транскрипционные факторы, факторы сплайсинга) и цитоплазматические РНК-связывающие белки, участвующие в трансляции. Определенный интерес может представлять белок EIF4A3 (фактор инициации 4А-III), являющийся общим для обоих кластеров.

3. Сравнение белкового состава ядерного и цитоплазматического экстрактов группы CmB показало, что после обработки связывание ядерных белков с PSMA3 нарушено значительно (283 ядерных белка и 110 цитоплазматических белков контрольной группы не были обнаружены в соответствующих пробах после обработки).
4. Анализ белкового состава клеток в группе RB выявил заметное сходство с группой CmB, как по составу, так и по функциям, при этом белковый состав группы FC заметно отличается от двух предыдущих. Белки, отсутствовавшие в результате обработок CmB и RB в случае FC сохраняются в протеоме.

Можно предположить, что содержание большего количества белков в протеоме, полученном после обработки клеток MM сочетанием FC, связано с механизмом ингибирования протеолитической активности протеасомы препаратом *карфилзомиб*. Как уже упоминалось, это необратимый ингибитор химотрипсинподобной активности субъединицы $\beta 5$, тогда как использованный нами в двух других обработках (CmB, RB) *бортезомиб* – обратимый ингибитор активности той же субъединицы. Таким образом, возможно, что необратимое ингибирование протеолиза привело к большему накоплению короткоживущих регуляторных белков, в норме идущих на деградацию, тогда как обратимое ингибирование $\beta 5$ могло привести к дополнительному протеолизу части белков, накопленных в результате остановки протеолитической активности.

Так как в данной работе рассмотрен не весь протеасом-связанный протеом клетки, а его специфическая часть – интерактом субъединицы PSMA3 ($\alpha 7$), то есть белки, деградируемые путем убиквитин-независимого протеолиза, необходимо было дополнительно проверить, являются ли эти белки мишенями убиквитин-независимого протеолиза. На сегодняшний день одним из признаков убиквитин-независимой деградации белка является наличие неупорядоченного N-концевого участка определенной длины в составе его молекулы (Erales et al., 2014). С помощью платформы CSpritz все уникальные для каждого из типов обработок белки (не встречающиеся в контрольной группе, и появляющиеся только в определенном типе обработок) были проанализированы на наличие неупорядоченных N-концевых аминокислотных последовательностей длиной не менее 30 аминокислот.

Результаты этого анализа (для белков, выбранных нами как возможные мишени для терапии ММ) приведены в таблице 2.

Идентификация возможных белков-мишеней для терапии ММ.

В результате анализа состава протеасомо-ассоциированных протеомов после их сочетанной обработки тремя парами препаратов-ингибиторов, был определен ряд белков, функции и локализация которых могут представлять интерес в рамках изучения патогенеза ММ.

С помощью баз данных Uniprot, GO и STRING был проведен анализ каждого белка по отдельности. При этом учитывались как белки, которые ранее уже рассматривались в качестве терапевтических мишеней ММ (в таком случае полученные в этой работе результаты согласовывались с данными литературы), так и белки-потенциальные мишени для терапии – при этом особо учитывались биологические процессы, в которых задействован тот или иной белок интереса.

Таблица 2. Проверка наличия N-концевого неупорядоченного участка у белков интереса, уникальных для каждого из трех типов обработки.

Название белка	Общий % неупорядоченности	Кол-во неуп. участков > 30 а.о	Кол-во неуп. участков > 50 а.о	Распределение длин неуп. участков от N до С-конца
X-связанный 40S рибосомальный белок (40S ribosomal protein S4, X isoform)	9.5	0	0	10 15
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин U (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U, SAF-A)	58.78	2	2	285 7 8 8 12 165
Белок-регулятор клеточного цикла и апоптоза 2 (Cell cycle and apoptosis regulator protein 2)	47.34	4	3	34 11 25 70 15 7 1 2 60 3 132 10 18 2 3 26 18
Шаперон HSP90 (Heat shock protein HSP 90-beta)	23.89	2	1	21 4 14 3 56 5 21 10 2 37
Дисульфидизомераза A6 (Protein disulfide-isomerase A6)	18.11	1	0	26 4 1 2 4 13 5 37
АТФ/АДФ-транслоказа 3 (ADP/ATP translocase 3)	11.4	0	0	8 6 3 2 7 8
p72 (Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17)	41.28	2	2	125 1 175
Ретикулон (Reticulon-4)	67.03	4	4	187 28 17 9 22 12 53 7 6 28 2 8 14 11 2 13 2 2 3 11 8 25

				20 89 23 1 14 119 29 26 8
Рибосомальный белок S3 (40S ribosomal protein S3)	23.04	1	0	14 11 31
Рибосомальный белок S7 (40S ribosomal protein S7)	18.55	0	0	16 13 7
Рибосомальный белок S17 (40S ribosomal protein S17)	17.77	0	0	9 2 13
Фасцин (Fascin)	8.722	0	0	9 8 1 10 3 5 7
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин Q (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q)	56.17	2	2	87 1 26 19 1 10 10 2 194

Полученные данные могут свидетельствовать как о том, что такой подход недостаточен для подобного исследования, так и о том, что белки-мишени убиквитин-независимого протеолиза характеризуются более широким набором признаков, необязательно включающим в себя наличие в их молекуле N-концевого неупорядоченного участка. Кроме того, часть этих белков могут не быть мишенями убиквитин-независимого протеолиза, попав в данный протеом за счет взаимодействия с белками-мишенями. Таким образом, данный метод анализа можно использовать только вкупе с дополнительными типами проверки, а также необходим поиск дополнительных признаков принадлежности того или иного белка к пулу убиквитин-независимо деградируемых субстратов.

По данным литературы, все перечисленные белки так или иначе играют роль в канцерогенезе и рассматриваются авторами, как потенциальные мишени для терапии:

Белок-регулятор клеточного цикла и апоптоза 2 (DBC1)

На сегодняшний день известно, что необходимым элементом для осуществления альтернативного сплайсинга пре-мРНК является белковый комплекс DBIRD – связующее звено между транскрипцией с помощью РНК-полимеразы II и собственно альтернативным сплайсингом (Close et al., 2012). В коровую часть этого комплекса входит белок-регулятор клеточного цикла и апоптоза 2 (DBC1; deleted in breast cancer 1). Его особенность заключается в том, что при канцерогенезе он зачастую выполняет роль как онкосупрессора, как и активатора канцерогенеза. Так, в комплексе с белком SIRT1 (гистоновая деацетилаза, участвующая в подавлении апоптоза путем деактивации p53) DBC1 регулирует запуск программируемой клеточной смерти в зависимости от специфического окружения (Kim et al., 2009). Неоднозначная роль DBC1 в канцерогенезе делает его многообещающей мишенью для терапии.

Рибосомальные белки

В настоящее время роль рибосомального аппарата клетки уже не ограничена только биосинтезом белка: множество экспериментальных данных доказывают участие рибосомальных белков в реакциях иммунного ответа, клеточного метаболизма, регуляции клеточного цикла и апоптоза (Zhou et al., 2015). Особенное внимание уделяется такому процессу как «рибосомальный стресс», или аномальное накопление свободных рибосомальных белков (RPs) в нуклеоплазме, что приводит к остановке клеточного цикла, синтеза рибосом, а также к активации ряда онкосупрессоров, в первую очередь, белка p53. Механизм активации заключается в присоединении некоторых рибосомальных белков к комплексу Mdm2-p53 – при этом подавляется Mdm2-опосредованная деградация p53, осуществляемая в норме за счет убиквитин-лигазной активности Mdm2 (de Las Heras-Rubio et al., 2014). К настоящему моменту идентифицировано множество RPs, задействованных в этом механизме, что позволяет рассматривать их, как потенциальные маркеры канцерогенеза.

В анализируемых в настоящей работе протеомах было найдено множество рибосомальных белков, что само по себе может служить маркером малигнизации клеток, однако подробно будут рассмотрены функции рибосомальных белков S7, S3 и S4X (входящих в состав малой субъединицы рибосомы) так как, по данным проведенного масс-спектрометрического анализа, они встречались наиболее часто.

Так, рибосомальный белок S7 (RPS7) впервые охарактеризован, как агент, непосредственно связывающийся с Mdm2 с формированием тройного комплекса Mdm2-p53-S7, что приводит к активации транскрипционной активности p53 и, в некоторых случаях, к запуску апоптоза (Chen et al., 2007). Показано, что RPS7 – важный участник клеточного ответа на стрессовые факторы, а его взаимодействие с механизмом онкосупрессии позволяет рассматривать его, как онкомаркер для широкого ряда онкологических заболеваний.

Не менее важным участником реакции клетки на стресс является рибосомальный белок S3 (RPS3). Кроме образования комплекса с Mdm2-p53, аналогичного тому, что образует S7 (Yadavilli et al., 2009), белок S3 принимает непосредственное участие в процессе эксцизионной репарации ДНК – BER (base excision repair) (Graifer et al., 2014), а также в инициации апоптоза (Jang et al., 2004). Экспериментально доказан повышенный уровень экспрессии S3 при онкологических заболеваниях разных типов (Kim et al., 2013), в частности, в клетках проэритролейкемии человека K562 сверхэкспрессия S3 приводила к

развитию клеточной резистентности к препаратам химиотерапии (Zhu et al., 2003). В целом, данные литературы характеризуют RPS3, как потенциальный маркер множества онкологических заболеваний и возможную мишень для терапии.

В работах последних лет в качестве онкомаркера для значительного числа опухолей фигурирует и X-связанный 40S рибосомальный белок (Just et al., 1992; Tsofack et al., 2013; Raquet et al., 2015). В норме RPS4X участвует в регуляции клеточной пролиферации, трансляции, а также участвует в процессинге рРНК. Вероятно, более детальное изучение RPS4X на других клеточных моделях, в том числе в клетках множественной миеломы человека, обнаружит его функциональную значимость при патогенезе этих заболеваний.

Фасцин

Белки семейства фасцинов играют важную роль в организации цитоскелета, связывая фибриллы актина с образованием филоподий, например, при клеточной миграции (Hashimoto et al., 2011). Учитывая функции фасцинов в работе клетки, логично предположить, что они играют важную роль в процессе метастазирования опухолей различных типов. Так, фасцин-1 является типичным биомаркером практически для всех видов карцином (Hashimoto et al., 2007), кроме того, сверхэкспрессия фасцина-1 показана для клеток лимфомы Ходжкина, и многих других онкологических заболеваний, причем повышенная экспрессия фасцина-1 обычно выявляется в случаях наиболее активного метастазирования. При этом, роль фасцина-1 в патогенезе иммунопролиферативных заболеваний костного мозга изучена слабо.

Гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины (hnRNPs)

Регуляторный аппарат экспрессии генов во многом зависит от работы РНК-связывающих белков, среди которых особое место занимают белки группы гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов, не только играющие ключевую роль в созревании и процессинге пре-мРНК, но и контролирующее подавляющее число пост-транскрипционных событий в ядре (Jean-Philippe et al., 2013). Можно предположить, что нарушения в подобном многофункциональном аппарате приводят и ко множеству клеточных патологий – и работы последних лет подтверждают связь hnRNPs с канцерогенезом (Han et al., 2013). Гетерогенные ядерные нуклеопротеины задействованы в таких ключевых элементах канцерогенеза, как апоптоз – при этом в большинстве случаев происходит ингибирование про-апоптотических факторов (Chen et al., 2011), в том числе и белка p53 (Zhou et al., 2010)

– а также в регуляции эпителиально-мезенхимного перехода. В частности, обнаруженный нами гетерогенный рибонуклеопротеин Q (hnRNP Q) способен модулировать систему p53-опосредованного апоптоза, в зависимости от физиологического состояния клетки, путем регуляции трансляции самого p53 (Kim et al., 2012). Другой же обнаруженный нами белок – hnRNP U участвует в активации эпителиально-мезенхимного перехода, образуя комплекс с актином, который, в свою очередь, индуцирует транскрипцию, осуществляемую РНК-полимеразой II (Vi et al., 2013). Таким образом, hnRNP U повышает уровень метастазирования клеток.

Белки-регуляторы фолдинга

Механизмы клеточной малигнизации во многом зависят от нарушений в системе сворачивания белков, и к настоящему моменту уже обнаружена связь между активностью шаперонов и канцерогенезом (Van Drie, 2011). Так шаперон HSP90 может выступать в качестве ингибитора апоптоза, и с недавнего времени активно изучается в качестве онкомаркера (Barrott et al., 2013). Более того, несмотря на высокую встречаемость HSP90 практически во всех клетках организма и наличие интерактома из нескольких сотен белков, уже разработан направленный терапевтический ингибитор для этой молекулы – *гельданамицин*, 1,4-бензохинон бактериальной природы, обладающий антибактериальным эффектом (García-Carbonero et al., 2013). Кроме непосредственно шаперонов в белковом фолдинге участвуют представители семейства дисульфидизомераз, например, их наиболее изученный представитель дисульфидизомеразы А6 (PDIA6), также являющаяся доказанным онкомаркером (Gao et al., 2016).

Ретикулон

Этот белок относится к высококонсервативному семейству белков эндоплазматического ретикула, участвующих в формировании его мембран, а также в регуляции везикулярного транспорта. Наряду с представителями семейства дисульфидизомераз белки этого семейства участвуют в индукции стресса в ответ на накопление неупорядоченных белков. Показано, что ретикулоны и дисульфидизомеразы не только участвуют в одном клеточном процессе, но и специфически регулируют работу друг друга (Bernardoni et al., 2013). Интересно заметить, что и в данной работе они были идентифицированы в одном протеоме (FC). Кроме этого, было обнаружено, что ретикулон-4 ингибирует антиапоптотическую активность таких белков как Bcl-xL и Bcl-2 (Tagami et al., 2000).

P72

Этот белок относится к обширной группе РНК-геликаз (DEAD-box RNA helicases), которые участвуют в сплайсинге и процессинге пре-мРНК (обычно в составе сплайсосомы) и реаранжировке рибонуклеопротеиновых комплексов (Staley et al., 1998). Роль DDX17 в регуляции транскрипции и сплайсинга, а также его интерактом (вышеописанные hnRNPs) позволяют рассматривать этот белок, как возможную мишень для терапии онкологических заболеваний, однако эта область пока слабо изучена и требует дальнейших исследований.

Интересно отметить, что функциональное распределение вышеописанных потенциальных онкомаркеров ММ во многом соответствует биологическим процессам, на которые воздействуют используемые нами цитотоксические агенты. Так, участники клеточного ответа на повреждения ДНК, регуляции клеточной пролиферации и клеточного цикла обнаруживались в пробе, обработанной камптотецином – ингибитором топоизомеразы I, приводящим к деградации ДНК в ядре. Ингибиторы апоптоза выявлены в пробах, обработанных препаратами-активаторами апоптоза клетки. Например, после обработки клеток флавопиридолом произошло значительное накопление белков-участников апоптотического ответа, однако некоторые из них действуют, как антагонисты. Это наблюдение несомненно требует более детального анализа.

В результате проведенного анализа протеасомо-связанных протеомов клеток ММ человека было обнаружено накопление определенных регуляторных белков-участников ключевых клеточных процессов – транскрипции, метаболизма РНК, трансляции, клеточной дифференцировки. Состав исследуемых интерактомоов мог варьировать в зависимости от типа обработки. Суммируя полученные результаты, можно также сказать, что обнаруженный набор белков может стать многообещающим источником новых мишеней для терапии ММ, несмотря на то, что для большинства субстратов еще не разработано соответствующих терапевтических препаратов-ингибиторов. Учитывая особенности функций найденных нами белков, уместным видится применение препаратов, тем или иным образом регулирующих вышеописанные процессы.

Так, перспективным направлением мог бы стать поиск модуляторов активности гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов, как неотъемлемых и многозадачных участников процессинга мРНК. Тот же вывод можно сделать и в отношении возможных поисков препаратов-модуляторов работы рибосомальных белков. Таким образом,

дальнейшие исследования в этом направлении могут стать началом нового этапа в терапии не только множественной миеломы человека, но других онкологических заболеваний.

Выводы

1. После обработки клеток ММ тремя сочетаниями препаратов-ингибиторов (ресвератрол/бортезомиб, флавопиридол/карфилзомиб, камптотецин/бортезомиб) обнаружено накопление определенных белков–интерактантов субъединицы PSMA3 в ядре и цитоплазме клеток Im9. Часть этих белков уникальна для каждого из типов обработок. Большая часть этих белков содержит неупорядоченные участки, поэтому может быть отнесена к мишеням убиквитин-независимого протеолиза.
2. Интерактомы PSMA3, полученные после обработки сочетанием, содержащим карфилзомиб, значительно отличались от таковых после сочетанной обработки с использованием бортезомиба.
3. Во всех пробах присутствует большое количество цитоскелетных белков и компонентов экзосом, причем их распределение не зависит от клеточного компартмента или типа обработки клеток. Кроме того, значительная часть интерактантов PSMA3 задействована в различных этапах регуляции экспрессии генов (участвуют в регуляции транскрипции, процессинге, сплайсинге, транспорте мРНК, трансляции).

Список сокращений

Bcl-2 – B-cell lymphoma 2, белок В-клеточной лимфомы 2;

Bcl-xL – B-cell lymphoma-extra large, крупный белок В-клеточной лимфомы;

BER – base excision repair, репарация с выщеплением нуклеотидных оснований;

CD8 – корцепторы цитотоксических Т-лимфоцитов;

ClpQ/HslV – протеазы из группы АТФ-зависимых протеаз, характерная для клеток бактерий и некоторых архей;

DACIs – histone deacetylase inhibitors, ингибиторы гистоновых деацетилаз;

DBIRD – DBC1/ ZIRD complex, белковый комплекс, регулирующий процесс альтернативного сплайсинга пре-мРНК;

DTT – dithiotreitol, дитиотрейтол;

DUB – deubiquitinating enzymes, деубиквитирующие ферменты;

Egr-1 – early growth response protein 1, ростовой транскрипционный фактор 1;

EIF4A3 – Eukaryotic initiation factor 4A-III, фактор инициации трансляции 4A-III;

ESCRT – endosomal sorting complexes required for transport, комплексы эндосомальной сортировки для дальнейшего транспорта мембранных белков;

FDA – Food and Drug Administration, американское управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов;

GO – Gene Ontology, биоинформатический проект, посвященный созданию унифицированной терминологии для аннотации генов и генных продуктов всех биологических видов;

GS – Glutathione-Sepharose, глутатион-сефароза;

GSK – glycogen synthase kinase, киназа гликогенсинтазы;

GST – glutathione S-transferase, глутатион-S-трансфераза;

GST-PSMA3 – белок слияния глутатион-S-трансферазы с белком PSMA3 ($\alpha 7$);

IDP – intrinsically disordered proteins, белки, содержащие внутренние неупорядоченные участки

IFN- γ – интерферон-гамма;

IgA – Immunoglobulin A, иммуноглобулин A;

IGF-1 – insulin-like growth factor 1, инсулиноподобный фактор роста 1;

IgG – Immunoglobulin G, иммуноглобулин G;

IL-6 – interleukin-6, интерлейкин 6;

IMiDs – immunomodulatory drugs, препараты-иммуномодуляторы;

IPTG – isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, изопропил-бета-D-тиогаляктопиранозид;

IкВ α – NF-каппа-B inhibitor alpha, ингибитор транскрипционного фактора NF-кВ;

LB - Luria-Bertani medium, среда Лурия-Бертани;

LC-MALDI TOF/TOF – liquid chromatography - matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry tandem mass spectrometry, жидкостная хроматография, совмещенная с тандемной масс-спектрометрией с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией;

LECA – Last Eukaryotic Common Ancestor, последний общий предок эукариот;

LMP2 – гомолог субъединицы $\beta 1i$ в клетках мышей;

LMP7 – гомолог субъединицы $\beta 5i$ в клетках мышей;

mAbs – monoclonal antibodies, моноклональные антитела;

Mdm2 – Mouse double minute 2/ E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2, убиквитинлигаза;

MECL-1 – гомолог субъединицы $\beta 2i$ в клетках мышей;

MHC I – major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости I;

NF-кВ – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерный фактор «каппа-би»;

NOD-факторы – сигнальные молекулы, выделяемые ризобактериями при инициации роста клубеньков у растений сем. Бобовых;

NP-40 – nonidet P-40 детергент;

ODC – ornithine decarboxylase, орнитин-декарбоксилаза;

PAC1-PAC2 – proteasome assembling chaperone-1/2, комплексы шаперонов, участвующих в сборке протеасомы;

PAC3-PAC4 – proteasome assembling chaperone-3/4;

PBS – phosphate buffered saline, фосфатно-солевой буфер;

PBST – Phosphate buffered saline with Tween, фосфатно-солевой буфер с добавлением детергента Tween;

PCNA – proliferating cell nuclear antigen, белок скользящего зажима, активатор репликации и пролиферации;

PIs – proteasome inhibitors, ингибиторы протеасом;

PMSF – phenylmethylsulphonylfluoride, фенилметилсульфонилфторид;

pRb – retinoblastoma-associated protein, ретинобластомо-ассоциированный белок;

PSA – персульфат аммония;

REG – proteasome activator complex, частица-активатор протеасомы;

Rpn – и Regulatory particle non-ATPases, регуляторные не-АТФазные частицы;

RPs – ribosome proteins, рибосомальные белки;

Rpt – Regulatory particle triple-A type I proteins, регуляторные AAA-АТФазы I типа;

SAR – супергруппа эукариот, включающая в себя страменопил, альвеолят и ризарий;

SDS – sodium dodecyl sulphate, додецилсульфат натрия;

SIRT1 – Silent Information Regulator 1, НАД-зависимая гистоновая деацетилаза;

STRING – Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, база данных для поиска информации об известных и предсказанных белок-белковых взаимодействиях;

SUMO-1 – small ubiquitin-related modifier 1, малый убиквитин-зависимый модификатор;

TEMED – tetramethylethylenediamine, тетраметилэтилендиамин;

TNF α – tumor necrosis factor alpha, фактор некроза опухоли альфа;

UBA – Ubiquitin-associated domain, домен, ассоциированный с убиквитином;

UbL – Ubiquitin-like domain, убиквитин-подобный белковый домен;

UPS – Ubiquitin-Proteasome System, убиквитин-зависимая система протеасомного протеолиза;

AA – акриламид;

АТФ – аденозинтрифосфат;

АХ – аффинная хроматография;

БДС – буфер для связывания;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ММ – множественная миелома человека;

ПААГ – полиакриламидный гель;

ТФУ – трифторуксусная кислота;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

Список литературы:

1. Adams, J., Kauffman, M. (2004). Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Investigation*, 22(2), 304–311.
2. Akinwumi, B. C., Bordun, K.-A. M., Anderson, H. D. (2018). Biological Activities of Stilbenoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3).
<https://doi.org/10.3390/ijms19030792>
3. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology*, 10(5), 619–624. <https://doi.org/10.1038/ncb1725>
4. Attal, M., Lauwers-Cances, V., Hulin, C., Leleu, X., Caillot, D., Escoffre, M., Moreau, P. (2017). Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 376(14), 1311–1320.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611750>
5. Babu, M. M., Lee, R. Van Der, Groot, N. S. De. (2011). Intrinsically disordered proteins : regulation and disease, 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.03.011>
6. Barrott, J. J., Haystead, T. A. J. (2013). Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer. *The FEBS Journal*, 280(6), 1381–1396. <https://doi.org/10.1111/febs.12147>
7. Ben-Saadon, R., Fajerman, I., Ziv, T., Hellman, U., Schwartz, A. L., Ciechanover, A. (2004). The tumor suppressor protein p16(INK4a) and the human papillomavirus oncoprotein-58 E7 are naturally occurring lysine-less proteins that are degraded by the ubiquitin system. Direct evidence for ubiquitination at the N-terminal residue. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41414–41421. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407201200>
8. Bernardoni, P., Fazi, B., Costanzi, A., Nardacci, R., Montagna, C., Filomeni, G., Di Sano, F. (2013). Reticulon1-C modulates protein disulphide isomerase function. *Cell Death & Disease*, 4, e581. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.113>

9. Bi, H., Yang, X., Yuan, J., Yang, F., Xu, D., Guo, Y., Sun, S. (2013). H19 inhibits RNA polymerase II-mediated transcription by disrupting the hnRNP U-actin complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(10), 4899–4906. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.026>
10. Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C., Huber, R. (1999). The proteasome. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28, 295–317. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.28.1.295>
11. Brymora, A., Valova, V. A., Robinson, P. J. (2004). Protein-protein interactions identified by pull-down experiments and mass spectrometry. *Current Protocols in Cell Biology*, Chapter 17, Unit 17.5. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1705s22>
12. Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y., Hochstrasser, M. (2017). Proteasome Structure and Assembly. *Journal of Molecular Biology*, 429(22), 3500–3524. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.027>
13. Chen, D., Zhang, Z., Li, M., Wang, W., Li, Y., Rayburn, E. R., Zhang, R. (2007). Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene*, 26(35), 5029–5037. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210327>
14. Chen, X., Barton, L. F., Chi, Y., Clurman, B. E., Roberts, J. M. (2007). Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome. *Molecular Cell*, 26(6), 843–852. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.022>
15. Chen, Z.-Y., Cai, L., Zhu, J., Chen, M., Chen, J., Li, Z.-H., Li, X.-W. (2011). Fyn requires HnRNPA2B1 and Sam68 to synergistically regulate apoptosis in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, 32(10), 1419–1426. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr088>
16. Close, P., East, P., Dirac-Svejstrup, A. B., Hartmann, H., Heron, M., Maslen, S., Svejstrup, J. Q. (2012). DBIRD complex integrates alternative mRNA splicing with RNA polymerase II transcript elongation. *Nature*, 484(7394), 386–389. <https://doi.org/10.1038/nature10925>
17. Collins, G. A., Goldberg, A. L. (2017). The Logic of the 26S Proteasome. *Cell*, 169(5), 792–806. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.023>
18. Cosemans, C., Oben, B., Arijs, I., Daniels, A., Declercq, J., Vanhees, K., Rummens, J.-L. (2018). Prognostic Biomarkers in the Progression From MGUS to Multiple Myeloma: A Systematic Review. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 18(4), 235–248. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.02.011>
19. Dahlmann, B. (2016). Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 591, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.12.012>
20. Dardenne, E., Polay Espinoza, M., Fattet, L., Germann, S., Lambert, M.-P., Neil, H.,

- Auboeuf, D. (2014). RNA helicases DDX5 and DDX17 dynamically orchestrate transcription, miRNA, and splicing programs in cell differentiation. *Cell Reports*, 7(6), 1900–1913. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.010>
21. de Las Heras-Rubio, A., Perucho, L., Paciucci, R., Vilardell, J., LLeonart, M. E. (2014). Ribosomal proteins as novel players in tumorigenesis. *Cancer Metastasis Reviews*, 33(1), 115–141. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9460-6>
 22. Deshaies, R. J., Joazeiro, C. A. P. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 399–434. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809>
 23. Dimopoulos, M. A., Goldschmidt, H., Niesvizky, R., Joshua, D., Chng, W.-J., Oriol, A., Moreau, P. (2017). Carfilzomib or bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): an interim overall survival analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 18(10), 1327–1337. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30578-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30578-8)
 24. Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., Hrabeta, J. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1414. <https://doi.org/10.3390/ijms18071414>
 25. Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Muller, B., Hanna, J., Finley, D. (2004). Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 26817–26822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404020200>
 26. Elsasser, S., Finley, D. (2005). Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nature Cell Biology*, 7(8), 742–749. <https://doi.org/10.1038/ncb0805-742>
 27. Enekel, C., Lehmann, A., Kloetzel, P. M. (1998). Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *The EMBO Journal*, 17(21), 6144–6154. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6144>
 28. Eralles, J., Coffino, P. (2014). Ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(1), 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.008>
 29. Etlinger, J. D., Goldberg, A. L. (1977). A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(1), 54–58.
 30. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4926), 64–71.
 31. Fort, P., Kajava, A. V, Delsuc, F., Coux, O. (2015). Evolution of proteasome regulators in eukaryotes. *Genome Biology and Evolution*, 7(5), 1363–1379. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv068>

32. Gao, H., Sun, B., Fu, H., Chi, X., Wang, F., Qi, X., Shao, S. (2016). PDIA6 promotes the proliferation of HeLa cells through activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncotarget*, 7(33), 53289–53298. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10795>
33. Garcia-Carbonero, R., Carnero, A., Paz-Ares, L. (2013). Inhibition of HSP90 molecular chaperones: Moving into the clinic. *The Lancet Oncology*, 14(9), e358–e369. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70169-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70169-4)
34. Geng, F., Wenzel, S., Tansey, W. P. (2012). Ubiquitin and Proteasomes in Transcription, 177–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052110-120012>
35. Giguere, S. S. B., Guise, A. J., Jean Beltran, P. M., Joshi, P. M., Greco, T. M., Quach, O. L., Cristea, I. M. (2016). The Proteomic Profile of Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1) Interactions Points to a Multifaceted Regulation of Gene Expression. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 15(3), 791–809. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.054619>
36. Gokduman, K. (2016). Strategies Targeting DNA Topoisomerase I in Cancer Chemotherapy: Camptothecins, Nanocarriers for Camptothecins, Organic Non-Camptothecin Compounds and Metal Complexes. *Current Drug Targets*, 17(16), 1928–1939.
37. Graifer, D., Malygin, A., Zharkov, D. O., Karpova, G. (2014). Biochimie Eukaryotic ribosomal protein S3 : A constituent of translational machinery and an extraribosomal player in various cellular processes. *Biochimie*, 99, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.11.001>
38. Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nature Structural Biology*, 7(11), 1062–1067. <https://doi.org/10.1038/80992>
39. Groll, M., Huber, R. (2003). Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle, 35, 606–616. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00390-4](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00390-4)
40. Gu, Z. C., Enenkel, C. (2014). Proteasome assembly. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(24), 4729–4745. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1699-8>
41. Guthrie, A. R., Chow, H.-H. S., Martinez, J. A. (2017). Effects of resveratrol on drug- and carcinogen-metabolizing enzymes, implications for cancer prevention. *Pharmacology Research & Perspectives*, 5(1), e00294. <https://doi.org/10.1002/prp2.294>
42. Han, N., Li, W., Zhang, M. (2013). The function of the RNA-binding protein hnRNP in cancer metastasis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 9 Suppl, S129-34. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.122506>
43. Hanash, S. M., Pitteri, S. J., Faca, V. M. (2008). Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature*, 452(7187), 571–579. <https://doi.org/10.1038/nature06916>
44. Hashimoto, Y., Kim, D. J., Adams, J. C. (2011). The roles of fascin in health and disease.

- The Journal of Pathology*, 224(3), 289–300. <https://doi.org/10.1002/path.2894>
45. Hashimoto, Y., Parsons, M., Adams, J. C. (2007). Dual actin-bundling and protein kinase C-binding activities of fascin regulate carcinoma cell migration downstream of Rac and contribute to metastasis. *Molecular Biology of the Cell*, 18(11), 4591–4602. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-02-0157>
 46. Heinemeyer, W., Ramos, P. C., Dohmen, R. J. (2004). The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 61(13), 1562–1578. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4130-z>
 47. Hirano, H., Kimura, Y., Kimura, A. (2016). Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. *Journal of Proteomics*, 134, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.016>
 48. Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S.-I., Hendil, K. B., Niwa, S.-I., Kishimoto, T., Murata, S. (2006). Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Molecular Cell*, 24(6), 977–984. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.015>
 49. Hirano, Y., Hendil, K. B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Murata, S. (2005). A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature*, 437(7063), 1381–1385. <https://doi.org/10.1038/nature04106>
 50. Hofmeister, C. C., Poi, M., Bowers, M. A., Zhao, W., Phelps, M. A., Benson, D. M., Byrd, J. C. (2014). A phase I trial of flavopiridol in relapsed multiple myeloma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 73(2), 249–257. <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2347-y>
 51. Hsieh, F. Y., Tengstrand, E., Pekol, T. M., Guerciolini, R., Miwa, G. (2009). Elucidation of potential bortezomib response markers in multiple myeloma patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(1), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.053>
 52. Hwang, G.-W. (2007). Ubiquitin-proteasome system as a factor that determine the sensitivity to methylmercury. *Yakugaku Zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 127(3), 463–468.
 53. Inobe, T., Matouschek, A. (2014). ScienceDirect Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Current Opinion in Structural Biology*, 24, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.02.002>
 54. Jagannath, S., Barlogie, B., Berenson, J., Siegel, D., Irwin, D., Richardson, P. G., Anderson, K. C. (2004). A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *British Journal of Haematology*, 127(2), 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05188.x>

55. Jang, C.-Y., Lee, J. Y., Kim, J. (2004). Rps3, a DNA repair endonuclease and ribosomal protein, is involved in apoptosis. *FEBS Letters*, 560(1–3), 81–85.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00074-2)
56. Jean-Philippe, J., Paz, S., Caputi, M. (2013). hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18999–19024.
<https://doi.org/10.3390/ijms140918999>
57. Jung, T., Catalgol, B., Grune, T. (2009). The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(4), 191–296. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.04.001>
58. Just, W., Geerkens, C., Held, K. R., Vogel, W. (1992). Expression of RPS4X in fibroblasts from patients with structural aberrations of the X chromosome. *Human Genetics*, 89(2), 240–242.
59. Kenney, S. P., Meng, X.-J. (2015). Identification and fine mapping of nuclear and nucleolar localization signals within the human ribosomal protein S17. *PloS One*, 10(4), e0124396.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124396>
60. Kim, D., Kim, W., Lee, K., Kim, S., Lee, H., Kim, H., Kim, K. (2012). hnRNP Q regulates translation of p53 in normal and stress conditions, 20(2), 226–234.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2012.109>
61. Kim, J.-E., Chen, J., Lou, Z. (2009). p30 DBC is a potential regulator of tumorigenesis. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(18), 2932–2935.
62. Kim, Y., Kim, H. D., Youn, B., Park, Y. G., Kim, J. (2013). Ribosomal protein S3 is secreted as a homodimer in cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(4), 805–808. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.132>
63. Kim, Y., Lee, M. S., Kim, H. D., Kim, J. (2016). Ribosomal protein S3 (rpS3) secreted from various cancer cells is N-linked glycosylated. *Oncotarget*, 7(49), 80350–80362.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10180>
64. Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Castillo, V., & Goldberg, A. L. (1999). Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Molecular Cell*, 4(3), 395–402.
65. Kisselev, A. F., van der Linden, W. A., & Overkleeft, H. S. (2012). Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chemistry & Biology*, 19(1), 99–115.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.01.003>
66. Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., & Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 96(5), 635–644.
67. Koomen, J. M., Haura, E. B., Bepler, G., Sutphen, R., Remily-Wood, E. R., Benson, K., ...

- Dalton, W. S. (2008). Proteomic Contributions to Personalized Cancer Care. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(10), 1780–1794. <https://doi.org/10.1074/mcp.R800002-MCP200>
68. Kumar, S. K., & Rajkumar, S. V. (2018). The multiple myelomas — current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 1. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0018-y>
69. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
70. Lee, B.-H., Lee, M. J., Park, S., Oh, D.-C., Elsasser, S., Chen, P.-C., ... Finley, D. (2010). Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*, 467(7312), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature09299>
71. Livneh, I., Cohen-Kaplan, V., Cohen-Rosenzweig, C., Avni, N., & Ciechanover, A. (2016). The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Research*, 26(8), 869–885. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.86>
72. Luria, S. E., Adams, J. N., & Ting, R. C. (1960). Transduction of lactose-utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology*, 12, 348–390.
73. Mccann, T. S., & Tansey, W. P. (2014). Functions of the Proteasome on Chromatin, 1026–1044. <https://doi.org/10.3390/biom4041026>
74. Micallef, J., Dharsee, M., Chen, J., Ackloo, S., Evans, K., Qiu, L., & Chang, H. (2010). Applying mass spectrometry based proteomic technology to advance the understanding of multiple myeloma. *Journal of Hematology & Oncology*, 3, 13. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-13>
75. Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Richardson, P. G., Poulaki, V., Tai, Y.-T., Chauhan, D., ... Anderson, K. C. (2003). The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood*, 101(6), 2377–2380. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1768>
76. Moreau, P. (2017). How I treat myeloma with new agents. *Blood*, 130(13), 1507–1513. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-743203>
77. Moreau, P., & de Wit, E. (2017). Recent progress in relapsed multiple myeloma therapy: implications for treatment decisions. *British Journal of Haematology*, 179(2), 198–218. <https://doi.org/10.1111/bjh.14780>
78. Muguruma, Y., Yahata, T., Warita, T., Hozumi, K., Nakamura, Y., Suzuki, R., ... Ando, K. (2017, December). Jagged1-induced Notch activation contributes to the acquisition of bortezomib resistance in myeloma cells. *Blood Cancer Journal*. United States. <https://doi.org/10.1038/s41408-017-0001-3>

79. Nathan, J. A., Kim, H. T., Ting, L., Gygi, S. P., & Goldberg, A. L. (2013). Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes? *The EMBO Journal*, 32(4), 552–565. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.354>
80. Ogiso, Y., Tomida, A., & Tsuruo, T. (2002). Nuclear localization of proteasomes participates in stress-inducible resistance of solid tumor cells to topoisomerase II-directed drugs. *Cancer Research*, 62(17), 5008–5012.
81. Orłowski, R. Z. (2004). Bortezomib in combination with other therapies for the treatment of multiple myeloma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 2 Suppl 4, S16-20.
82. Otero, M. G., Cromberg, L. E., Almenar-queralt, A., Encalada, S. E., Devoto, V. M. P., Bruno, L., & Goldstein, L. S. B. (2014). Fast axonal transport of the proteasome complex depends on membrane interaction and molecular motor function, 1537–1549. <https://doi.org/10.1242/jcs.140780>
83. Pao, K.-C., Wood, N. T., Knebel, A., Rafie, K., Stanley, M., Mabbitt, P. D., ... Virdee, S. (2018). Activity-based E3 ligase profiling uncovers an E3 ligase with esterification activity. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0026-1>
84. Paquet, E. R., Hovington, H., Brisson, H., Lacombe, C., Larue, H., Tetu, B., ... Lebel, M. (2015). Low level of the X-linked ribosomal protein S4 in human urothelial carcinomas is associated with a poor prognosis. *Biomarkers in Medicine*, 9(3), 187–197. <https://doi.org/10.2217/bmm.14.115>
85. Parker, C. E., Pearson, T. W., Anderson, N. L., & Borchers, C. H. (2010). Mass-spectrometry-based clinical proteomics--a review and prospective. *The Analyst*, 135(8), 1830–1838. <https://doi.org/10.1039/c0an00105h>
86. Plowman, J. E. (2007). The proteomics of keratin proteins. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 849(1–2), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.055>
87. Popat, R., Plesner, T., Davies, F., Cook, G., Cook, M., Elliott, P., ... Cavenagh, J. (2013, March). A phase 2 study of SRT501 (resveratrol) with bortezomib for patients with relapsed and or refractory multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. England. <https://doi.org/10.1111/bjh.12154>
88. Rees-Unwin, K. S., Craven, R. A., Davenport, E., Hanrahan, S., Totty, N. F., Dring, A. M., ... Davies, F. E. (2007). Proteomic evaluation of pathways associated with dexamethasone-mediated apoptosis and resistance in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 139(4), 559–567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06837.x>
89. Ross, J. A., Robles-Escajeda, E., Oaxaca, D. M., Padilla, D. L., & Kirken, R. A. (2017). The

- prohibitin protein complex promotes mitochondrial stabilization and cell survival in hematologic malignancies. *Oncotarget*, 8(39), 65445–65456.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.18920>
90. Russell, S. J., Reed, S. H., Huang, W., Friedberg, E. C., & Johnston, S. A. (1999). The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Molecular Cell*, 3(6), 687–695.
91. Sauer, R. T., & Baker, T. A. (2011). AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 587–612. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060408-172623>
92. Sha, Z., & Goldberg, A. L. (2014). Proteasome-mediated processing of Nrf1 is essential for coordinate induction of all proteasome subunits and p97. *Current Biology : CB*, 24(14), 1573–1583. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.004>
93. Smith, D. B., & Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67(1), 31–40.
94. Stadtmueller, B. M., Kish-Trier, E., Ferrell, K., Petersen, C. N., Robinson, H., Myszka, D. G., ... Hill, C. P. (2012). Structure of a proteasome Pba1-Pba2 complex: implications for proteasome assembly, activation, and biological function. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(44), 37371–37382. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.367003>
95. Staley, J. P., Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell*, 92(3), 315–326.
96. Su, V., Lau, A. F. (2009). Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: significance in proteasomal degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(17), 2819–2833. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0048-9>
97. Tagami, S., Eguchi, Y., Kinoshita, M., Takeda, M., & Tsujimoto, Y. (2000). A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene*, 19(50), 5736–5746. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203948>
98. Teicher, B. A., & Tomaszewski, J. E. (2015). Proteasome inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 96(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.04.008>
99. Thrower, J. S. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal*, 19(1), 94–102. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.94>
100. Tomko, R. J. J., Hochstrasser, M. (2013). Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 415–445.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060410-150257>
101. Tsofack, S. P., Meunier, L., Sanchez, L., Madore, J., Provencher, D., Mes-Masson, A.-M., Lebel, M. (2013). Low expression of the X-linked ribosomal protein S4 in human serous

- epithelial ovarian cancer is associated with a poor prognosis. *BMC Cancer*, *13*, 303.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-303>
102. Tsvetkov, P., Reuven, N., Shaul, Y. (2010). Ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation. *Cell Death and Differentiation*, *17*(1), 103–108.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2009.67>
103. Unverdorben, P., Beck, F., Sledz, P., Schweitzer, A., Pfeifer, G., Plitzko, J. M., Forster, F. (2014). Deep classification of a large cryo-EM dataset defines the conformational landscape of the 26S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(15), 5544–5549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403409111>
104. Van Drie, J. H. (2011). Protein folding, protein homeostasis, and cancer. *Chinese Journal of Cancer*, *30*(2), 124–137.
105. Verma, R., McDonald, H., Yates, J. R. 3rd, Deshaies, R. J. (2001). Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk. *Molecular Cell*, *8*(2), 439–448.
106. Verrier, F., Mignotte, B., Jan, G., Brenner, C. (2003). Study of PTPC composition during apoptosis for identification of viral protein target. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1010*, 126–142.
107. Vizlin-Hodzic, D., Johansson, H., Ryme, J., Simonsson, T., Simonsson, S. (2011). SAF-A has a role in transcriptional regulation of Oct4 in ES cells through promoter binding. *Cellular Reprogramming*, *13*(1), 13–27. <https://doi.org/10.1089/cell.2010.0075>
108. Wang, H., Ding, N., Guo, J., Xia, J., Ruan, Y. (2016). Dysregulation of TTP and HuR plays an important role in cancers. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *37*(11), 14451–14461.
<https://doi.org/10.1007/s13277-016-5397-z>
109. Watanabe, M., Furuno, N., Goebel, M., Go, M., Miyauchi, K., Sekiguchi, T., Nishimoto, T. (1991). Molecular cloning of the human gene, CCG2, that complements the BHK-derived temperature-sensitive cell cycle mutant tsBN63: identity of CCG2 with the human X chromosomal SCAR/RPS4X gene. *Journal of Cell Science*, *100* (Pt 1), 35–43.
110. Willenbacher, E., Balog, A., Willenbacher, W. (2018). Short overview on the current standard of treatment in newly diagnosed multiple myeloma. *Memo*, *11*(1), 59–64.
<https://doi.org/10.1007/s12254-018-0383-3>
111. Yadavilli, S., Mayo, L. D., Higgins, M., Lain, S., Hegde, V., Deutsch, W. A. (2009). Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain. *DNA Repair*, *8*(10), 1215–1224.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.07.003>

112. Yamamoto, T., Kosaka, N., Hattori, Y., Ochiya, T. (2018). A Challenge to Aging Society by microRNA in Extracellular Vesicles: microRNA in Extracellular Vesicles as Promising Biomarkers and Novel Therapeutic Targets in Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Medicine*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/jcm7030055>
113. Zaiss, D. M. W., Standera, S., Kloetzel, P.-M., Sijts, A. J. A. M. (2002). PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14344–14349. <https://doi.org/10.1073/pnas.212257299>
114. Zhou, R., Shanas, R., Nelson, M. A., Bhattacharyya, A., Shi, J. (2010). Increased expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in pancreatic cancer and its association with the mutant p53. *International Journal of Cancer*, 126(2), 395–404. <https://doi.org/10.1002/ijc.24744>
115. Zhou, X., Liao, W.-J., Liao, J.-M., Liao, P., Lu, H. (2015). Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7(2), 92–104. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv014>
116. Zhu, N., Zheng, S., Xu, R., Yu, R. (2003). [Overexpression of S3 ribosomal protein gene is involved in drug resistance in K562/DOX cells]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi*, 24(3), 141–143.