

УДК 577.122.2

ДИЗАЙН И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ СУБСТРАТОВ ПРОТЕАСОМЫ, СОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОГЛУТАМИНОВУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

В.А. Крячков, В.Н. Ташлицкий, А.В. Бачева*

(Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; *e-mail: anbach@genebee.msu.ru)

Спектральными и масс-спектрометрическими методами охарактеризованы флуорогенные полиглутаминсодержащие пептиды с 5 и 10 остатками глутамина подряд, имеющие FRET-пару EDANS (флуорофор) и Dabcyl (тушитель). Проверена возможность их гидролиза 20S-протеасомой. Определены кинетические параметры (каталитическая эффективность) для этих веществ. Показано, что наличие глицина в составе субстрата значительно ухудшает как растворимость, так и эффективность гидролиза протеасомой.

Ключевые слова: протеасома, флуорогенные субстраты, активность протеасомы, полиглутаминовые заболевания.

Болезнь Хантингтона обусловлена наличием удлиненного полиглутаминового тракта в белке хантингтин, что вызывает множество клеточных изменений и в конечном итоге приводит к нейродегенерации нейронов стриатума [1]. Хотя было предложено много теорий, точный механизм, по которому экспрессия полиглутаминсодержащих белков вызывает клеточные изменения, не доказан. Недавние исследования показали, что убиквитин-протеасомная система участвует в патогенезе болезни Хантингтона, и понимание этого процесса может иметь терапевтическое значение [2]. Имеются противоречивые сведения о том, способна ли протеасома гидролизовать полиглутаминовые последовательности. Несколько групп исследователей изучали этот вопрос, как на синтетических пептидах, так и на фрагментах белков. Так, было показано [3], что короткие субстраты fluorescein-NHQ₁₀RR и fluorescein-GGQ₁₀RR могут подвергаться гидролизу протеасомой в присутствии белка-активатора PA28γ. В другой работе [4] для ряда синтетических пептидов, содержащих от 10 до 30 остатков глутамина подряд (общая структура пептидов biotin-KKQ₁₀₋₃₀KK), с помощью метода времяпролетной МАЛДИ-масс-спектрометрии было показано, что протеасомы 20S и 26S из организма кролика и дрожжей не способны вносить разрезы внутри полиглутаминовой цепи. Для пептидов, имеющих 10 и 20 глутаминов подряд, наблюдалось отщепление лишь одного глутамина, ближайшего к N-концу пептида. В работе [5] из клеток мыши Neuro2a были созданы стабильные клеточные линии, экспрессирующие конструкции pIND-tNhtt-polyQ-EGFP, где к N-концу зеленого

флуоресцентного белка с усиленной флуоресценцией (EGFP) присоединен N-концевой фрагмент хантингтина (аминокислотные остатки 1–90, нумерация по стандартной последовательности хантингтина, аннотированной в базе данных PDB), содержащий 16, 60 или 150 остатков глутамина подряд. Авторами утверждается, что ингибирование протеасомы за счет обработки клеток растворами лактацистина и ALLN (N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO) ускоряет агрегацию мутантных фрагментов в клетке и образование телец включения [5]. Кроме того, авторами высказано предположение, что протеасома задействована в гидролизе N-концевого фрагмента хантингтина, содержащего полиглутаминовый фрагмент. Отмечается, что скорость деградации обратно пропорциональна количеству повторов глутамина в этом фрагменте. Была исследована также активность протеасомы в лизатах клеток, экспрессирующих белки, имеющие 16 и 150 остатков глутамина (в зависимости от времени экспрессии). Обнаружено, что в случае белка tNhtt-150Q-EGFP через четыре дня экспрессии примерно половина протеасомной активности наблюдается в нерастворимой фракции клеток, т.е. протеасома оказывается связанной с белковыми агрегатами. С помощью клеток MEF мыши, экспрессировавших экзон 1 хантингтина с остатками глутамина (25 или 97 остатков подряд), другими авторами было показано, что протеасома млекопитающих может полностью деградировать polyQ-содержащий фрагмент как нормального, так и мутантного белка. Для эксперимента выделяли и очищали этот белковый фрагмент, а затем выдерживали его с протеасомой в течение 16 ч. Полу-

ченная смесь была проанализирована с помощью «LC-MS», при этом было обнаружено наличие одного или более разрывов [6].

Для того чтобы выяснить, как протеасома гидролизует полиглутаминовые пептиды, мы разработали новые флуорогенные субстраты протеасомы, структура которых отражает структуру N-концевой части белка хантингтина. Цель настоящей работы – дизайн, спектральный и масс-спектрометрический анализ, а также проверка возможности гидролиза протеасомой новых флуорогенных пептидных субстратов.

Экспериментальная часть

Приборы и материалы. Все реактивы были квалификации «х.ч.» или «для молекулярной биологии». В работе использовали Трис-гидроксиметил-аминометан (Трис), глицерин, ЭДТА, дитиотреитол (ДТТ), пептидный флуоресцентный субстрат Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , диметилсульфоксид (ДМСО) («Sigma», США), бортезомиб («LC Laboratories», США). Пептид Dabcyl-Lys-(Gln)₅-Gly-Asp-EDANS был синтезирован в «Peptide Protein Research Ltd» (Великобритания); пептиды Dabcyl-Lys-(Gln)₁₀-Gly-Asp-EDANS и Dabcyl-Lys-(Gln)₁₀-Pro-Pro-Asp-EDANS синтезированы в «GenScript» (США).

Центрифугирование проводили на приборах «Eppendorf» (Германия); для определения концентрации белка использовали анализатор «NanoDrop-2000» («Thermo Scientific», США); спектральные характеристики изучали на спектрофотометре «Hitachi 2800a» и спектрофлуориметре « Cary Eclipse» («Varian»). Кинетические флуориметрические измерения выполняли на микропланшетном флуориметре «Multilabel Reader VictorX5» в черных 96-луночных планшетах («Greiner Bio-One», Германия). 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»).

Растворы. Все растворы готовили на дистиллированной воде или на воде особой чистоты, полученной на установке «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 (рН 7,5);

буфер Б: 20 мМ Трис-НСl, 250 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 20% глицерина (рН 7,5);

буфер Г: 20 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ (рН 7,5);

буфер Е: 20 мМ Трис-НСl, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 10% глицерина (рН 7,8).

Методики. Выделение 20S-протеасомы проводили по методике, описанной в [7–9]. Наличие протеасомы подтверждали иммуноблоттингом, как описано в [10, 11].

Кинетические измерения. Для определения скорости гидролиза пептидных субстратов в непрозрачный черный 96-луночный планшет помещали раствор субстрата в ДМСО, смешанный с буфером Г ($[S] = 4\text{--}150$ мкМ), раствор протеасомы в буфере Г и довели общий объем в лунке до 120 мкл раствором буфера Г. Концентрацию субстратов в ДМСО определяли по поглощению при длине волны 473 нм, используя значение коэффициента молярного поглощения, равное $32\ 000$ [л·см⁻¹·моль⁻¹]. Измерение интенсивности флуоресценции проводили в течение 1 ч с интервалом измерений 30 с при длине волны возбуждения 355 нм, длине волны флуоресценции 495 нм и температуре 37 °С. Результаты измерений обрабатывали в программе MO Excel. Для определения интенсивности флуоресценции I^{100} свободной 5-[(2-аминоэтил)амино]нафталин-1-сульфоновой кислоты (EDANS) проводили калибровочное измерение в диапазоне концентраций EDANS от 10^{-6} до $5 \cdot 10^{-4}$ 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 флуоресценции EDANS; I^0 – начальная интенсивность флуоресценции субстрата

Хромато-масс-спектрометрия. Образцы пептидов анализировали, используя систему «UPLC» («Waters») с детекторами PDA Detector и TQD-масс-спектрометром («Waters»), колонка «Acquity BEH C18» («Waters»). Элюцию вели градиентом от 5 до 50% В за 3 мин, скорость потока составляла 0,5 мл/мин при температуре 35 °С. Растворитель А – муравьиная кислота (20 мМ) в смеси ацетонитрил:вода (1:20); растворитель В – муравьиная кислота (20 мМ) в ацетонитриле. Масс-детектор работал в позитивной моде, диапазон детектируемых масс от 50 до 1500 Да, диапазон длин волн детектора оптического поглощения 220–500 нм. Данные

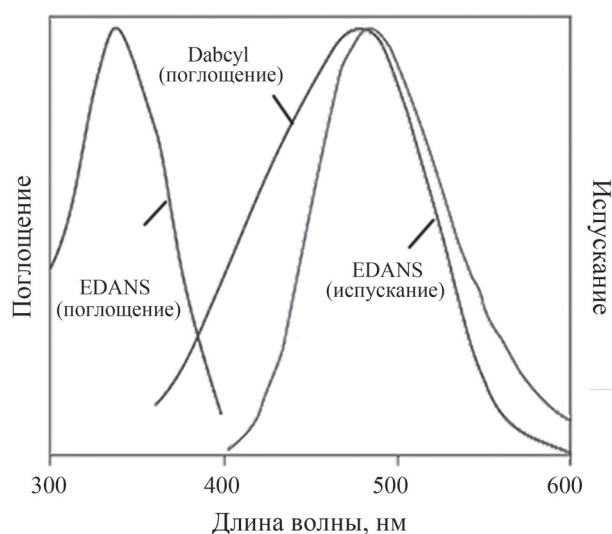


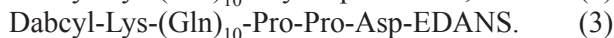
Рис. 1. Спектры поглощения и испускания FRET-пары Dabcyl-EDANS [12]

обрабатывали с помощью программы MassLynx (version 4.1 SCN919).

Результаты и их обсуждение

Пептидные субстраты с репортерными группами, подходящими для детекции спектральными методами, – хорошо зарекомендовавшая себя система для изучения гидролиза протеазами *in vitro*. Для увеличения чувствительности чаще всего используют пептидные субстраты, либо с флуорогенными, либо с флуоресцентными группами. В данной работе в качестве модельных субстратов для изучения гидролиза полиглутаминсодержащих пептидов и белков были выбраны пептиды Lys-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Gly-Asp и Lys-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Gly-Asp, содержащие пять и десять остатков глутамина подряд и FRET-пару флуорофор (EDANS) – тушитель (Dabcyl) на С- и N-конце соответственно. Приведенные в литературе [12] спектры поглощения (Dabcyl) и испускания (EDANS) имеют максимумы при $\lambda \approx 500$ нм (рис. 1).

В коммерческой компании были синтезированы следующие субстраты:



Для проверки соответствия субстратов заявленной структуре сначала изучали их спектральные характеристики (спектры поглощения, возбуждения и испускания). Для измерения спектров как исходных субстратов, так и субстратов, полностью гидролизованных субтилизином, использовали спектрофотометр «Hitachi 2800» и спек-

трофлуориметр «Varian Cary Eclipse». Спектры приведены на рис. 2–4. Для измерения спектров возбуждения была выбрана длина волны эмиссии, равная 500 нм. Для спектров испускания фиксировали длину волны возбуждения, равную 340 нм.

На основании приведенных спектров можно сделать определенные выводы.

1. Как следует из спектров поглощения, максимальная концентрация в водном буфере, содержащем 1% ДМСО, различается для трех субстратов в несколько раз. Самая большая концентрация достигается для самого короткого субстрата, самая низкая – для субстрата Dabcyl-KQ₁₀GD-EDANS (что, вероятно, связано с наличием глицина в аминокислотной последовательности).

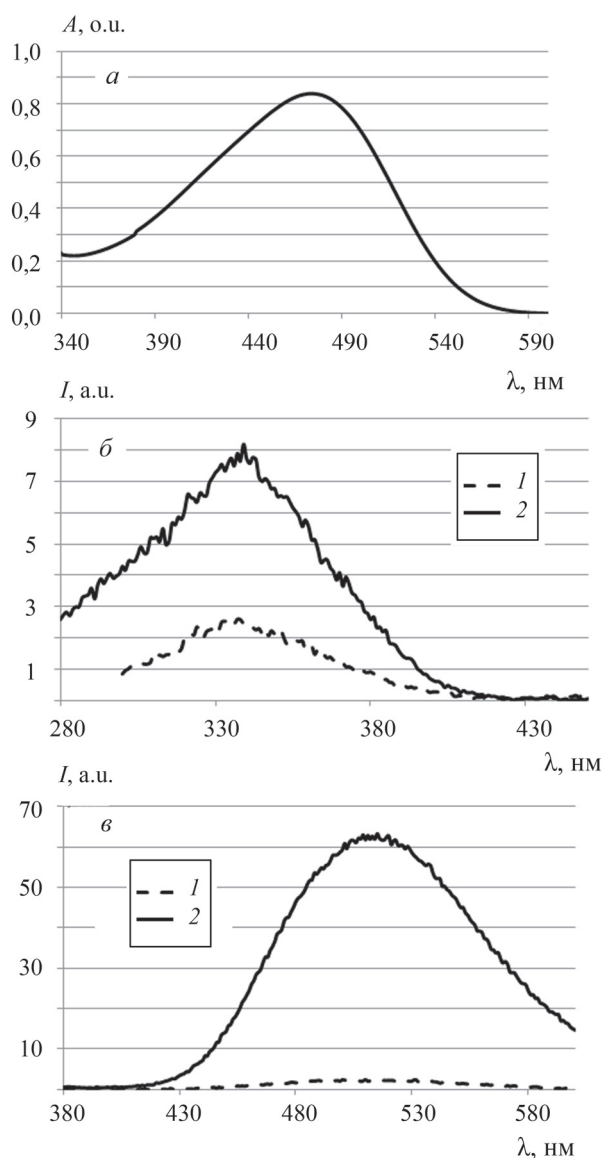


Рис. 2. Спектры: а – поглощения, б – возбуждения, в – эмиссии раствора Dabcyl-Lys-(Gln)₅-Gly-Asp-EDANS до гидролиза (1) и после гидролиза (2) субтилизином в Трис-НCl буфере (pH 7,8), содержащем 1% ДМСО

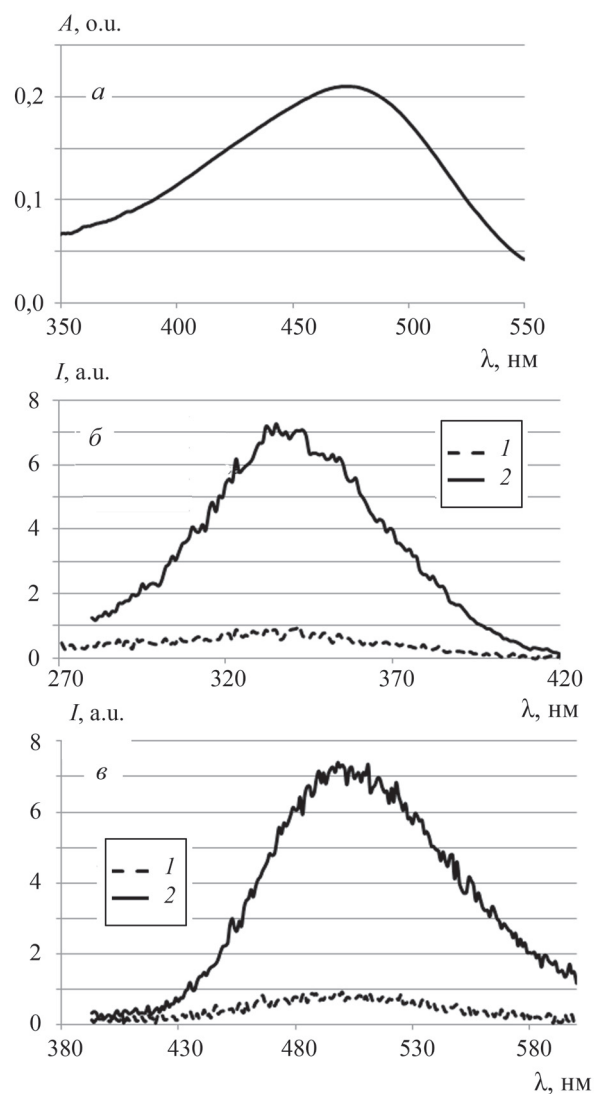


Рис. 3. Спектры: *a* – поглощения, *б* – возбуждения, *в* – эмиссии раствора Dabcyl-Lys-(Gln)₁₀-Gly-Asp-EDANS до (1) и после (2) гидролиза субтилизинном в Трис-НСl буфере (pH 7,8), содержащем 1% ДМСО

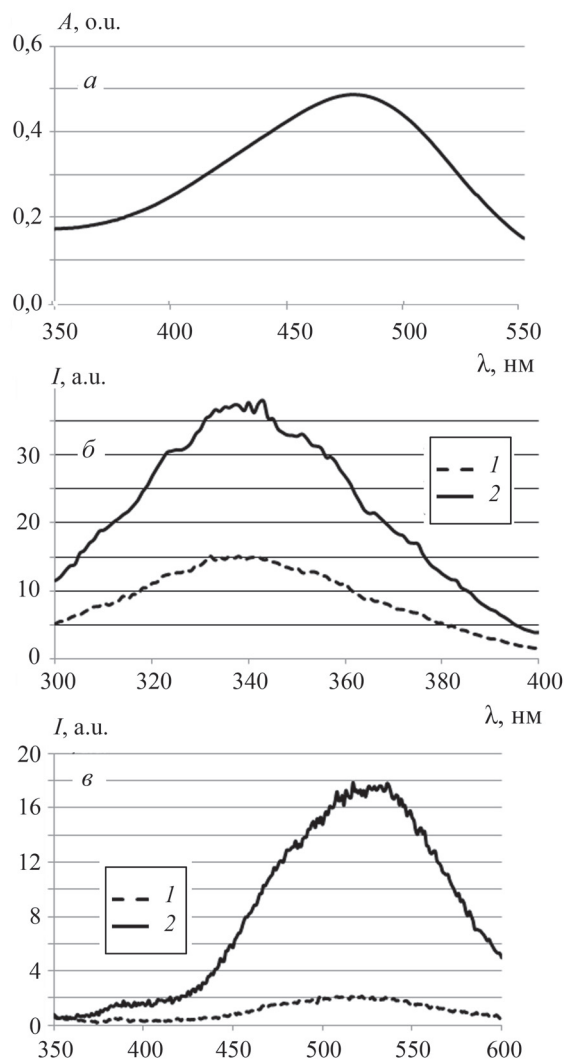


Рис. 4. Спектры: *a* – поглощения, *б* – возбуждения, *в* – эмиссии раствора Dabcyl-Lys-(Gln)₁₀-Pro-Pro-Asp-EDANS до (1) и после (2) гидролиза субтилизинном в Трис-НСl буфере (pH 7,8), содержащем 1% ДМСО

Таблица 1

Спектральные характеристики субстратов, содержащих пару флуорофор/тушитель, а также 5 и 10 глутаминов подряд

Субстрат	$\lambda_{\text{макс.}}^{\text{оптической абсорбции, нм}}$	$\lambda_{\text{макс.}}^{\text{возбуждения флуоресценции (гидролиз/исх.), нм}}$	$\lambda_{\text{макс.}}^{\text{эмиссии флуоресценции (гидролиз/исх.), нм}}$	I_{100}/I_0 (гидролиз/исх.)
Dabcyl-KQ ₅ GD-EDANS	473	335/339	514/514	12,8
Dabcyl-KQ ₁₀ GD-EDANS	473	342/338	500/500	8,05
Dabcyl-KQ ₁₀ PPD-EDANS	477	336/342	517/518	7,9

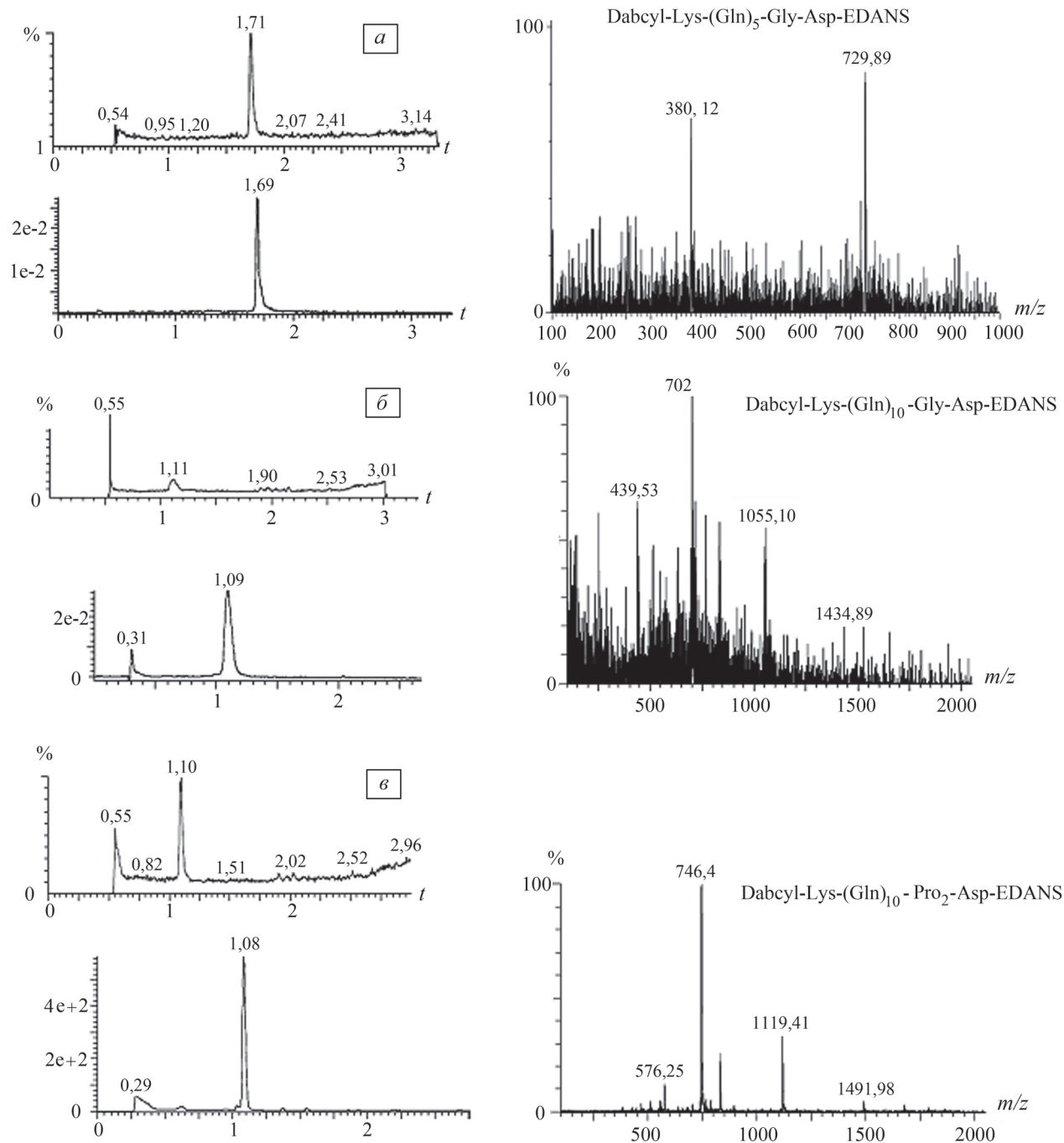


Рис. 5. Хроматограммы (левый столбец) с детекцией по массе (сверху) и по оптическому поглощению (снизу) и масс-спектры основного хроматографического пика (правый столбец) для: *a* – Dabcyl-KQ₅GD-EDANS, *б* – Dabcyl-KQ₁₀GD-EDANS, *в* – Dabcyl-KQ₁₀PPD-EDANS

2. Флуоресценция в исходном субстрате сильно потушена и разгорается при гидролизе, причем отношение интенсивности эмиссии в максимуме спектра после гидролиза к интенсивности при той же длине волны до гидролиза зависит от длины пептида, т.е. от расстояния между флуорофором и тушителем, что подтверждает наличие резонансного переноса энергии.

3. Вид спектра и положение максимумов практически не зависят от состава и длины пептида.

Все данные, полученные нами по спектральным характеристикам субстратов, приведены в табл. 1. На следующем этапе FRET-субстраты были охарактеризованы с помощью хромато-масс-спектрометрии, по результатам которой можно сделать вывод о высокой чистоте субстратов (рис. 5).

Необходимо отметить, что на всех хроматограммах зарегистрировано только по одному пику вещества. Масса, определенная по масс-спектру

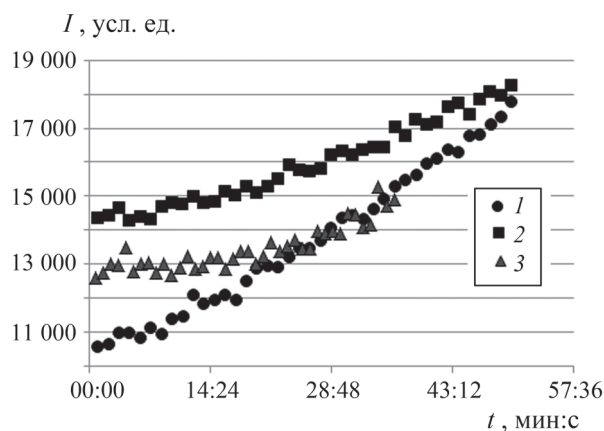


Рис. 6. Зависимость флуоресценции от времени при гидролизе флуорогенных субстратов протеасомой: 1 – Dabcyl-KQ₅GD-EDANS, 2 – Dabcyl-KQ₁₀GD-EDANS, 3 – Dabcyl-KQ₁₀PPD-EDANS

этого пика, соответствует массе исходного соединения с учетом заряда ($Z = 2$).

Кроме того, нами была проверена возможность гидролиза этих трех субстратов протеасомой 20S. Для уменьшения количеств расходуемых веществ использовали 96-луночный непрозрачный черный планшет низкой сорбции («Greiner Bio-One», Германия), флуоресценцию измеряли на микропланшетном ридере «2030 Multilabel Reader Victor X5» («PerkinElmer», США). Примеры характерных кинетических кривых зависимости интенсивности флуоресценции от времени приведены на рис. 6. Замечен свойственный для таких зависимостей начальный участок (лаг-период), который всегда присутствует при гидролизе пептидных субстратов протеасомой. Нужно также подчеркнуть, что за типичное время измерения (1 ч) самопроизвольного гидролиза субстратов не наблюдалось.

Была изучена зависимость скорости гидролиза протеасомой 20S от концентрации для всех трех флуорогенных субстратов. Типичная зависимость приведена на рис. 7. Обработка полученных кинетических данных по гидролизу субстратов при одинаковой концентрации протеасомы позволила

рассчитать кинетические параметры каталитической эффективности (табл. 2).

Как видно из табл. 2, полученные нами соотношения $V_{\text{макс.}}/K_M$ для субстрата Dabcyl-KQ₁₀PPD-EDANS (3) максимальны, причем более приближены к значениям для субстрата Dabcyl-KQ₅GD-EDANS (1), чем для субстрата Dabcyl-KQ₁₀GD-EDANS (2). Как было отмечено ранее, субстрат (1) достаточно хорошо растворим, и максимальная концентрация в буфере, содержащем 1% ДМСО, составляет примерно 150 мкМ, в то время как для субстрата (2) максимальная концентрация в тех же условиях не превышает 50 мкМ, хотя для субстрата (3) она достигает 120 мкМ. Каталитическая эффективность для субстрата (2) значительно ниже, чем для субстрата (3), что тоже, вероятнее всего, связано с низкой растворимостью субстрата (2). По нашим данным можно также оценить константу Михаэлиса для субстрата (1), которая составляет 30–50 мкМ, что хорошо согласуется с константами Михаэлиса, полученными нами [13] и другими авторами [14] ранее для других субстратов протеасомы 20S. На основании полученных результатов можно отметить, что протеасома способна гидролизовать субстраты, содержащие олигоглутаминовые фрагменты, при этом фермент предпочитает более длинные субстраты.

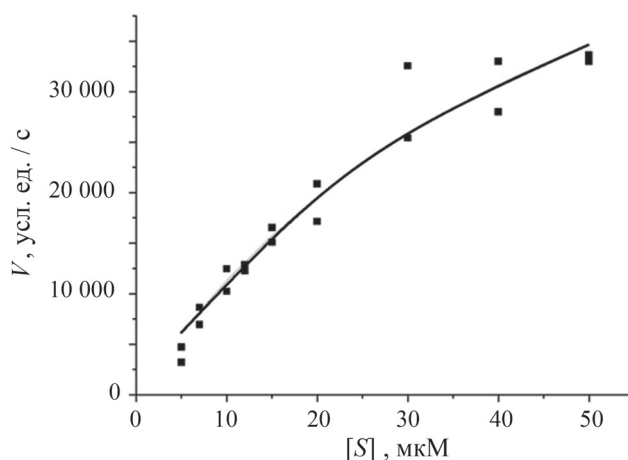


Рис. 7. Зависимость скорости гидролиза флуорогенного субстрата Dabcyl-KQ₅GD-EDANS 20S-протеасомой от концентрации субстрата

Т а б л и ц а 2

Кинетические параметры гидролиза $V_{\text{макс.}}/K_M$ различных субстратов 20S-протеасомой

Субстрат	$V_{\text{макс.}}/K_M \cdot 10^4, \text{ мин}^{-1}$
Dabcyl-KQ ₅ GD-EDANS (1)	4,1±0,4
Dabcyl-KQ ₁₀ GD-EDANS (2)	1,8±0,3
Dabcyl-KQ ₁₀ PPD-EDANS (3)	7,9±0,9

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 16-04-01446.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paulson H.L., Shakkottai V.G., Clark H.B., Orr H.T. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2017. Vol. 18. N 10. P. 613.
2. Jansen A.H.P., Reits E.A.J., Hol E.M. // *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 2014. Vol. 7. P. 73.
3. Pratt G., Rechsteiner M. // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. N 19. P. 12919.
4. Venkatraman P., Wetzel R., Tanaka M., Nukina N., Goldberg A.L. // *Mol. Cell.* 2004. Vol. 14. N 1. P. 95.
5. Jana N.R., Zemskov E.A., Wang Gh., Nukina N. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. Vol. 10. N 10. P. 1049.
6. Juenemann K., Schipper-Krom S., Wiemhoefer A., Kloss A., Sanz Sanz A., Reits E.A. // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288. N 38. P. 27068.
7. Белогуров А.А., Пономаренко Н.А., Говорун В.М., Габибов А.Г., Бачева А.В. // Докл. АН. Сер. Биохимия и биофизика, 2009. Т. 425. № 2. С. 251.
8. Bacheva A.V., Belogurov A.A., Ponomarenko N.A., Knorre V.D., Govorun V.M., Serebryakova M.V., Gabibov A.G. // *Acta Naturae.* 2009. Vol. 1. N 1. P. 84.
9. Бачева А.В., Белогуров А.А., Кузина Е.С., Серебрякова М.В., Пономаренко Н.А., Кнорре В.Д., Говорун В.М., Габибов А.Г. // *Биоорганическая химия.* 2011. Т. 37. № 1. P. 39.
10. 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.
11. 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., Габибов А.Г., Власов В.В. // Докл. АН. Сер. Биохимия и биофизика. 2013. Т. 453. № 4. С. 446.
12. Wang G.T., Matayoshi E., Huffaker H.J., Krafft G.A. // *Tetrahedron Lett.* 1990. Vol. 31. P. 6493.
13. Бачева А.В., Коробкина О.В., Нестерова П.С., Крячков В.А., Габибов А.Г. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2016. Т. 57. № 2. С. 67.
14. Piccinini M., Tazartes O., Mostert M., Musso A., De-Marchi M., Rinaudo M.T. // *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 2000. Vol. 76. N 1. P. 103.

Поступила в редакцию 09.01.18

DESIGN AND CHARACTERISTICS ON NOVEL PROTEASOME SUBSTRATES CONTAINING OLIGOQ SEQUENCE

V.A. Kryachkov, V.N. Tashlitsky, A.V. Bacheva*

(Chemistry Department Lomonosov State University; e-mail: anbach@genebee.msu.ru)

Fluorogenic polyglutamyl-containing peptides with 5 or 10 Gln residues and FRET-pair EDANS (fluorophore) and Dabcyl (quencher) were characterized by spectral and mass-spectrometry techniques. The possibility for 20S proteasome to hydrolyze these modified peptides was examined. Hydrolysis kinetics was studied and catalytic efficiency for the substrates was determined. It was shown that presence of glycine dramatically decreased the solubility of the substrate and also diminished the efficiency of the hydrolysis.

Key words: proteasome, fluorogenic substrates, proteasome activity, polyglutamine diseases.

Сведения об авторах: Крячков Вячеслав Александрович – студент химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (korsatheo@yandex.ru); Ташлицкий Вадим Неронович – сотр. кафедры химии природных соединений химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (tashlitsky@belozersky.msu.ru); Бачева Анна Владимировна – сотр. кафедры химии природных соединений химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (anbach@genebee.msu.ru).