

УДК 577.122.2

## 11S АКТИВАТОР ПРОТЕАСОМЫ: ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ МОЗГА МЫШЕЙ И ВЛИЯНИЕ НА ГИДРОЛИЗ ПЕПТИДНЫХ СУБСТРАТОВ 20S И 26S ПРОТЕАСОМОЙ

А.В. Бачева, О.В. Коробкина, П.С. Нестерова, В.А. Крячков, А.Г. Габибов\*

(кафедра химии природных соединений химического факультета  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова;  
e-mail: anbach@genebee.msu.ru)

Оптимизирована методика выделения регуляторной субчастицы протеасомы 11S из гомогената мозга мыши; определен субъединичный состав выделенного белка. Изучена зависимость скорости гидролиза модельного субстрата Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-АМС от мольного соотношения регуляторного белка 11S к протеасоме 20S. Определены константы Михаэлиса протеасомы 20S из головного мозга мышей линии BALB/c и комплекса протеасомы 20S с регуляторным белком 11S по специфическим флуоресцентным субстратам Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-АМС, Ac-Arg-Leu-Arg-АМС, Z-Leu-Leu-Glu-АМС. Показано, что 11S-субчастица практически не влияет на связывание специфических флуоресцентных пептидных субстратов протеасомой 20S, но значительно увеличивает скорость гидролиза по всем трем субстратам, при этом не изменяет скорость гидролиза пептидного субстрата протеасомой 26S.

**Ключевые слова:** протеасома, регулятор протеасомы 11S, активность протеасомы, субъединичный состав.

Протеасома функционирует в каждой эукариотической клетке, участвуя в деградации большей части внутриклеточных белков, в том числе неправильно фолдированных и мутантных белков. В клетке протеасома работает в комплексе со специальными регуляторными белками, которые, присоединяясь к основной субъединице, открывают белкам доступ в протеолитическую камеру и могут оказывать влияние на каталитические свойства всего фермента. Один из таких регуляторов – субчастица 19S, обладающая АТФазной активностью и сайтом узнавания убиквитина. Вместе с протеасомой 20S она образует комплекс, называемый протеасома 26S, который занимает центральное место в процессе убиквитин-зависимой деградации белков [1, 2]. Кроме субчастиц 19S эукариотические клетки содержат другие регуляторные частицы (РА28, РА200, Р131), которые могут взаимодействовать с протеасомой 20S, тем самым формируя альтернативные формы протеасомы. Встречаются асимметричные изоформы протеасомы 26S, содержащие разные регуляторные частицы на концах 20S. Многие из этих белков влияют на протеолитическую активность протеасомы, но в отличие от 19S эти альтернативные регуляторы не являются АТРазами и не имеют сайтов связывания поли-убиквитиновых цепей,

т.е. регулируют убиквитин-независимую деградацию субстратов протеасомой.

Семейство регуляторов РА28 (proteasome activator of apparent subunit molecular weight 28 kDa), отсутствующее в клетках низших эукариот, но обнаруженное у видов от *Trypanosoma* до млекопитающих, состоит из двух родственных комплексов: РА28 $\alpha/\beta$  и РА28 $\gamma$  [3]. Субчастица 11S, иначе называемая REG белок или РА28, способна в отсутствие АТФ увеличивать скорость гидролиза протеасомой субстратов, не меченных убиквитином, открывая вход и выход из протеолитической камеры для продуктов гидролиза. Регулятор протеасомы 11S был впервые идентифицирован в бычьих [4] и человеческих [5] красных кровяных тельцах по способности усиливать пептидазную активность протеасомы 20S по небольшим флуорогенным субстратам в 100 раз. Кроме того, 11S может ассоциировать с комплексом протеасомы 20S и 19S-субчастицы, и для этого процесса также не требуется энергии АТФ [6, 7]. Считается, что в случае образования гибридного комплекса 19S-20S-11S, 19S открывает субстратам доступ в протеолитическую камеру, а 11S регулирует вывод белковых продуктов гидролиза из протеасомы, влияя при этом на длину образующихся фрагментов [8].

\*ИБХ РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Три типа 11S-регулятора, идентифицированные у млекопитающих, довольно консервативны, имеют обширное распределение по тканям [9, 10] и называются  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -гомологами. Идентичность первичной структуры  $\alpha$ - и  $\beta$ -гомологов составляет 50% и около 30–40% с 11S- $\gamma$  белком [11]. Все три типа 11S-регулятора имеют сходные биохимические свойства – обладают способностью связываться с протеасомой 20S и активировать ее пептидазную активность, но при этом не утилизируют АТФ и не стимулируют деградацию белков [12]. При изучении кристаллической структуры 11Sa человека показано, что мономеры, составленные из четырех длинных альфа-спиралей, собираются в гептамер массой около 200 кДа, окружающий центральное отверстие, которое служит каналом для прохода пептидных субстратов внутрь протеасомы или из нее, но не позволяет проходить белкам, обладающим сформированной пространственной структурой [13]. В составе регуляторного белка были выделены три функциональных структурных домена: С-концевые остатки, активационная петля и гомолог-специфичная вставка. С-концевой участок 11S играет очень важную роль при связывании с протеасомой 20S [14]. Гептамерное кольцо субчастицы 11S имеет форму бочки и содержит центральный канал диаметром 20 Å с одного конца и 30 Å с другого, связывающегося с протеасомой. Связывание 11S с протеасомой вызывает изменения конформации N-концевых участков  $\alpha$ -субъединиц протеасомы, в результате чего открывается пора, образованная  $\alpha$ -кольцом протеасомы, что позволяет субстратам проходить внутрь каталитической полости и делает активные центры фермента более доступными для связывания и гидролиза субстрата [15].

Субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  имеют большое сродство друг к другу и склонны образовывать смешанный  $\alpha/\beta$ -гептамерный комплекс стохастического состава, в то время как  $\gamma$ -субъединицы чаще образуют гомо-гептамерный комплекс [16]. Разный состав 11S-регулятора влияет на то, в каких процессах будет участвовать протеасома. Так, регуляторы, имеющие смешанный  $\alpha/\beta$ -состав, являются интерферон- $\gamma$ -индуцируемыми и принимают участие в презентации антигенов [17]. Кроме того, комплексы, состоящие из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, прочнее связываются с протеасомой и сильнее увеличивают ее пептидазную активность, по всем типам субстратной специфичности, в отличие от  $\gamma$ -комплексов, которые усиливают только трипсиноподобную активность.

Цель настоящей работы состояла в выделении 11S-активатора протеасомы из мозга мышей

и изучении его влияния на гидролиз пептидных субстратов 20S и 26S протеасомой.

### Экспериментальная часть

**Приборы и материалы.** Все использованные в работе реактивы были квалификации «х.ч.» или «для молекулярной биологии». Тригидроксиметиламинометан (Трис), глицин, глицерин, ЭДТА, лейпептин,  $MgCl_2$ , дитиотреитол (ДТТ), пептидные флуоресцентные субстраты Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Z-Leu-Leu-Glu-AMC, Ac-Arg-Leu-Arg-AMC, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, натриевая соль аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), набор белков для калибровки с диапазоном масс от 65 до 669 кДа, голубой декстран («Sigma», США); NaCl,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$ , диметилсульфоксид (ДМСО),  $(NH_4)_2S_2O_8$ , додецилсульфат натрия (ДСН), акриламид, N,N-метиленбисакриламид («Хеликон», Россия); бортезомиб («LC Laboratories», США), блокирующий реагент ECL+, система проявки для иммуноблоттинга ECL+, нитроцеллюлозная мембрана Hybond C extra («GE Healthcare», США); маркеры молекулярной массы Protein Molecular Weight Marker 14,4–116,0 кДа, Prestained Protein Molecular Weight Marker 19,0–118,0 кДа («Fermentas», Литва). Моноклональные антитела мыши к субъединицам  $\alpha$ 1,2,3,5,6 и 7 20S протеасомы, к субъединице Rpt6 19S регулятора, к субъединицам  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  11S регулятора; моноклональные антитела кролика к субъединице LMP7; конъюгаты вторичных антивидовых антител с пероксидазой хрена («Enzo Life Sciences», «Santa Cruz», США).

Центрифугирование проводили на центрифугах «Eppendorf» (Германия); определение концентрации белка проводили на приборе «NanoDrop-2000» («Thermo Scientific», США); флуориметрические измерения выполняли на микропланшетном флуориметре «Multilabel Reader VictorX5» в черных 96-луночных планшетах («Greiner Bio-One», Германия); электрофорез проводили на приборе «MiniPROTEAN» («BioRad», США), перенос на мембрану проводили на приборе для полусухого электропереноса «TE77 ECL Semi-dry Transfer Unit» («GE Healthcare», США), изображения блоттинг-мембран получали на сканере «ChemiDoc» («BioRad», США). Все хроматографические стадии проводили на приборе для скоростной высокоэффективной жидкостной хроматографии («AKTA Purifier», «GE Healthcare») с использованием колонок Superose 6 10/300 GL, Superdex 200 10/300 GL, MonoQ 5/50 («GE Healthcare»), «DEAE TOYOPEARL 650M» («TOYO SODA», Япония).

**Растворы.** Все растворы готовили на дистиллированной воде или на воде особой чистоты из установки «Milli-Q» («Millipore»).

Буферные растворы для выделения протеасомы 20S: Буфер А (20 мМ Трис-НСl, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 10% глицерина, pH 7,5), Буфер Б (20 мМ Трис-НСl, 250 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 20% глицерина, pH 7,5), Буфер Г (20 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, pH 7,5), Буфер Е (20 мМ Трис-НСl, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 10% глицерина, pH 7,8).

Буферные растворы для выделения протеасомы 26S: Буфер А + 2 мМ АТФ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>; Буферы Б, Г и Е готовили аналогично, с добавлением 5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ АТФ.

Буферные растворы для выделения 11S субчастицы: Буфер А + 10 мкМ лейпептин; Буфер TSD (20 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 10% глицерина, pH 7,5).

**Методики.** Выделение протеасомы 20S и 26S проводили по методике, описанной в [18–20]. Для калибровки колонки Superdex 200 использовали набор белков для гель-фильтрации с диапазоном масс от 65 до 669 кДа и голубой декстран для определения мертвого объема колонки. Элюцию проводили в буфере TSD А. Результаты обрабатывали в программе Microsoft Excel и представляли в виде графика зависимости  $K_{av}$  (ln MW), где значение  $K_{av}$  рассчитывали по формуле

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0},$$

где  $K_{av}$  – коэффициент доступности;  $V_e$  – объем удерживания белка;  $V_t$  – общий объем колонки;  $V_0$  – «мертвый» объем колонки.

Выделение регуляторного белка 11S осуществляли по методике, аналогичной той, что использовалась для протеасомы 20S, с некоторыми модификациями: в буфер А для гомогената добавляли лейпептин; высаливание проводили (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 85% от насыщения; полученные осадки растворяли в небольшом количестве буфера TSD и проводили диализ против буфера TSD. Ионообменную хроматографию осуществляли на колонке DEAE TOYOPERL, уравновешенной буфером TSD, элюировали градиентом концентрации NaCl от 0 до 0,3 М; гель-фильтрацию проводили на колонке Superdex 200, уравновешенной буфером TSD. После каждой хроматографии собранные фракции анализировали на наличие белка 11S флуориметрическим методом по увеличению активности протеасомы 20S по специфическому флуоресцентно-

му субстрату (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC). Для этого добавляли очищенную протеасому 20S ко всем фракциям и отбирали те, где наблюдалось резкое увеличение активности протеасомы по сравнению с контролем. Фракции, содержащие 11S-белок, переводили в буфер для хранения (буфер Г + 10% глицерина) методом диализа (ночь при +4°C). Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм на приборе «NanoDrop». При необходимости проводили концентрирование на мембранных микроколонках «Amicon Ultra» с пределом отсечения 3 кДа.

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле проводили по стандартной методике Леммли [21], использовали 12%-й разделяющий гель.

Иммуноблоттинг гомогенатов тканей и фракций, содержащий протеасому 20S, 26S и субчастицу 11S проводили по стандартной методике, например [22, 23], с использованием подходящих первичных антител и вторичных антивидовых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена в соответствии с инструкциями производителей. Изображения получали на сканере ChemiDoc с выдержкой 15–30 мин.

**Кинетические измерения.** Для определения скорости гидролиза пептидных субстратов в непрозрачный черный 96-луночный планшет помещали раствор субстрата в ДМСО, смешанный с буфером Г ([S] = 4–150 мкМ), раствор протеасомы в буфере Г и, если необходимо, раствор активатора 11S, доводили общий объем в лунке до 120 мкл раствором буфера Г. Концентрацию субстратов в ДМСО определяли по поглощению при 324 нм, используя значение коэффициента молярного поглощения, равное 13500 [л·см<sup>-1</sup>·моль<sup>-1</sup>]. Измерение интенсивности флуоресценции проводили в течение 1 ч с интервалом измерений 30 с при длине волны возбуждения 355 нм, длине волны флуоресценции 460 нм и температуре 37°C. Результаты измерений обрабатывали в программе MO Excel. Для определения интенсивности флуоресценции  $I^{100}$  свободного 4-амино-7-метилкумарина (AMC) проводили калибровочное измерение в диапазоне концентраций AMC от 10<sup>-6</sup> до 5·10<sup>-5</sup> М. Скорость гидролиза рассчитывали по формуле

$$V = \frac{\frac{dI}{dt} c}{(I^{100} - I^0)},$$

где  $dI/dt$  – изменение интенсивности флуоресценции за соответствующее время;  $c$  – концентрация субстрата;  $I^{100}$  – интенсивность флуорес-

ценции АМС;  $I^0$  – начальная интенсивность флуоресценции субстрата.

### Результаты и их обсуждение

Выделение и очистку протеасомы 20S и 26S осуществляли по трехстадийной схеме; за основу взята методика, описанная в [18–20, 24]. На каждом этапе выделения и очистки протеасомы 26S использовали тот же буферный раствор, что и в случае выделения протеасомы 20S, но с добавлением АТФ, необходимого для осуществления сборки комплекса 20S с субчастицей 19S. Для подтверждения отсутствия других протеаз в образцах, содержащих протеасомы 20S и 26S, проводили ингибиторный анализ с использованием специфического ингибитора бортезомиба (PS-341). По литературным данным, бортезомиб не ингибирует *in vitro* другие протеазы при концентрации 50 нМ, использованной нами [25]. При добавлении ингибитора в реакционную смесь, содержащую протеасому и флуоресцентный субстрат, наблюдалась полная потеря каталитической активности фермента. Идентификацию протеасомы 20S и 26S в полученных образцах проводили методом Вестерн-блоттинга с использованием поликлональных антител на сумму  $\alpha$ -субъединиц протеасомы 20S и на Rpt6-субъединицу 19S-субчастицы, входящую в состав комплекса 26S (рис. 1). Представленные результаты доказывают наличие протеасом 20S и 26S в полученных препаратах.

### Выделение и очистка 11S регуляторного белка протеасомы

Выделение 11S-субчастицы осуществлялось по трехстадийной схеме (аналогичной той, что применялась для протеасомы 20S) с использованием некоторых модификаций; за основу взята методика, описанная в [5]. На первом этапе приготовления гомогената тканей в буферный раствор для образца добавляли лейпептин, специфично ингибирующий цистеиновые, сериновые и треониновые карбоксипептидазы, для предотвращения возможного протеолиза выступающих С-концевых участков, присутствующих в структуре 11S-белка, которые необходимы для связывания с альфа-кольцом протеасомы 20S [26]. Далее проводили высаливание  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  при 40% от насыщения для отделения высокомолекулярных белков и вторичное высаливание при 85% для последующего выделения 11S-белка из полученного образца. Использование данных условий позволяет отделить 11S от протеасомы 26S, однако остается вероятность соосаждения различных белковых примесей.

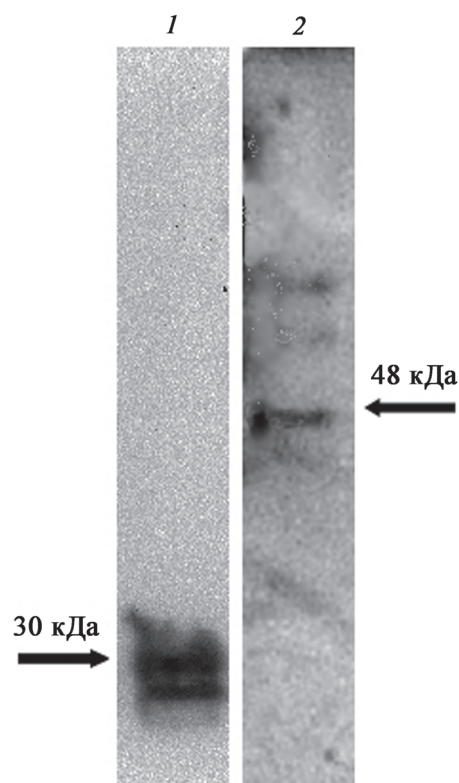


Рис. 1. Анализ полученных препаратов протеасом 20S и 26S методом иммуноблоттинга: 1 – на сумму  $\alpha$ -субъединиц ( $\alpha$  1, 2, 3, 5, 6, 7) 20S-субчастицы; 2 – на субъединицу Rpt6 регуляторной субчастицы 19S протеасомы 26S

Для проведения гель-филтрации полученного образца мы выбрали колонку Superdex 200. Для того чтобы выбрать фракции, содержащие белки с молекулярной массой  $\sim 200$  кДа, колонку откалибровали с помощью набора калибровочных белков. Полученный график зависимости коэффициента доступности ( $K_{av}$ ) от логарифма молекулярной массы (MW) приведен на рис. 2.

Далее мы проводили ионообменную хроматографию с использованием колонки, заполненной носителем DEAE TOYOPERL. Элюцию осуществляли градиентом NaCl от 0 до 0,3 М в буфере TSD. После каждой хроматографии собранные фракции анализировали на наличие 11S-белка. Для этого добавляли выделенную ранее протеасому 20S ко всем фракциям и отбирали те, где наблюдалось резкое увеличение активности протеасомы. Отобранные фракции сами по себе (без добавления протеасомы 20S) не обладали активностью по специфическому субстрату. Кроме того, детектируемое изменение активности протеасомы в присутствии выбранных фракций многократно превосходило значение, полученное в случае гидролиза специфического субстрата отдельно протеасомой 20S. Профили элюции и относительная активность полученных фракций представлены на рис. 3.

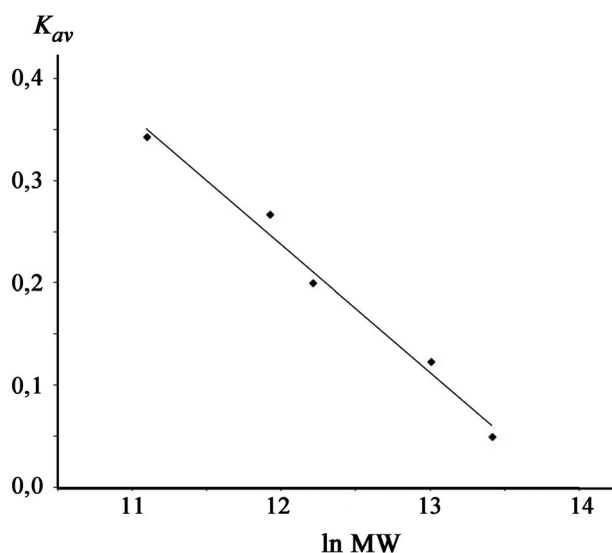


Рис. 2. Калибровочный график зависимости коэффициента доступности ( $K_{av}$ ) от натурального логарифма молекулярной массы белков ( $\ln MW$ ) для разделения глобулярных белков на колонке Superdex 200

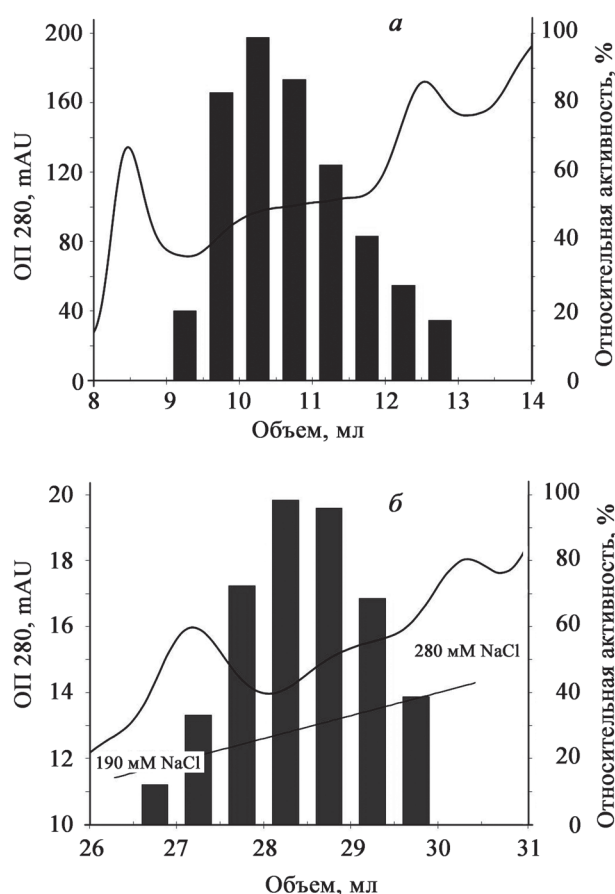


Рис. 3. Фрагменты профилей элюции этапа очистки 11S-регулятора протеасомы методом гель-фильтрации (а) и ионообменной хроматографии (б). Относительная активность протеасомы по субстрату Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC в присутствии выбранных фракций представлена в виде столбиков. Градиент концентрации NaCl в элюенте изображен наклонной линией

Идентификацию, а также определение субъединичного состава 11S-субчастицы в полученных образцах проводили методом Вестерн-блоттинга с использованием антител на  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицы 11S регуляторного белка. Результаты иммуноблоттинга препарата 11S из головного мозга мышей представлены на рис. 4.

Согласно литературным данным, гептамерное кольцо 11S регулятора может либо иметь стохастический  $\alpha/\beta$ -состав (такой регулятор локализуется в основном в цитоплазме), либо представлять собой моногептамер PA28 $\gamma$ , состоящий исключительно из  $\gamma$ -субъединиц, который в отличие от PA28 $\alpha/\beta$  обнаруживается в ядре клеток [6, 10]. Комплекс PA28 $\gamma$  локализуется в основном в нейронах и предположительно участвует в процессе деления клетки и в онкогенезе [3]. Таким образом, детектированные сигналы, соответствующие всем трем типам субъединиц ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ), свидетельствуют о наличии в полученном нами образце двух типов 11S-субчастиц с разным составом.

#### Изучение зависимости скорости гидролиза модельного субстрата от мольного соотношения регуляторного белка 11S к протеасоме 20S

Для оценки сродства регуляторного белка 11S к протеасоме 20S нами был проведен эксперимент, в котором при увеличении мольного соотношения 11S-белка к протеасоме детектировалась скорость гидролиза флуоресцентного субстрата Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, отвечающего химотрипсиновой специфичности протеасомы. Из графика зависимости (рис. 5) видно, что скорость гидролиза линейно возрастает при увеличении мольного соотношения белка 11S к протеасоме 20S от 1:1 до 10:1. Концентрацию белка рассчитывали, исходя из значения оптического поглощения при 280 нм с учетом усредненного коэффициента экстинкции, равного 0,62 для раствора с концентрацией 1 мг/мл (расчет проводился с использованием онлайн-ресурса PROTEIN CALCULATOR v3.4). Полученные нами результаты эксперимента соотносятся с литературными данными. В работе [12] показано, что в интервале

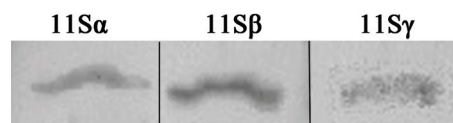


Рис. 4. Определение количества  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц регуляторного белка 11S протеасомы в очищенном препарате 11S из мозга мышей линии Balb/C методом иммуноблоттинга

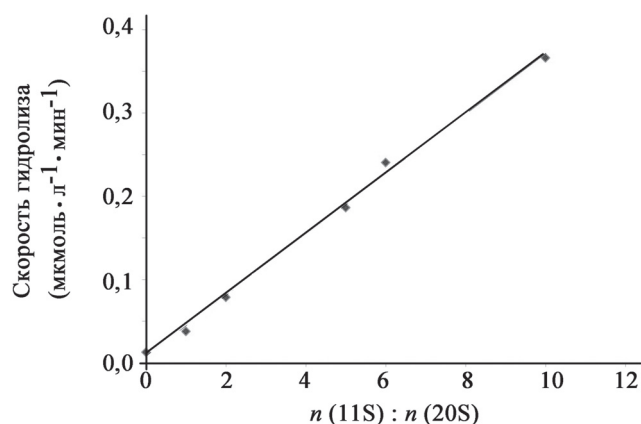


Рис. 5. Зависимость скорости гидролиза Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC ( $c = 40$  мкМ) от мольного соотношения регуляторного белка 11S к протеасоме 20S

соотношений регулятора 11S к протеасоме 20S от 1:1 до 10:1 наблюдается линейное возрастание скорости гидролиза модельного субстрата (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC). Выход на плато достигается при соотношении 30:1 (11S к 20S), когда в растворе, вероятно, образуется максимальное число комплексов 20S–11S. Для проведения последующих экспериментов мы выбрали мольное соотношение белка 11S и протеасомы 20S, равное 1:2.

#### **Определение кинетических параметров гидролиза модельных флуоресцентных субстратов протеасомой 20S и комплексом протеасомы с регуляторным белком 11S**

Одной из важных характеристик фермента являются его кинетические параметры – константы Михаэлиса по специфическим субстратам. Для определения кинетических параметров гидролитической активности протеасомы, а также комплекса 20S с регуляторным белком 11S использовали модельные пептидные субстраты Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Ac-Arg-Leu-Arg-AMC, Z-Leu-Leu-Glu-AMC, образующие при гидролизе флуоресцентный продукт 7-амино-4-метилкумарин (AMC), и детектировали изменение интенсивности флуоресценции во времени. Мольное соотношение протеасомы 20S к белку 11S составляло 1:2. Измеряли скорость гидролиза при различных концентрациях субстратов (1–150 мкМ), расчет кинетических параметров проводили по методу Лайнуивера–Берка. Полученные значения констант Михаэлиса, сопоставленные с литературными данными, а так же константы Михаэлиса для комплекса протеасомы с 11S-регулятором и отношение максимальных скоростей гидролиза комплексом 20S + 11S к 20S представлены в табл. 1.

Мы выбрали три наиболее часто используемых субстрата, которые соответствуют химотрипсиновой (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC), трипсиновой (Ac-Arg-Leu-Arg-AMC) и каспазоподобной (Z-Leu-Leu-Glu-AMC) типам специфичности протеасомы. Соответствие экспериментально определенных значений констант Михаэлиса литературным данным [27] свидетельствует о высокой степени очистки протеасомы и об отсутствии других протеаз в полученном препарате. Кроме того, полученные нами значения констант Михаэлиса для комплекса протеасомы 20S с 11S-регулятором практически не отличаются от значений констант, полученных отдельно для протеасомы, из чего можно сделать вывод о том, что 11S-белок не влияет на степень сродства ферментативного комплекса к субстратам, отвечающим трем основным типам специфичности. Однако, как видно из последнего столбца табл. 1, 11S-регулятор способствует увеличению скорости гидролиза всех трех субстратов, особенно в случае субстрата, отвечающего химотрипсиновой специфичности. Согласно литературным данным, с использованием небольших флуорогенных пептидных субстратов установлено, что связывание регулятора 11S  $\alpha/\beta$  с протеасомой увеличивает скорость гидролиза по всем трем типам субстратной специфичности, в то время как регулятор 11S- $\gamma$  усиливает активность только по типу трипсина и в некоторой степени инактивирует два других типа активности [12]. С помощью Вестерн-блоттинга показано, что в полученном нами образце присутствуют  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицы 11S-белка, однако из кинетических данных видно, что увеличение активности по типу трипсина гораздо меньше по сравнению с двумя другими. Поэтому можно сделать вывод о том, что 11S-белок, представленный  $\gamma$ -субъединицами, в нашем образце практически отсутствует.

В реакции гидролиза Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC протеасомой 26S (как в присутствии 11S-белка, так и без него) измеряли скорость реакции для концентраций субстрата от 1 до 100 мкМ. Расчет констант проводили по методу Лайнуивера–Берка, результаты представлены в табл. 2. Константа Михаэлиса, полученная нами, хорошо согласуется с литературными данными [27]. Кроме того, видно, что тенденция, намеченная для протеасомы 20S и ее комплекса с регулятором 11S, прослеживается и в случае протеасомы 26S: присутствие регулятора 11S практически не влияет на константу Михаэлиса, однако и скорость реакции гидролиза протеасомой 26S, в отличие от протеасомы 20S, не меняется.

Т а б л и ц а 1

**Константы Михаэлиса протеасомы 20S и комплекса протеасомы 20S с регуляторным белком 11S из головного мозга мышей линии BALB/c по различным субстратам и их сравнение с литературными данными**

Субстрат	$K_M$ , мкМ (литературные данные для 20S PR из других тканей)	$K_M$ (20S), мкМ	$K_M$ (11S + 20S), мкМ	$V_{\max}$ (11S + 20S)/ $V_{\max}$ (20S)
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	44 ± 4 [27]	72 ± 7	84 ± 8	28
Ac-Arg-Leu-Arg-AMC	28 ± 3 [27]	26 ± 3	28 ± 3	4
Z-Leu-Leu-Glu-AMC	49 ± 8 [27]	70 ± 7	95 ± 10	16

Т а б л и ц а 2

**Кинетические параметры гидролиза Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC протеасомой 26S в присутствии и в отсутствие регуляторного белка 11S из головного мозга мышей линии BALB/c и сравнение их с литературными данными**

Протеасома	$K_M$ , мкМ	$K_M$ , мкМ [литературный источник]	$V_{\max}$ (11S + PR)/ $V_{\max}$ (PR)
26S	46 ± 4	44,2 ± 3,9 [28]	1
26S+11S	99 ± 10	данные отсутствуют	

Таким образом, нами отработана и оптимизирована методика выделения регуляторной субчастицы 11S из гомогената тканей мыши; впервые определен субъединичный состав очищенного 11S-регулятора из мозга мышей Balb/C. Показано, что в полученном образце присутствуют 11S-субчастицы, составленные из всех трех типов субъединиц ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ). Определены кинетические параметры гидролиза специфических флуорес-

центных субстратов (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Ac-Arg-Leu-Arg-AMC и Z-Leu-Leu-Glu-AMC) комплексом протеасомы 20S с регуляторным белком 11S из головного мозга мышей линии BALB/c. Показано, что 11S-субчастица значительно ускоряет гидролиз протеасомой 20S пептидных субстратов, при этом она не оказывает влияния на константу Михаэлиса и не изменяет кинетических параметров протеасомы 26S.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-04-01446) и при поддержке гранта РНФ (№ 14-50-00131).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lander G.C., Estrin E., Matyskiela M.E., Bashore C., Nogales E., Martin A. // Nature. 2012. Vol. 482. P. 186.
2. Lecker S.H., Goldberg A.L., Mitch W.E. // JASN. 2006. Vol. 17. N 7. P. 1807.
3. Gao X., Li J., Pratt G., Wilk S., Rechsteiner M. // Arch. Biochem. Biophys. 2004. Vol. 425. P. 158.
4. Ma C.-P., Slaughter C.A., DeMartino G.N. // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. N 15. P. 10515.
5. Dubiel W., Pratt G., Ferrell K., Rechsteiner M. // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. N 31. P. 22369.
6. Tanahashi N., Murakami Y., Minami Y., Shimbara N., Hendil K.B., Tanaka K. // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 14336.
7. Cascio P., Call M., Petre B.M., Walz T., Goldberg A.L. // The EMBO J. 2002. Vol. 21. N 11. P. 2636.
8. Kloetzel P.M. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2001. Vol. 2. N 3. P. 179.
9. Jiang H., Monaco J. // 1997. Vol. 46. P. 93.
10. Soza A., Knuehl C., Groettrup M., Henklein P., Tanaka K., Kloetzel P.M. // FEBS Lett. 1997. Vol. 413. N 1. P. 27.

11. Ahn J.Y., Tanahashi N., Akiyama K., Hisamatsu H., Noda C., Tanaka K., Chung C.H., Shibara N., Willy P.J., Mott J.D., Slaughter C.A., DeMartino G.N. // FEBS Lett. 1995. Vol. 366. N 1. P. 37.
12. Realini C., Jensen C.C., Zhang Z., Johnston S.C., Knowlton J.R., Hill C.P., Rechsteiner M. // J. Biol. Chem., 1997. Vol. 272. N 41. P. 25487.
13. Whitby F.G., Masters E.I., Kramer L., Knowlton J.R., Yao Y., Wang C.C., Hill C.P. // Nature. 2000. Vol. 408. P. 115.
14. Song X., Mott J.D., von Kampen J., Pramanik B., Tanaka K., Slaughter C.A., DeMartino G.N. // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. N 42. P. 26410.
15. Knowlton J.R., Johnston S.C., Whitby F.G., Realini C., Zhang Z., Rechsteiner M., Hill C.P. // Nature. 1997. Vol. 390. N 6660. P. 639.
16. Zhang Z., Krutchinsky A. // Biochemistry. 1999. Vol. 38. N 17. P. 5651.
17. Groettrup M., Soza A., Eggers M., Kuehn L., Dick T.P., Schild H., Rammensee H.-G., Koszinowski U.H., Kloetzel P.-M // Nature, 1996. Vol. 381. N 6578. P. 166.
18. Белогуров А.А., Пономаренко Н.А., Говорун В.М., Габиров А.Г., Бачева А.В. // Докл. АН. Сер. Биохимия и биофизика. 2009. Vol. 425. N 2. P. 251.
19. Bacheva A.V., Belogurov A.A., Ponomarenko N.A., Knorre V.D., Govorun V.M., Serebryakova M.V., Gabibov A.G. // 2009. Vol. 1. N 1. P. 84.
20. Бачева А.В., Белогуров А.А., Кузина Е.С., Серебрякова М.В., Пономаренко Н.А., Кнорре В.Д., Говорун В.М., Габиров А.Г. // Биорг. Химия. 2011. Vol. 37. N 1. P. 39.
21. Laemmli, U.K. // Nature. 1970. Vol. 227. N 5259. P. 680.
22. Belogurov A.Jr., Kuzina E., Kudriaeva A., Kononikhin A., Kovalchuk S., Surina Y., Smirnov I., Lomakin Y., Bacheva A., Stepanov A., Karpova Y., Lyupina Y., Kharybin O., Melamed D., Ponomarenko N., Sharova N., Nikolaev E., Gabibov A. // FASEB J. 2015. Vol. 29. N 5. P. 1901.
23. Кузина Е.С., Черноловская Е.Л., Кудряева А.А., Зенкова М.А., Кнорре В.Д., Сурина Е.А., Пономаренко Н.А., Бобик Т.В., Смирнов И.В., Бачева А.В., Белогуров А.А., Габиров А.Г., Власов В.В. // Докл. АН. Сер. Биохимия и биофизика. 2013. Vol. 453. N 4. P. 446.
24. Абрамова Е.Б., Астахова Т.М., Ерохов П.А., Шарова Н.П. // Изв. РАН. Сер. биологическая. 2004. Vol. 2. P. 150.
25. Arastu-Kapur S., Anderl J.L., Kraus M., Parlati F., Shenk K.D., Lee S.J., Muchamuel T., Bennett M.K., Driessen C., Ball A.J., Kirk C.J. // Clin. Cancer Res. 2011. Vol. 17. P. 2734.
26. Ma C.-P., Willy P.J., Slaughter C.A., DeMartino G.N. // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. N 30. P. 22514.
27. Piccinini M., Tazartes O., Mostert M., Musso A., DeMarchi M., Rinaudo M.T. // Brain Res. Mol. Brain Res. 2000. Vol. 76. N 1. P. 103.

Поступила в редакцию 01.12.15

## 11S PROTEASOME ACTIVATOR: ISOLATION FROM MICE BRAIN AND INFLUENCE ON PEPTIDE SUBSTRATE HYDROLYSIS BY 20S AND 26S PROTEASOME

A.V. Bacheva, O.V. Korobkina, P.S. Nesterova, V.A. Kryachkov, A.G. Gabibov

(Chair of Chemistry of Natural Compounds, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University)

**Purification of 11S proteasome regulator from mice brain was optimized; subunit composition of isolated protein was determined by Western-blot. The dependency of peptidase activity of 20S proteasome on molar concentration of 11S regulator was examined. Michaelis constants of hydrolysis of specific fluorescent substrates Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Ac-Arg-Leu-Arg-AMC, Z-Leu-Leu-Glu-AMC by 20S proteasome from BALB/c mice brain and by 20S-11S complex. It was shown that 11S subparticle has almost no influence on binding of specific fluorescent substrates by 20S proteasome, but strongly accelerates hydrolysis of all three substrates. At the same conditions 11S proteasome regulator did not change kinetic parameters for 26S proteasome.**

**Key words:** proteasome, 11S proteasome regulator, proteasome activity, subunit composition.

**Сведения об авторах:** Бачева Анна Владимировна – доцент кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (anbach@genebee.msu.ru); Коробкина Ольга Владимировна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (olya-kor14@yandex.ru); Нестерова Полина Сергеевна – аспирантка Университета Южной Калифорнии (polina.nester@gmail.com); Крячков Вячеслав Александрович – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (korsatheo@yandex.ru), Габиров Александр Габирович – заведующий лабораторией биокатализа ИБХ РАН им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, профессор кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, чл.-корр. РАН, докт. хим. наук (gabibov@mx.ibch.ru).