Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

На правах рукописи

Кудряева Анна Анатольевна

Молекулярный механизм узнавания полипептидных субстратов регуляторными субчастицами протеасомы

Специальность 03.01.04 Биохимия

диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

к.х.н., с.н.с. Белогуров А.А.

Москва – 2018

Оглавление

1. СПИСОК	СОКРАЩЕНИЙ	5
2. ВВЕДЕНИ	IE	7
3. ОБЗОР ЛІ	ИТЕРАТУРЫ	11
3.1. Строение	и функции протеасомы	11
3.1.1. 20S m	ротеасома	12
3.1.2. 268 г	ротеасома	15
3.1.3. Альт	ернативные регуляторы	18
3.2. Механизм	ны гидролиза субстратов протеасомой	20
3.2.1. Убин	звитин-зависимый протеолиз	20
3.2.1.1. Cr	істема убиквитинирования	
3.2.1.2. Уб	иквитиновые цепи	23
3.2.1.3. Cr	стема деубиквитинирования	26
3.2.1.4. Pe	цепторы убиквитина	27
3.2.1.4.1.	Протеасомные рецепторы убиквитина	27
3.2.1.4.2.	Непротеасомальные рецепторы убиквитина	28
3.2.1.4.3.	p97/VCP/Cdc48p	30
3.2.1.5. Ин	ициация деградации	32
3.2.1.6 . Пр	эоцессинг	34
3.2.2. Убин	звитин-независимый протеолиз	35
3.3. Основный	й белок миелина (МВР)	
3.3.1. Роль	основного белка миелина и протеасомы в развитии рассеянного склероза	42
4. MATEPU	АЛЫ И МЕТОДЫ	44
4.1. Работа с н	іуклеиновыми кислотами	46
4.1.1. Амплифі	кация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции	46
4.1.2. Рестрики	[ИЯ	47
4.1.3. Лигиров	ание	47
4.1.4. Выделен	ие плазмидной ДНК	47
4.1.5. Электрос	рорез ДНК в агарозном геле	47
4.1.6. Электрос	рорез ДНК в полиакриламидном геле	47
4.1.7. Электроз	люция	48
4.1.8. Секвениј	рование плазмидной ДНК	48
4.1.9. Секвениј	рование на платформе Illumina MiSeq	48
4.1.10. Создани	е генетических конструкций	
4.1.11. Анализ	экспресии генов с помощью ПЦР в реальном времени	49
4.2. Работа с б	јелками	
4.2.1. Дена	турирующий электрофорез в полиакриламидном геле	49
4.2.2. Имм	уноблоттинг	50
4.2.3. Имм	унопреципитация	50
4.2.4. Фран	сционирование протеасомы ультрацентрифугированием	50
4.2.5. Анал	из активности протеасомы <i>in vitro</i>	51
4.2.6. Выде	сление, ацетилирование и деиминирование МВР	51

4.2.7.	Протеолиз белков <i>in vitro</i>	51			
4.2.8.	In vitro трансляция	52			
4.2.9.	Получение и фракционирование лизата ретикулоцитов	52			
4.2.10.	Конъюгация MBP in vitro.	52			
4.3. Хро	матографические процедуры	52			
4.3.1.	Выделение протеасомы.	52			
4.3.2.	Выделение и очистка рекомбинантных белков	53			
4.3.3.	Обращенно-фазовая хроматография	54			
4.3.4.	Метод поверхностного плазмонного резонанса	54			
4.4. Мет	оды работы с бактериями Escherichia coli	55			
4.4.1.	Получение электрокомпетентных клеток	55			
4.4.2.	Получение химически компетентных клеток	55			
4.4.3.	Трансформация клеток Е. coli методом электропорации	55			
4.4.4.	Трансформация клеток Е. coli методом теплового шока	56			
4.4.5.	ПЦР с колоний	56			
4.4.6.	Ночная культура	56			
4.5. Мет	оды работы с эукариотическими клетками линии	57			
4.5.1.	Поддержание в культуре эукариотических клеток линии НЕК.	57			
4.5.2.	Приготовление музея эукариотических клеток	57			
4.5.3.	Выведение линии эукариотических клеток из заморозки	57			
4.5.4.	Трансфекция эукариотических клеток методом липофекции	57			
4.5.5.	Получение культуры астроцитов	58			
4.5.6.	Сортировка клеток с помощью проточной цитометрии	58			
4.6. Paőo	эта с мышами	59			
4.6.1.	Определение максимальной толерантной дозы 81і-специфического пептидилальдегида	ı			
IPSI-001	59				
5 DEON		<u> </u>			
5. PE3y	ЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	60			
5.1. Исс.	ледование взаимосвязи структуры полиубиквитиновой цепи и эффективности деградац	ии			
протеасомн	ых субстратов	60			
5.1.1.	Подбор оптимальных условий для внутриклеточного энзиматического мечения белког	3			
резоруфи	IHOM	61			
5.1.2.	Изучение внутриклеточного гидролиза белков протеасомой в физиологических услови	ЯХ			
с исполь:	зованием методики PRIME	63			
5.1.3.	Анализ внутриклеточной деградации белков с применением комбинации методов РКП	ME			
и проточ	ной цитометрии	65			
5.1.4.	Определение времени полужизни молекулы убиквитина в клетках млекопитающих	68			
5.1.5.	Определение средней длины полиубиквитиновой цепи в состоянии динамического				
равновес	ия	/1			
5.1.6.	Анализ стабильности полиубиквитиновых цепей различного типа ветвления	/4			
5.1.7.	изучение особенностеи моноубиквитинирования гистона Н2А	/6			
5.2. Изу	чение молекулярного механизма убиквитин-независимого гидролиза основного белка				
миелина пр	ютеасомой	79			
5.2.1.	5.2.1. Исследование необходимости убиквитинирования МВР в процессе его гидролиза				

протеасо	мой	79
5.2.2.	Роль заряда в убиквитин-независимом гидролизе МВР протеасомой	83
5.2.3.	Локализация протеасомного дегрона в составе последовательности МВР	84

5.2.4.	Создание искусственных убиквитин-независимых дегронов на осное	ве последовательности
MBP	89	
5.2.5.	Поиск субъединицы в составе регуляторных элементов протеасомы,	осуществляющей
функі	цию рецептора оснОвных субстратов	96
5.2.6.	Анализ изменения состава регуляторных комплексов протеасомы в	условиях протекания
нейро	одегенеративных процессов	
5.3. I	Подходы к избирательному контролю процессинга основного белка миел	ина протеасомой 105
5.5.1. UMMV	Апроозция ри-специфического пептидилальдегида исследот в качес	тве ингиоитора 105
532	попротсасомы. Влидние леиминирования MRP пептили доргининлеиминазой (РАD)	на его силропиз
проте	еасомой.	
6. 3A	КЛЮЧЕНИЕ	110
7 DL		110
/. DD	ыводы	112
8. CI	ІИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	

1. Список сокращений

ATP - аденозинтрифосфат (adenosine triphosphate)

BFP - синий флуоресцентный белок (blue fluorescent protein)

BSA – бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)

CHX – циклогексимид (cycloheximide)

DHFR - дигидрофолатредуктаза (dihydrofolate reductase)

DUB - деубиквитинирующие ферменты (deubiquitinating enzymes)

EAE – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (experimental autoimmune encephalomyelitis)

FACS - флуоресцентно-активированная сортировка клеток (fluorescence-activated cell sorting)

GA – глатирамера ацетат (glatiramer acetate)

HPLC (ВЭЖХ) – высокоэффективная жидкостная хроматография (High-performance liquid chromatography)

IFN – интерферон (interferon)

IgG – иммуноглобулины класса G

IL – интерлейкин (interleukin)

IPTG - изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)

IRES – сайт внутренней посадки рибосомы (internal ribosome entry site)

LpIA – лигаза альфа-липоевой кислоты (lipoic acid ligase)

MBP – основный белок миелина (myelin basic protein)

МНС – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)

MOG – миелин-олигодендроцитарный гликопротеин (myelin oligodendrocyte glycoprotein)

MRM – мониторинг множественных реакций (multiple reaction monitoring)

ODC – орнитиндекарбоксилаза (ornithine decarboxylase)

PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline)

PLP – протеолипидный белок (proteolipid protein)

PRIME – ферментативное присоединение зонда (PRobe Incorporation Mediated by Enzymes)

Res – резоруфин (resorufin)

SDS – додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate)

siRNA – малая интерферирующая РНК (small interfering RNA)

SPR – поверхностный плазмонный резонанс (surface plasmon resonance)

TBS – солевой буфер на основе трис(гидроксиметил)аминометана (tris-buffered saline)

Ub – убиквитин (ubiquitin)

WB – иммуноблоттинг (western blotting)

ZsGreen – зеленый флуоресцетный белок (Green Fluorescent Protein)

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер (blood-brain barrier)

ДМСО – диметилсульфоксид (dimethyl sulfoxide)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота (deoxyribonucleic acid)

ИП - иммунопреципитация (immunoprecipitation)

кДа – килодальтон (kilodalton)

ПААГ – полиакриламидный гель (polyacrylamide gel)

ПЦР – полимеразная цепная реакция (polymerase chain reaction)

PC – рассеянный склероз (multiple sclerosis)

ЦНС – центральная нервная система (central nervous system)

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат (Ethylenediaminetetraacetic acid)

2. Введение

Актуальность темы. Протеасома представляет собой мультисубъединичный протеиназный комплекс, ответственный за деградацию большинства внутриклеточных белков. В дополнение к деградации завершивших свою функцию и поврежденных белков, протеасома регулирует многие важные клеточные процессы посредством контролируемой деградации белков, например, факторов транскрипции, регуляторов клеточного цикла и других жизненно важных ферментов. Эукариотические протеасомы имеют три каталитические субъединицы: β 1, β 2 и β 5, каждая из которых имеет свою субстратную специфичность. Кроме того, известно, что разнообразные типы клеток содержат варианты протеасом с различными профилями активности и специфичности, функции этих пулов протеасом до сих пор изучены не полностью. Многие ингибиторы протеолитической активности протеасомы в настоящий момент применяются как лекарственные средства для лечения гематологических злокачественных новообразований, также активно изучается возможность их применения для терапии других заболеваний, в том числе аутоиммунной природы. В связи с этим современная наука нуждается в инструментах, которые позволили бы осуществлять мониторинг протеасомной активности непосредственно в живых клетках и тканях.

Сигналом протеасомной деградации является цепь из молекул убиквитина, ковалентно связанная с белком-мишенью. Специфичность сигнала определяется длиной и структурой полиубиквитиновых цепей, которые распознаются рецепторами в составе регуляторных субчастиц протеасомы. На настоящий момент очевидно, что система убиквитин-опосредованной модификации является неоднозначной, так как известны как минимум семь функциональных лизинов, по которым может происходить рост полиубиквитиновой цепи. После связывания полипептидного субстрата с протеасомой убиквитиновой происходит посредством метки инициация его гидролиза В неупорядоченной области субстрата, которое само по себе является одним из компонентов сигнала деградации.

Кроме убиквитин-зависимой деградации, существует также убиквитин-независимая деградация, в этом случает сигналом для протеолиза является либо последовательность внутри самого белка, либо некоторая вспомогательная молекула. На настоящий момент двух десятков белков, гидролизующихся без предварительной известно около убиквитином. протоонкобелки модификации Например, некоторые И белкиубиквитин-независимыми онкосупрессоры являются субстратами протеасомы, видоизмененная деградация которых может иметь туморогенный эффект. Идентификация

убиквитин-независимых механизмов деградации свидетельствует о множественности катаболических путей белковых субстратов.

В лаборатории биокатализа ИБХ РАН ранее были получены предварительные данные, свидетельствующие о том, что один из основных аутоантигенов при рассеянном склерозе, основный белок миелина, способен гидролизоваться по убиквитин-независимому пути. Основной белок миелина является одним из главных компонентов миелиновой оболочки аксонов нейронов, обладающий аномально высоким положительным зарядом, что предположительно может является причиной его убиквитин-независимого гидролиза. По-видимому, протеасомальный гидролиз основного белка миелина является одной из ключевых стадий развития рассеянного склероза, поэтому изучение молекулярного механизма его деградации представляется важным и интересным как с фундаментальной, так и клинической точки зрения.

Степень разработанности темы. Несмотря на продолжительную и насыщенную историю изучения убиквитин-протеасомной системы до сих пор нет чёткого понимания механизмов, которые лежат в основе ассоциации субстратов с протеасомой. Таким образом, ряд ключевых вопросов, таких как длина и состав полиубиквитино-вой цепи, круговорот и деградация самого убиквитина, а также структурные детер-минанты, позволяющие субстратам напрямую взаимодействовать с протеасомой, до сих пор остаются нерешенными.

Целью диссертационной работы являлось изучение алгоритмов построения полиубиквитиновых цепей, а также проведение детализации механизма убиквитиннезависимого гидролиза на примере основного белка миелина. Достижение поставленной цели включало решение следующих **задач**:

– Определение времени полужизни убиквитина и полиубиквитиновых цепей, средней длины полиубиквитиновой цепи *in vivo* с помощью методики специфического ферментативного внутриклеточного мечения белков низкомолекулярными флуорофорами (PRIME).

 Анализ субстратной специфичности протеасомы к полиубиквитиновым цепям разного типа ветвления.

 Определение детального механизма убиквитин-независимого гидролиза основного белка миелина (MBP) протеасомой.

 Разработка подходов направленного замедления внутриклеточного протеасомопосредованного метаболизма MBP.

Научная новизна. В настоящей работе впервые было корректно определено время полужизни убиквитина, а также среднее количество молекул убиквитина, конъюгированное с субстратами протеасомы. Проведена субстратной оценка специфичности протеасомы к полиубиквитиновым цепям различного типа ветвления, и показано, что в среднем от одной до двух молекул убиквитина утилизируется совместно с белком-мишенью. Кроме того, был подтвержден факт убиквитин-независимого протеолиза аутоантигенного белка, основного белка миелина, и установлен механизм данного теоретически предсказана экспериментально процесса. Была И подтверждена аминокислотная последовательность миелин-подобного дегрона, способного придавать полипептидам способность подвергаться гидролизу протеасомой без участия убиквитина.

Научно-практическая ценность. Разработаны подходы к направленному замедлению внутриклеточного протеасом-опосредованного метаболизма MBP с помощью специфических ингибиторов иммунопротеасомы. Диссертационная работа вносит существенный вклад в прояснение механизмов работы такого сложного протеолитического комплекса как протеасома, что в дальнейшем может быть использовано для создания лекарственных препаратов, направленных на тканеспецифичное и избирательное подавление протеолитической активности протеасомы.

Положения, выносимые на защиту.

 оптимизация методики специфического ферментативного внутриклеточного мечения белков низкомолекулярными флуорофорами (PRIME) для изучения метаболизма внутриклеточных белков.

- закономерности метаболизма убиквитина в физиологических условиях.

 определение субстратной специфичности протеасомы к полиубиквитиновым цепям различной длины и типа ветвления.

- детализация механизма убиквитин-независимого гидролиза MBP.

 новые подходы направленного замедления внутриклеточного протеасомопосредованного метаболизма MBP.

Личный вклад диссертанта заключался в планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций.

Апробация работы. Результаты диссертации были представлены на следующих научных мероприятиях: 38-ом конгрессе FEBS «Mechanisms in Biology» (Санкт-Петербург, 2013); XXVI Зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физикохимической биологии и биотехнологии", (Москва, 2014); конференции «Нейрохимические

механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург–Колтуши, 2014); VII Всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция» (Петрозаводск, 2014); 40-ом конгрессе FEBS «The Biochemical Basis of Life» (Берлин, Германия, 2015); XXVIII Зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", (Москва, 2016); V Съезде биохимиков России (Сочи-Дагомыс, 2016); XXIX Зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физикохимической биологии и биотехнологии", (Москва, 2017); II Всероссийской конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, 2017); 42-ом конгрессе FEBS «From Molecules to Cells» (Иерусалим, Израиль, 2017).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в российских и иностранных журналах и 10 тезисов конференций.

3. Обзор литературы

3.1. Строение и функции протеасомы

Концентрация клеточных белков обуславливается скоростью их синтеза и деградации. В цитоплазме и ядре эукариотических клеток подавляющее большинство белков гидролизуется протеасомой, являющейся частью убиквитин-протеасомной системы. Протеасома – многосубъединичный белковой комплекс массой около 2.5 МДа – осуществляет контроль за концентрацией более сотни регуляторных белков, а также разрушает неправильно фолдированные и поврежденные белки [1]. Протеасомы присутствуют в клетках всех эукариот, а также у некоторых видов бактерий, что подтверждает их высокую значимость для нормальной жизнедеятельности клеток [2]. Подобно тому, как синтез белков регулируется на различных уровнях, не менее сложная система существует для контроля гидролиза белков протеасомой. Именно поэтому протеасома невероятно селективна, принципиально она скорее всего способна гидролизовать любой клеточный белок, но в то же время исключается возможность случайной деградации остальной части клеточного протеома.

Протеасомный комплекс функционально и структурно разделен на две части. Название «протеасома» относится к разным типам частиц различной молекулярной массы. 20S протеасома, являющаяся каталитическим ядром протеасомы, способна связываться с множеством регуляторных субчастиц, таких как 19S регулятор, РА28αβ, РА28γ, РА200, ЕМС29, РІЗ1 и другими, тем самым образуя различные формы протеасомы, известные как 26S протеасома (19S - 20S), 30S протеасома (19S - 20S - 19S), гибридная протеасома (19S -20S - PA28), PA28-протеасома (PA28 - 20S - PA28) и другие [3]. Считается, что «свободная» 20S протеасома не может разрушать структурированные белки, только небольшие пептиды и развернутые белковые молекулы [4]. При оценке относительного содержания всех протеасомных комплексов в клетках линии HeLa с помощью иммунопреципитации и иммуноблоттинга было установлено, что, по-видимому, около 40 % общего количества 20S протеасом находятся в «свободной» форме, оставшаяся часть связана с регуляторами РА28 и 19S в различных комбинациях [5]. Более высокий уровень «свободной» 20S протеасомы был обнаружен в клетках U947, обработанных у-интерфероном [6]. С помощью электронной криотомографии были собраны сведения о количествах 26S и 30S протеасом в нейронах, в которых регулятор РА28 отсутствует, и обнаружено, что четверть всех протеасом находится в форме 30S, а оставшаяся часть в форме 26S [7]. Учитывая специфические функции многих типов клеток в организме млекопитающих, весьма

вероятно, что каждый тип клеток содержит свой индивидуальный пул протеасомных комплексов, в том числе и потому, что не все регуляторые субчастицы экспрессируются во всех типах клеток [8]. Недавно был обнаружен 20S протеасомный комплекс, ассоциированный с плазматической мембраной нейронов с помощью GPM6 гликопротеинов [9]. Данный комплекс может деградировать внутриклеточные белки в биологически активные внеклеточные пептиды, которые индуцируют передачу кальция через NMDA-рецепторы.



Рисунок 1. Протеасомы с различными регуляторными субчастицами. Адаптировано из [10].

3.1.1. 20S протеасома

Исходя из данных рентгеноструктурного анализа, 20S протеасома состоит из четырех гептамерных колец, составляющих полый цилиндр, длина которого составляет примерно 15-17 нм, а диаметр 11-12 нм [11]. В состав каждого кольца входит 7 субъединиц, массой от 20 до 35 кДа, а общая масса комплекса составляет приблизительно 750 кДа. Внешние кольца состоят из субъединиц α-типа, а внутренние - из субъединиц β-типа. Четыре кольца, собранных в стопку, образуют три внутренние полости диаметром приблизительно 5 нм [12]. Объем центральной протеолитической полости составляет примерно 84 нм³ и в нее может поместиться до 70 кДа белка, но доступ в нее ограничен малой шириной входных отверстий [13]. Присутствие двух копий 14 различных субъединиц является общей особенностью всех эукариотических 20S протеасом.

Протеасомы более простые по составу, но с одинаковой базовой архитектурой (один тип α и один тип β -субъединиц) также обнаружены в археях (например, *Thermoplasma acidophilum*) и в некоторых бактериях (например, *Rhodococcus erythropolis, M. tuberculosis*) [14].



Рисунок 2. Строение дрожжевой 20S протеасомы. (А) Указаны отдельные субъединицы. Альтернативные аналоги каталитических субъединиц протеасомы. (Б) Дрожжевая 20S протеасома, изображенная в разрезе, вид сбоку. Область вокруг активного сайта обозначена рамкой. Закрытый вход в канал деградации окрашен в серый цвет. (В) Дрожжевая 20S протеасома, вид сверху. Закрытый вход в канал деградации обозначен кружком. Адаптировано из [15].

В центральной полости 20S протеасомного комплекса расположено шесть каталитических центров, образованных β1-, β2- и β5-субъединицами. Таким образом, протеасома обладает тремя основными типами каталитической активности: она способна расщеплять белки со специфичностью по типу трипсина (расщепление после положительно заряженных аминокислотных остатков), по типу химотрипсина (после ароматических аминокислотных остатков), по типу каспазы (после отрицательно заряженных остатков). Обладая еще некоторыми дополнительными типами активности, протеасома может разрушать полипептидную цепь практически между любыми аминокислотными остатками.

Отличительной особенностью крупных внутриклеточных протеаз, таких как протеасома или трипептидил-пептидаза II (ТРРІІ), является расположение активных центров во внутренних полостях, создаваемых субъединицами комплекса (компартментализация). Изоляция активных сайтов от клеточной среды защищает клеточные белки от нежелательной деградации [16]. Перед сборкой протеасомы остатки каталитического N-концевого треонина в свободных β-субъединицах защищены Nконцевыми пропептидами, таким образом делая их неактивными. Эти пептиды отщепляются при сборке 20S протеасомы, при этом происходит высвобождение остатков треонина активных центров протеасомы и одновременное отделение их от клеточной среды [17]. Кроме того, вход в протеолитическую полость 20S протеасомы блокируют асубъединицы своими N-концевыми гидрофобными участками, что препятствует

случайному гидролизу белков. Результаты использования атомно-силовой микроскопии указывают на то, что ворота в каталитическую полость находятся в динамическом равновесии между открытым и закрытым состоянием, которое смещено в сторону последнего [18]. Таким образом, пространственная конфигурация 20S протеасомы и малый размер отверстий, ведущих в каталитическую полость, препятствуют деградации свернутых белков без предварительного разворачивания.

Тем не менее, α -субъединицы способны взаимодействовать с регуляторными белковыми комплексами: 19S регуляторным комплексом, активаторами PA28 и PA200, которые индуцируют конформационные изменения α -субъединиц, что приводит к открытию входа в каталитическую полость [19]. Известны работы по активации 20S протеасомы низкомолекулярными соединениями [20]. Кроме того, делеция Nтерминальной части субъединицы α 3 (α 3 Δ N) приводит к активации протеасомы в клетках млекопитающих. Так как протеасома является основным механизмом деградации, который регулирует уровень токсичных, подверженных агрегации белков [21], увеличение активности протеасомы благодаря открытому входу в протеолитическую полость может способствовать подавлению токсичности и связанной с этим патофизиологии протеотоксических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера [22]. Так, клетки, экспрессирующие α 3 Δ N-протеасомы имеют более низкий уровень тау-белков и его агрегатов [23].

Интересно, что кроме протеолитической активности 20S протеасома (особенно субъединица α5) проявляет РНКазную активность в присутствии двухвалентных катионов, чего не требуется для протеолитической активности [24]. Интересно, что активность α5-РНКазы сильно коррелирует со степенью фосфорилирования субъединиц α6 и α7. Более того, активность α5-РНКазы заметно возрастает при эритроидной дифференцировке и запрограммированной гибели клеток [24]. Известно также, что большинство α-субъединиц (кроме α3) проявляют РНКазную активность против мРНК р53 *in vitro* [25].

У млекопитающих было обнаружено пять дополнительных субъединиц β 1i, β 2i, β 5i, β 5t, а также α 4s [26]. Гены, кодирующие субъединицы β 1i и β 5i, находятся в регионе расположения генов МНС II класса на 6 хромосоме и их транскрипция индуцируется провоспалительными цитокинами, например, под воздействием γ -интерферона γ INF [27]. Субъединицы β 1i, β 2i и β 5i стабильно экспрессируются в клетках селезенки и в профессиональных антигенпрезентирующих гомопоэтических клетках, благодаря непрерывной активации γ -интерферон-индуцибельного промотора генов β 1i и β 5i посредством связывания димера нефосфорилированного транскрипционного фактора Stat-

1 с белком IRF1 [28]. Данные субъединицы заменяют конститутивные субъединицы 20S протеасомы, тем самым меняя ее протеолитическую специфичность. Протеасома с субъединицами β1i, β2i и β5i называется иммунопротеасомой, считается, что она расщепляет субстраты, пептиды-продукты деградации которых обладают более высокой аффинностью к молекулам главного комплекса гистосовместимости I класса (МНС I), что в свою очередь способствует более эффективной презентации антигенных пептидов цитотоксическим Т-лимфоцитам [29]. Во многих неиммунных клетках экспрессия иммуносубъединиц зависит от интерферонов, TNFα или липосохаридов [30], но их образование также может быть вызвано менее специфическими физиологическими триггерами – старением и стресс-факторами окружающей среды, такими как, например, тепловой шок. Поэтому, помимо генерации эпитопов для MHC I класса, иммунопротеасомы также обладают и другими функциями, например, быстрое устранение поврежденных белков после окислительного стресса, кроме того, они участвуют в пролиферации клеток и в производстве цитокинов [31]. Таким образом, иммунопротеасомы могут как усугублять, так и ослаблять течение различных заболеваний, например, вирусных инфекций, колита, миокардита и диабета.

Хотя γ -интерферон-индуцибельные α -субъединицы протеасомы неизвестны, существует альтернативная α 4 субъединица, обозначаемая α 4s, поскольку она локализуется исключительно в мужских половых клетках после их дифференцировки в сперматоциты [32]. Также была обнаружена β 5t субъединица, экспрессирующаяся исключительно в кортикальных эпителиальных клетках тимуса. Эта субъединица заменяет субъединицу β 5i, что приводит к конфигурации β 1i- β 2i- β 5t, содержащихся в активных сайтах β -субъединиц. Протеасому, содержащую данный вид субъединиц, называют тимопротеасомой. Механизм регуляции экспресии β 5t субъединицы до сих пор неизвестен [33]. Известно, что тимопротеасомы обладают меньшей химотрипсиноподобной активностью по сравнению со стандартными и иммунопротеасомами из-за гидрофильной природы кармана связывания субстрата в β 5t [34], также они отличаются восприимчивостью к ингибиторам протеасомы [35]. Считается, что тимопротесома увеличивает репертуар пептидов для позитивной селекции Т-клеток в процессе их развития в тимусе [36].

3.1.2. 26S протеасома

26S протеасома является самым крупным и самым сложным представителем древнего суперсемейства АТФ-зависимых протеаз [37]. Эти протеазы характеризуются наличием ААА-АТФазного кольца, ответственного за разворачивание субстрата и

транслокацию его через узкий канал во внутреннюю протеолитическую камеру. АТФазное кольцо преобразует химическую энергию гидролиза АТФ в механическую силу для разворачивания субстрата. Чаще всего 26S или 30S протеасомой называют 20S коровую протеасому, которая содержит с одной или двух сторон РА700 (Protein Activator)-регуляторные комплексы (или 19S регуляторные частицы), соответственно, которые кроме АТФазного кольца, имеют в своем составе множество дополнительных специализированных субъединиц.



Рисунок 3. Строение дрожжевой 26S протеасомы, установленное с помощью одночастичной криоэлектронной микроскопии (PDB: 3JCP). В 20S коровый комплекс входят 4 кольца, состоящие из 7 α- и β-субъединиц. 19S регуляторная субчастица состоит из «основания» с тремя Rpn субъединицами, а также шестью АТФазными субъединицами, и «крышки», включающей девять Rpn субъединиц. Адаптировано из [38].

Регуляторные частицы отвечают за связывание, деубиквитинирование, разворачивание и перенос протеасомных субстратов в каталитическую полость, а также за открытие канала в кольце α-субъединиц. Таким образом, 19S субчастица функционирует как регулируемый «привратник» для субстратов. Она содержит по крайней мере 19 субъединиц общей массой около 1 МДа. 19S регуляторный комплекс можно разделить на два подкомплекса, называемых «крышка» (lid) и «основание» (base). «Основание» состоит из 9 субъединиц: 6 из них гомологичные АТФазы Rpt1-6 (regulatory particle triple A protein) и 3 не АТФазные субъединицы Rpn1, Rpn2 и Rpn13 (regulatory particle non-ATPase). Rpt1-6 образуют гетерогексамерное кольцо, которое непосредственно контактирует с кольцом αсубъединиц 20S протеасомы [39]. Rpn1 и Rpn2 являются двумя крупнейшими

структурными субъединицами протеасомы. Центральные части этих субъединиц состоят из 11 а-спиральных повторов, на которых, как полагают, располагаются как на каркасе субъединицы «крышки», а также субстраты. Субъединица Rpn13, а также Rpn10 непосредственно могут связываться с убиквитином, таким образом, оба белка являются рецепторами убиквитинированных субстратов [40], [41]. Последние исследования также причисляют к субъединицам, способным связывать убиквитин, и Rpn1 [42]. В дополнение к стабильным протеасомным субъединицам с 19S субчастицей ассоциировано большое число белков, принимающих участие в процессе деградации опосредованно. Некоторые из них (Rad23, Dsk2, Ddi1 в дрожжах) содержат убиквитин-подобные (ubiquitin-like, UBL) и убиквитин-связывающие (ubiquitin-associated, UBA) домены и выступают в качестве альтернативных убиквитиновых рецепторов. «Крышка» состоит из 9 различных Rpn субъединиц Rpn3, Rpn5-9, 11, 12 и Sem1 (Rpn15). Субъединица Rpn11 является деубиквитинирующим ферментом в составе протеасомы [43]. «Крышка» структурно схожа с СОР9 сигналосомой и eIF3 комплексами инициаторных факторов трансляции [44], она играет важную роль в стабилизации всего 26S протеасомного комплекса, а также осуществляет интеграцию и координацию работы разных частей протеасомы посредством аллостерической регуляции [45]. Так, связывание убиквитинированного субстрата вызывает множество структурных преобразований в 19S регуляторном комплексе. Самыми заметными изменениями, наблюдаемыми с помощью криоэлектронной микроскопии, является расширение канала, проходящего через АТФазное кольцо, а также его выравнивание со входом в 20S протеасомный комплекс. Подобные структурные изменения наблюдаются также при связывании негидролизуемого аналога нуклеозидтрифосфата АТРуЅ, который «замораживает» ферментативный комплекс в состоянии, в которое временно переходит протеасома при связывании АТФ [46]. Биохимические и структурные исследования помогли установить, что открытие входа в канал, ведущего в протеолитическую полость 20S протеасомы, происходит, когда С-концевые HbYX мотивы трех АТФазных субъединиц (Rpt2, Rpt3 и Rpt5) 19S регуляторного комплекса связываются с лизинами внешнего кольца 20S протеасомы, образованного α-субъединицами, в Это взаимодействие происходит при связывании межсубъединичных карманах. аденозинтрифосфата субъединицами АТФазного кольца и запускает перемещение Nконцов α-субъединиц, что открывает вход в протеолитическую камеру для субстрата. Сконцевые части оставшихся трех АТФазных субъединиц, не имеющих HbYX мотивов, поддерживают ассоциацию между регуляторной субчастицей и коровыми субъединицами 20S протеасомы.

Количество 20S протеасом в клетке может увеличиваться путем разборки 26S протеасомного комплекса на ее компоненты – 20S протеасому и регулятор 19S. Несколько исследований показали, что такое действительно происходит после окислительного стресса, когда существует необходимость в повышении эффективности деградации большого количества поврежденных белков [47]. По-видимому, в процессе разборки участвуют различные белки. Было обнаружено, что в клетках млекопитающих шаперон Hsp70 имеет важное значение в стабилизации регулятора 19S после его диссоциации от 20S протеасомы, а также для повторной сборки функциональных 26S протеасом после устранения окислительного стресса [48]. Было также установлено, что низкий клеточный уровень Hsp90 вызывает практически полную разборку дрожжевой 26S протеасомы [44].

Недавно было показано, что уровень 26S и 20S протеасомных комплексов также зависит от метаболического состояния клетки. Например, низкое соотношение кофакторов NADH/NAD⁺ дестабилизирует 26S протеасомный комплекс, приводя к появлению «свободных» 20S протеасом [49]. Аналогичным образом, на соотношении 26S и 20S протеасом в клетке сказывается уменьшение количества АТФ [50].

3.1.3. Альтернативные регуляторы

Регулятор РА28 (также называемый REG или 11S) представляет собой гептамерный кольцеобразный комплекс массой 180 кДа. Этот регулятор способен АТФ-независимым образом присоединяться с одной или двух сторон к 20S протеасоме и существенно повышать ее способность гидролизовать короткие пептидные субстраты, но не белки или белки, конъюгированные с убиквитином. Хотя в последнее время появляется все больше работ, в которых утверждается, что 20S протеасома с регуляторами PA28 способна разрушать и белки. Кроме того, РА28 может связаться со свободным концом ассиметричной 26S протеасомы (19S-20S) с образованием «гибридной» протеасомы (19S-20S-PA28) [5], которая гидролизует три- и тетра- пептиды с более высокой скоростью, чем 26S протеасома [51]. У млекопитающих PA28 состоит из двух гомологичных субъединиц РА28α (REGα или PSME1) и РА28β (REGβ или PSME2), экспрессия обеих индуцируется γинтерфероном [52]. Профессиональные антигенпрезентирующие клетки в норме экспрессируют повышенное количество РА28αβ, что согласуется с возможным участием этого комплекса в презентации антигенов на молекулах МНС І класса [53]. Было обнаружено, что РА28α или РА28αβ способствует презентации некоторых, но не всех антигенов на МНС I класса. Кроме того, клетки, у которых отсутствует этот регуляторный

комплекс, обладают меньшей способностью презентировать определенные антигены. Согласованная экспрессия РА28 α и РА28 β , а также протеасомных иммуносубъединиц β 1i, β 2i и β 5i, после индукции γ INF приводит к образованию иммунопротеасом РА28 $\alpha\beta$ -20S *in vitro* и *in vivo*, несмотря на это регулятор РА28 $\alpha\beta$ также был обнаружен в клетках, тканях и органах, в которых отсутствуют иммунопротеасомы, таких как эритроциты и мышцы. Также известна третья субъединица РА28 γ (REG γ , PSME3 или Ki антиген), образующая гомогептамер, которая локализована в ядре, она не является интерферон-индуцибельной и не участвует в презентации антигенов на молекулах MHC I класса.

Еще одним альтернативным регулятором является частица РА200, которая представляет собой высококонсервативный ассиметричный белок массой 250 кДа, локализованный в ядре, и может присоединяться к одному или обоим концам коровой 20S протеасомы. *In vitro* было показано, что протеасома с этим регулятором может гидролизовать только короткие пептиды или развернутые белки. Считается, что РА200 способствует поддержанию белкового гомеостаза в митохондриях [54], эта гипотеза подтверждается данными, полученными в экспериментах на нокаутных по РА200 мышах. Мужские особи таких мышей оказались бесплодными, исследования показали, что данная патология была вызвана нарушением сперматогенеза [55]. Дальнейшее изучение показало, что данный регулятор также способствует стабильности хромосом [56], он участвует в АТФ- и убиквитин-независимой деградации ацетилированных гистонов в соматических клетках [57]. Таким образом, учитывая нарушение нормального сперматогенеза у мышей, нокаутных по РА200, эти данные свидетельствуют, что РА200-опосредованный гидролиз гистонов является важной составляющей для правильного формирования сперматозоидов.

PI31, пролин-богатый белок, впервые был описан как ингибитор протеасомной активности, он конкурировал с регуляторной субчастицей 19S (или PA28) за связывание с 20S протеасомой [58]. Исследование, проведенное в *D. melanogaster*, показало, что PI31, в комплексе с E3 убиквитин-лигазой Nutcracker, регулирует протеасомные функции, оказывая положительное влияние на активность 26S, и отрицательно влияет на активность свободной 20S протеасомы.

Ест29 представляет собой большой белок массой 205 кДа, способный связываться с 20S протеасомой и регулирующий ее функцию по нескольким механизмам. Было показано непосредственное ингибирование протеасомной активности в дрожжах, которое частично осуществлялось путем ингибирования АТФазной активности 19S регуляторной субчастицы [59]. С другой стороны, также было описано положительное влияние Ест29 на активность дрожжевой протеасомы. Было обнаружено, что Ест29 способствует сборке

протеасом, поскольку стабилизирует промежуточное соединение 20S-19S, в котором созревание 20S протеасомного комплекса задерживается из-за временной нехватки конкретных β-субъединиц [60]. Другие исследования показали, что Есm29 связывается с 19S в ответ на окислительный стресс и вызывает разборку 26S протеасомы [61]. Было высказано предположение, что Есm29-зависимая разборка 26S протеасомного комплекса служит для увеличения количества 20S, что позволяет клеткам справляться с большим количеством окисленных белков. У млекопитающих белок Есm29 (кодируемый геном KIAA0368) также способствует диссоциации протеасом при окислительном стрессе и ассоциируется с различными молекулярными моторами и эндосомальными компонентами. Эта ассоциация может быть связана с его способностью перемещать 26S протеасомы в различные клеточные области, такие как эндоплазматический ретикулум и центросома.

3.2. Механизмы гидролиза субстратов протеасомой

Способность белка быть гидролизованным протеасомой обуславливается наличием сигнала деградации. В наиболее общем случае сигнал деградации включает в себя два компонента: 1) участок, который распознается протеасомой и связывается с ней и 2) участок инициации разворачивания и дальнейшей транслокации субстрата в каталитическую полость 20S протеасомного комплекса [62]. У подавляющего большинства субстратов в качестве участка распознавания выступает полиубиквитиновая цепь.

3.2.1. Убиквитин-зависимый протеолиз

3.2.1.1. Система убиквитинирования

Убиквитин – ~8,5 кДа сигнальный белок, присутствующий во всех эукариотических клетках. Посттрансляционная модификация белков убиквитином – убиквитинирование – регулирует большое количество клеточных процессов, таких как деградация, сортировка, локализация, активация и репрессия синтеза белков. Известно до 14 различных семейств убиквитина и убиквитин-подобных белков, различающихся по аминокислотной последовательности, но имеющих характерную пространственную структуру.

Убиквитин прикрепляется к белку-мишени с помощью последовательных действий сложной системы ферментов. Ковалентное присоединение убиквитина к субстратам осуществляется при помощи системы, состоящей из трех ферментов – E1 (activating enzyme), E2 (conjugating enzyme) и убиквитин-лигазы E3. Фермент E1 активирует убиквитин в процессе двухстадийной АТФ-зависимой реакции, образуя высокоэнергетический E1-убиквитин тиоэфирный комплекс. Далее активированный

убиквитин переносится на убиквитин-конъюгирующий фермент E2, который либо катализирует прикрепление убиквитина к субстрату при участии E3 лигазы, имеющей RING домен, либо переносит активированный убиквитин непосредственно на E3-лигазу с НЕСТ доменом, образуя высокоэнергетический E3-убиквитин переходный комплекс. Убиквитин-лигазы включают в себя ферменты двух типов. Имеющие RING домен E3-лигазы связываются с E2 и с субстратом, сближая их на расстояние, достаточное для переноса убиквитина на субстрат, катализируемого ферментом E2; убиквитин-лигазы с НЕСТ доменом самостоятельно катализируют перенос убиквитина на аминогруппу белкамишени. Из класса убиквитин-лигаз иногда выделяют E4-лигазы, осуществляющие исключительно удлинение убиквитиновых цепей.



Рисунок 4. Убиквитин-протеасомная система. Фкрментативный каскад, осуществляющий убиквитинирование субстратов [63].

Специфичность модификации субстратов достигается за счет иерархичности системы убиквитинирования. Так, в клетках млекопитающих существует всего два типа убиквитин-активирующих ферментов E1 – Uba1 и Uba6 [64], около 30 конъюгирующих ферментов E2 и около 600 убиквитин-лигаз E3. Ферменты типа E1 активируют убиквитин для всех типов ферментов E2, большая часть которых взаимодействует с несколькими убиквитин-лигазами E3. Как правило, ферменты E3 способны переносить убиквитин на различные субстраты, имеющие схожие или идентичные мотивы узнавания. В то же время

специфические E3-лигазы могут взаимодействовать более чем с одним ферментом E2, а некоторые субстраты могут распознаваться более чем одной E3-лигазой. Таким образом иерархия системы убиквитинирования представляет собой сложную сеть, отличную от пирамиды.

Существует множество способов модификации белков убиквитином, из которых моноубиквитинирование (одного выделяют или нескольких сайтов), а также полиубиквитинирование с разными параметрами связи и длинами убиквитиновых цепей. єаминогруппы семи лизинов (К6, К11, К27, К29, К33, К48, К63), входящих в состав убиквитина, позволяют ему образовывать изопептидные связи. Как правило, первый убиквитин присоединяется к лизину, входящему в состав субстрата, с помощью Сконцевого глицина (G76). Дальнейший рост цепи обусловлен образованием изопептидных связей между внутренними лизинами уже встроенного убиквитина и С-концевым глицином нового убиквитина. Возможно также присоединение убиквитина непосредственно к Nконцевому метионину субстрата с последующим линейным сцеплением убиквитинов. Параметры цепей крайне разнообразны: они могут быть как гомогенными (то есть образовывать связи через лизины в строго определенном положении), так и гетерогенными (комбинировать разные типы связей), последние в свою очередь могут разветвляться посредством убиквитинирования сразу по нескольким сайтам [65]. Кроме того, убиквитин подвергается фосфорилированию и ацетилированию по остаткам серина, треонина и лизина [66]. Считается, что значение сигнала убиквитинирования зависит от типа связи и длины убиквитиновой цепи. Удаление этих сигналов осуществляется c помощью дебиквититинирующих ферментов (DUB), которые способны удалять убиквитиновые цепи с субстратов [67].



Рисунок 5. Строение убиквитина. Указаны лизины, позволяющие убиквитину образовывать изопептидные связи.

Убиквитин не просто переключатель, который включает деградацию и выключается, а регулируемый сигнал, который может определять в какой последовательности белки регуляторного пути будут гидролизованы. Например, продвижение клетки по клеточному циклу требует деградации регуляторных белков в правильной последовательности. Так, гидролиз можно упорядочить по времени убиквитинирования, многие убиквитин-лигазы ЕЗ распознают субстраты, только когда их сайт взаимодействия будет фосфорилирован [68]. Есть предположение, что порядок деградации также контролируется характером убиквитинирования, – во время клеточного цикла регуляторные белки, имеющие более длинные полиубиквитиновые цепи, гидролизуются быстрее белков, модифицированных более короткими цепями [69].

3.2.1.2. Убиквитиновые цепи

Тысячи белков убиквитинируются в дрожжевых клетках, но почти половина из этих белков не является мишенью для протеасомы [70], и пока до сих пор не ясно, каким образом клетка отличает разные убиквитиновые сигналы. Традиционное представление состоит в том, что убиквитиновые цепи, образованные через К48 убиквитина распознаются протеасомой, и для правильного распознавания необходимо не менее четырех молекул убиквитина. Модификация одной молекулой убиквитина или полиубиквитиновые цепи, связанные через другие остатки лизина, например, через К63, а также линейные полиубиквитиновые цепи играют роль в клеточных процессах, не связанных с протеасомой, таких как регулирование структуры хроматина, мембранный транспорт и сигнальная трансдукция. Тем не менее это не совсем так, и убиквитин, полимеризованный через К63 [71], а также моноубиквитиновые теги [72] могут в отдельных случаях распознаваться протеасомой. Очищенная протеасома способна связывать К63-полиубиквитиновую цепь с почти такой же аффиностью, как и К48-полиубиквитиновые цепи [73], таким образом, специфичность распознавания различных убиквитиновых цепей возможно могут обуславливать некие вспомогательные белки.

Последние достижения в протеомных технологиях позволили создать карту протеома для убиквитина [74]. Комбинация количественной протеомики и использования антител против диглицина diG, которые распознают убиквитинированные пептиды в трипсинизированных фрагментах, показала, что большое количество белков (~ 5000) убитиквитинировано в культивируемых клетках человека [70]. Больше 60% этих белков содержали множественные сайты убиквитинирования, и ~58% убиквитинированных пептидов стали более многочисленными после обработки клеток ингибитором протеасомы. Другое количественное протеомное исследование с использованием меченого изотопами

убиквитина показало, что убиквитинированные субстраты в основном существуют в моноубиквитинированной форме [75]. Таким образом, эти протеомные исследования показали, что значительное количество эндогенных протеасомных субстратов модифицировано несколькими моно- или полиубиквитинами, а не одной цепью. Цепи, образованные через К48, быстро накапливаются в клетках, обработанных ингибитором протеасомы, в то время, как цепи, образованные другими связями, такими как K6, K11, K27, K29, K33 и в меньшей степени K63 также стали более многочисленными, что свидетельствует о вовлеченности данных типов цепей в протеасомную деградацию [76].

В соответствии с наблюдениями in vivo, недавние исследования in vitro показывают, что очищенные протеасомы могут распознавать очень широкий диапазон топологий убиквитиновых цепей на различных субстратах. С использованием одномолекулярного подхода, было показано, что протеасома эффективно гидролизует циклин В1 с несколькими короткими цепями убиквитина [77][78]. В реконструированной системе большая мультибелковая ЕЗ-лигаза АРС/С быстро модифицирует субстраты моно-, ди- и триубиквитинами по нескольким сайтам [79]. Кроме того, был сконструирован циклин В1, убиквитинированный цепями определенной длины, далее исследователи контролировали среднее время пребывания этих белков на протеасоме на уровне отдельных молекул с использованием флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (total internal reflection fluorescent microscopy, TIRF). Связывание субстрата возрастало экспоненциально для первых трех убиквитинов в любой конфигурации, то есть нескольких моно- или коротких цепей убиквитина, и линейно от четырех до девяти убиквитинов. Среди возможных конфигураций с четырьмя убиквитинами, субстраты, модифицированные двумя К48-содержащими цепями диубиквитина, обеспечивали более эффективную деградацию, чем те, которые были модифицированы одной К48-содержащей тетраубиквитиновой цепью. Данные наблюдения были подтверждены более поздним с использованием модельного субстрата GFP, исследованием слитного с неструктурированным участком [80]. В то же время цепи К48 не всегда приводят субстрат к деградации. В дрожжах активатор транскрипции Met4 [81] и Cdc34 [82] могут быть убиквитинированы длинными К48-содержащими полиубиквитиновыми цепями, но при этом протеасомой они не гидролизуются. Несколько коротких цепей, связанных через К11, К27 и К63, также способствуют связыванию субстрата с протеасомой, что указывает на то, различает типы что, возможно, протеасома не цепей при множественном убиквитинировании субстратов. Вполне вероятно, что для распознавания субстрата протеасомой важна локальная концентрация единиц убиквитина, а не тип связи в цепи.

Известно, что в клетках ЕЗ-лигаза АРС/С вместе с двумя разными Е2-лигазами, UBE2C и UBE2S может собирать разветвленные убиквитиновые цепи с помощью связей K11 и K48 [83]. Субстраты АРС/С, модифицированные разветвленными цепями K11/K48, более эффективно подвергаются деградации, чем те, которые содержат гомотипические цепи, образованные через К48 [83][84]. Топология разветвленных цепей на настоящий момент остается неясной, например, одиночные гомогенные цепи, образованные через К11, не связываются с протеасомой или не способствуют деградации субстрата [80][84], но при этом разветвленные цепи со связями К11 могут увеличить количество К48-содержащих цепей. Кроме того цепи К11 участвуют в процессах, не связанных с протеасомной деградацией, например, разветвленные цепи К11/К63 способствует интернализации молекул МНС І класса путем эндоцитоза [85]. Кроме того, есть данные, что у дрожжей К11содержащие цепи убиквитина почти столь же многочисленны (28% всех убиквитиновых цепей) [76], как и К48-содержащие цепи, но гораздо менее распространены в несинхронизированных клетках млекопитающих (2-5% всех убиквитиновых цепей) [86][75]. Недавно было обнаружено, что клетки содержат существенные количество разветвленных К48/К63-содержащих убиквитиновых цепей [87]. Количество таких цепей в клетке увеличивалось при обработке клеток ингибитором протеасомы, что указывает на то, что разветвленные цепи этого типа являются сигналом протеосомной деградации.

Молекулы полиубиквитина, связанные через К63, составляют около 16% связей в дрожжевых клетках и, таким образом, являются третьими наиболее распространенными цепями после цепей К48 и К11. Ранее была разработана простая система убиквитинирования, использующая ЕЗ-лигазу Rsp5 типа НЕСТ и дегрон с РУ-мотивом [88]. Белок Sic1, содержащий мотив РҮ (Sic1PY), с помощью лигазы Rsp5 сверхубиквитинируется длинными К63-цепями. Убиквитинированный Sic1PY быстро подвергается деградации протеасомой; соответственно, эта система широко используется для анализа протеасомной функции [42][89], но при этом, как уже было указано выше, цепи К63 практически не участвуют в проеасомной деградации в клетках. Одним из объяснений может быть участие белков, содержащих UBD (Ubiquitin-binding domain), специфичных к K63 связям in vivo. Кроме того, возможно, цепи, образованные через K63, на эндогенных субстратах слишком коротки, чтобы быть распознанными субъединицами протеасомы или адаптерными белками.

Линейные цепи убиквитина связываются с протеасомой менее эффективно, чем К48содержащие цепи [90]. Они не способствуют деградации белков протеасомой *in vitro* [80], тем не менее они могут делать это в дрожжевых клетках и клетках млекопитающих [91][92]

при искусственном сборке таких цепей и в физиологических условиях при деградации протеинкиназы С и белка TRIM25 [93].

Интересно, что необходимый тип убиквитинирования для протеасомной деградации коррелирует с размерами и структурными особенностями самих субстратов, так, в лизатах ретикулоцитов моноубиквитинирование является достаточным для индукции протеасомной деградации структурно неупорядоченных белков, содержащих менее 150 аминокислот [94][72]. Недавнее протеомное исследование с использованием дрожжей и клеток млекопитающих, в которых весь убиквитин был заменен модифицированным убиквитином, не содержащим остатки лизина и неспособным к образованию полиубиквитиновых цепей [95], показало, что множество белков ($\sim 25\%$ у дрожжей и $\sim 50\%$ соответственно) подвергаются человека, деградации благодаря моноили V множественному моноубиквитинированию, кроме того, данные субстраты имеют определенные особенности: в частности, большинство из них небольшого размера по сравнению с белками, подвергающимися полиубиквитинированию. Моноубиквитинированные субстраты чаще встречаются среди белков, участвующих в транспорте углеводов и окислительном стрессе, что, возможно, указывает на то, что за их моноубиквитинирование ответственны специфические ЕЗ-лигазы.

3.2.1.3. Система деубиквитинирования

Убиквитиновые цепи на белках могут удлиняться и укорачиваться, даже когда субстраты уже связаны с протеасомой, благодаря действиям убиквитин-лигаз E3, а также E4, и деубиквитинирующих ферментов. Все на настоящий известные деубиквитинирующие ферменты являются цистеиновыми протеазами, которые специфично гидролизуют изопептидную связь сразу после C-концевого остатка Ub (Gly-76). В клетках млекопитающих было найдено около ста деубиквитинирующих ферментов и как минимум четыре из них ассоциированы с протеасомой (Rpn11, Ubp6, UCH37, Doa4).

У дрожжей деубиквитинирующий фермент Ubp6 и его гомолог в клетках млекопитающих Usp14 связан с «крышкой» 19S регуляторного комплекса [96]. Эти ферменты постепенно отрезают убиквитиновые цепи от субстрата, тем самым ограничивая время его связывания с протеасомой [97]. Следовательно, белки, которые подвергаются гидролизу с трудом из-за того, что не могут быть развернуты или имеют не очень доступные сайты инициации, будут отсоединены от протеасомы после попыток разрушить его в течение какого-то ограниченного времени, тем самым освобождая место для следующего субстрата. С другой стороны, ингибиторы протеасомного деубиквитинирующего фермента Usp14 весьма перспективны в качестве лекарственных средств для терапии

нейродегенеративных заболеваний, так как улучшают способность протеасомы к разрушению устойчивых субстратов предположительно за счет увеличения времени их взаимодействия с протеасомой. Ингибиторы деубиквитинирующих ферментов также испытывались для терапии рака, но в данном случае влияние на деградацию имело другой эффект и приводило к накоплению убиквитинированных белков [98], биологический эффект этого воздействия в целом схож с действиями ингибиторов протеасомы, которые уже успешно используются в лечении множественной миеломы [99].

Убиквитин-лигазы E3 также могут связываться с протеасомой [100]. В частности, E3 убиквитин-лигаза Hul5 ассоциирована с Ubp6 на 19S регуляторном комплексе, где она противодействует активности Ubp6 путем увеличения длины полиубиквитиновой цепи [101]. Редактирование убиквитиновых цепей может служить для регулирования скорости разрушения белка. Другой вариант состоит в том, что присоединение убиквитина к субстрату непосредственно на протеасоме делает деградацию более процессивной, так как позволяет избежать образования частично деградированных фрагментов белка [102] путем их повторного убиквитинирования, по мере того как протеасома «проходит» вдоль полипептидной цепи протяженных белков [103]. Белок Doa4 также является деубиквитиназой, ассоциированной с 19S регулятором, но связана она менее прочно по сравнению с Ubp6 и Uch37 [104].

3.2.1.4. Рецепторы убиквитина

Убиквитинированные субстраты распознаются рецепторами убиквитина и далее подвергаются протеасомой деградации. Рецепторы можно классифицировать в соответствии с их ассоциацией с протеасомой: протеасомные рецепторы, которые на постоянной основе входят в состав 19S регуляторного комплекса, и внепротеасомные белки, которые связывают убиквитиновые субстраты и доставляют их к протеасоме.

3.2.1.4.1. Протеасомные рецепторы убиквитина

Было показано, что три субъединицы 19S регуляторного комплекса способны связывать убиквитинированные субстраты: Rpn13 [41], Rpn1 [42] и Rpn10 [105]. Субъединицы Rpt5 [106] и Rpn15 [107] также рассматриваются в качестве возможных рецепторов убиквитина, поскольку было показано, что они обладают способностью связывать убиквитин, но действительно ли они распознают убиквитинированные субстраты, направленные на гидролиз в протеасому, не до конца ясно.

Рецептор Rpn13 связывает убиквитинированные субстраты своим N-концевым плекстрин-подобным доменом (PRU, pleckstrin-like receptor for ubiquitin) [40], в то время

как его С-терминальный домен, связывает и активирует деубиквитиназу DUB Uch37. Вместе они функционируют как «редактирующий» механизм, который позволяет избежать убиквитинированных субстратов со слишком большим количеством молекул убиквитина, посредством удаления лишних фрагментов убиквитина [108] до такой длины цепи, которая является оптимальной для ассоциации субстрата с протеасомой, и способствует эффективной деградации.

Было установлено, что Rpn1, помимо своей роли в качестве рецептора убиквитинированных субстратов, опосредует взаимодействие протеасомы с некоторыми компонентами убиквитин-протеасомной системы. Исследования в дрожжах показали, что Rpn1 также может служить сайтом связывания с адаптерными белками Rad23, Dsk2 и Ddi1.

Rpn10 является уникальным убиквитиновым рецептором, так как он способен функционировать как в связанной с протеасомой форме, так и в свободном состоянии, что было показано для *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* и *A. thaliana*. Rpn10 связывает полиубиквитиновые цепи благодаря своему UIM домену (ubiquitin-intaracting motiv) [105] и содержит N-концевой домен Ville Willebrand A (VWA), который способствует связыванию Rpn10 с протеасомой и деградации некоторых убиквитинированных субстратов [109]. Моноубиквитинирование Rpn10 регулирует его способность связывать субстраты, поскольку данная модификация способствует внутримолекулярным взаимодействиям, которые уменьшают аффинность UIM по отношению к убиквитинированным белкам [110].

3.2.1.4.2. Непротеасомальные рецепторы убиквитина

В дополнение к стехиометрическим протеасомальным рецепторам убиквитина, внепротеосомальные адаптерные UBL-UBA белки также могут служить в качестве убиквитиновых рецепторов. На настоящий момент известно три семейства белковпосредников в дрожжах, имеющих гомологи у высших эукариот и работающих по схожему механизму: Rad23, Dsk2 и Ddi1. Каждый из них содержит убиквитин-подобный домен (UBL), взаимодействующий с протеасомой, и один или два убиквитин-ассоциированных домена (UBA), связывающих полиубиквитиновые цепи. Это UBL-опосредованное взаимодействие происходит путем связывания с субъединицами Rpn1, Rpn13 или Rpn10.

Роль шаттл-белков в протеасомной деградации дискуссионна: в зависимости от концентрации они могут как ускорять, так и ингибировать гидролиз субстратов. Известно, что повышенная экспрессия Dsk2 ингибирует протеолиз и оказывает цитотоксическое действие [111]. Было показано, что данный эффект ослабляется связыванием UIM домена внепротеасомной Rpn10 с UBL доменом Dsk2.

Убиквитилины, эукариотические ортологи дрожжевого Dsk2, представляют собой семейство из четырех убиквитин-подобных белков, которые функционируют в качестве адаптерных белков. Было показано, что убиквитилины способствуют деградации поврежденных белков после окислительного стресса. Мутации убиквитилина, которые приводят к нарушению способности связываться с Rpn10, способствуют повышению количества убиквитинированных белков в клетке, что в свою очередь приводит к образованию агрегатов, которые могут быть связаны с патогенезом некоторых нейродегенеративных заболеваний (например, амиотрофического бокового склероза, болезни Хантингтона и Альцгеймера [112]).

Rad23 содержит два UBA домена: центрально расположенный UBA1 и С-концевой UBA2, которые связывают моно- и полиубиквитинированные субстраты с различной аффинностью. UBA1 связывает К63-содержащие полиубиквитиновые цепи с более чем К48-содержащие цепи, высокой аффинностью, тогда как домен UBA2 предпочтительно связывает цепи К48 [113]. Кроме того, убиквитинированные белки, связанные с Rad23, защищены от последующих модификаций их убиквитиновых цепей, таких как удлинение цепи, а также деубиквитинирования. Предполагается, что этот стабилизирующий эффект обеспечивает эффективную доставку субстрата к протеасоме [114]. Rad23 также участвует в деградации, ассоциированной с эндоплазматическим ретикулумом (ERAD) путем ассоциации его Rad4-связывающего домена с дегликозилазой Png1 с образованием комплекса, который опосредует протеасомную деградацию определенного набора белков эндоплазматического ретикулума [115].

Несмотря на то, что UBL-UBA белки непосредственно взаимодействуют с протеасомой, сами они не подвергаются гидролизу протеасомой. Стабильность Dsk2 и Rad23 объясняется наличием С-концевого UBA-домена, защищающего неструктурированный участок, способного инициировать деградацию [116][117]. Существуют данные, согласно которым неупорядоченный участок Rad23 не может инициировать гидролиз независимо от наличия UBA-домена, что может свидетельствовать о существовании у протеасомы определенных предпочтений к аминокислотному составу неструктурированных участков [118].



Рисунок 6. Адаптерные белки в Saccharomyces cerevisiae и Homo sapiens. Адаптировано из [119].

Белок p62 (секвестосома 1) представляет собой адаптерный белок [120], который связывает убиквитинированные субстраты своим С-концевом UBA доменом, и также связывается с субъединицами протеасомы Rpt1 и Rpn10 N-концевым доменом PB1136, тем самым способствуя доставке белков (например, тау) на протеасомную деградацию [121]. p62 также действует как рецептор убиквитина при аутофагии, непосредственно связываясь с белком LC3 – известным медиатором образования аутофагосом [122]. Роль p62 в качестве рецептора убиквитина как в протеасомной, так и в опосредованной аутофагией деградации убиквитинированных белков также подтверждается тем фактом, что уменьшение количества эндогенного p62 приводит к накоплению убиквитинированных белков.

3.2.1.4.3. p97/VCP/Cdc48p

В дополнение к убиквитиновым рецепторам протеасомы и UBA-UBL адаптерным белкам, существуют и другие белки, способные связывать убиквитинированные субстраты и направлять их на гидролиз в протеасому. p97 (также известный как валозин-содержащий белок (VCP) у млекопитающих или Cdc48p в *Saccharomyces cerevisiae*) является эволюционно консервативной ATФазой, присутствующей во всех эукариотах и архебактериях. p97/VCP/Cdc48p относится к большому семейству ATФаз, называемому AAA+ (расширенное семейство ATФаз, выполняющее различные клеточные функции). Ферменты этого семейства часто выступают в качестве важных шаперонов, которые способствуют сворачиванию или разворачиванию белков, кроме того p97 участвует в синтезе и репарации ДНК, слиянии мембран, разборке митотического веретена, аутофагии и протеасомной деградации. В соответствии с важной ролью данного фермента в контроле качества белков, мутации в p97 могут вызывать некоторые нейродегенертивные заболевания [123].

Белок p97/Cdc48p имеет два АТФазных домена ААА (D1 и D2, соответственно). Короткий полипептидный линкер (линкер D1-D2) соединяет два АТФазных домена, а другой линкер (N-D1-линкер) соединяет D1 с большим аминоконцевым доменом (N-концевой домен). К карбоксильному концу домена D2 присоединен короткий участок, содержащий ~ 40 аминокислотных остатков. Взаимодействие p97/Cdc48p с белками-партнерами в основном опосредовано N-концевым доменом, хотя некоторые белки связываются с p97/Cdc48p через C-конец. Шесть мономеров Cdc48 образуют двухкольцевую структуру, окружающую центральную пору. Домены D1 и D2 гомологичны как по последовательности, так и по структуре. Однако они имеют разные функции. Например, для гексамерной сборки p97 требуется только домен D1, но не D2.

В клетках млекопитающих p97 локализуется главным образом в цитоплазме во фракциях, связанных с мембранами субклеточных органелл, таких как эндоплазиатический ретикулум, аппарат Гольджи, митохондрии и эндосомы. По-видимому, примембранная локализация опосредуется некими мембранными рецепторами, идентифицировать которые на настоящий момент не удалось. p97/Cdc48p также присутствует в ядре и участвует в контроле качества ядерных белков [124].

p97 является одним из наиболее распространенных белков в эукариотических клетках. У людей экспрессия мРНК p97 умеренно увеличивается при определенных типах рака, а уровень экспрессии в некоторой степени коррелирует с чувствительностью раковых клеток к ингибитору p97, который в настоящее время считается потенциальным противораковым препаратом [125].

Механизм действия Cdc48/p97 довольно плохо изучен, несмотря на его важнейшую роль во многих клеточных системах. Наиболее известные субстраты p97/Cdc48 коньюгированы с полиубиквитиновыми цепями и подвергаются деградации с помощью 26S протеасомы. Соответственно, многие кофакторы, а также адаптеры p97/Cdc48 способны распознавать убиквитиновые коньюгаты [126]. Считается, что ассоциация Cdc48 с убиквитинированными белками достигается с помощью посредников, способных распознавать как p97, так и убиквитин, в роли которых могут выступать убиквитин-лигазы. p97 может связываться с убиквитин-лигазами и деубиквитиназами, которые редактируют убиквитиновую цепь субстрата, делая ее пригодной для узнавания протеасомой или же, наоборот, помогая субстрату избежать гидролиза. В конечном счете ассоциированная с p97 убиквитин-лигаза привлекает адапторный белок, осуществляющий доставку субстрата в протеасому. Таким образом, p97 определяет судьбу белков, играя ключевую роль в убиквитин-зависимой деградации [127].



Рисунок 7. (А) Структура VCP/p97. Каждая субъединица состоит из глобулярного N-терминального домена (зеленый), двух АТФазных доменов D1 (голубой) и D2 (синий) и С-концевого участка (серый). D1 и D2 образуют два сложенных гексамерных кольца. Считается, что гидролиз АТФ доменом D2 является главной движущей силой индуцирования ремоделирования доменов в p97, что способствует связыванию субстрата и его структурной перестройке. (Б) Одна из возможных схем работы VCP/p97 при захвате субстрата и редактировании убиквитиновой цепи. Целевой субстрат (С) посттрансляционно модифицируется убиквитином (оранжевый) с помощью ферментативного каскада, состоящего из фермента, активирующего убиквитин (E1), фермета, конъюгирующего убиквитин (E2) и специфической убиквитин-лигазы (E3). p97 связывается с убиквитинированным субстратом благодаря кофакторам, связывающим убиквитин (К). Затем р97 преобразует энергию гидролиза АТФ для структурной перестройки субстрата для отделения его от лиганда (Л), или клеточных поверхностей. Взаимодействие с ферментами, способными редактировать убиквитинновые цепи, такими как убиквитин-лигаза E4, способная удлинять цепи, или деубиквитинирующими ферментами (DUB), помогает модифицировать субстрат либо для его повторного использования или для отправки его на деградацию протеасомой. Адаптировано из [127].

3.2.1.5. Инициация деградации

Протеасома распознает и связывает субстраты благодаря убиквитиновой метке, но инициация деградации происходит с неупорядоченного участка субстрата [62]. После того, как субстрат связывается с протеасомой, она начинает разворачивать полипептидную цепь с участка инициации и далее перемещать ее в протеолитическую полость, где непосредственно происходит деградация белка. Бактериальные протеазы семейства ААА+ распознают дегроны своих субстратов благодаря петлям, которые располагаются в центре кольца АТФазных субъединиц, и вероятно, что протеасома может распознавать сайты инициации своих субстратов аналогичным образом [128]. В протеасоме, эквивалентные петли окружают канал деградации, находясь на расстоянии 30-60 Å от входа в протеолитический канал. Диаметр канала является слишком узким, чтобы позволить фолдированным белкам проходить через него, так ЧТО неструктурированный

полипептидный участок должен быть длиной по крайней мере 20-30 аминокислот, чтобы быть в досягаемости АТФазных петель. Это длина неструктурированного участка согласуется с результатами деградации *in vitro* в экспериментах с модельными протеасомными субстратами, в которых белки подвергаются гидролизу очищенной дрожжевой протеасомой быстрее, когда они содержат неструктурированный хвост длиной приблизительно в 30 аминокислот [129]. Таким образом, петли ААА+ доменов АТФ-азного кольца, вероятно, функционируют как «лопасти», инициируя разворачивание субстрата и проталкивая его в протеолитическую полость.



Рисунок 8. Структурная модель связывания субстрата и его гидролиза 26S протеасомой. Изображенная в разрезе реконструкция протеасомы со связанным субстратом и без него. На первом этапе субстрат (красный) связывается посредством убиквитиновой цепи (фиолетовый) с UIM доменом Rpn10 (желтый цилиндр). В этом состоянии неструктурированный участок субстрата может войти в доступную часть канала и связаться с самыми верхними субъединицами АТФазного кольца. При захвате субстрата АТФазные субъединицы Rpt1-6 перестраиваются в новую конфигурацию, которая открывает вход в канал ведущий в протеолитическую полость, который выровнен со входом в 20S протеасому (серый). Одновременно Rpn11 (зеленый) смещается в центральное положение непосредственно над входом в канал деградации, благодаря чему активный сайт деубиквитиназы (розовая точка) получает возможность удалять убиквитины по мере прохождения субстрата в открытый канал. Таким образом, с субстрата удаляются все убиквитины, так как их сайт связывания (желтая точка) проходит через Rpn11, что облегчает быструю транслокацию, разворачивание и деградацию субстрата. Адаптировано из [45].

Необходимость в неструктурированных участках инициации деградации также отражается в глобальном профиле устойчивости белков. По крайней мере, 30% эукариотических белков содержат в своей структуре неупорядоченные области, которые необходимы данным белкам для выполнения их функций в клетках [130]. Существует ряд биоинформатических доказательств, что белки, которые содержат неупорядоченные области, имеют в среднем более короткий период полужизни, чем белки, в которых отсутствуют такие регионы [131][132], но до сих пор нет более достоверных доказательств такой взаимосвязи. Другие же исследования не находят таких корреляций [133][134][135], кроме того, существуют данные о том, что участки убиквитинирования протеасомных субстратов преимущественно располагаются в неструктурированных областях белка [136][137]. Даже в том случае, когда у белка отсутствует неструктурированная область, само по себе убиквитинирование может вызвать локальное разворачивание белка вблизи убиквитинированного остатка, которое в свою очередь, может создать сайт инициации для протеасомы [138].

Убиквитиновый тег и сайт инициации не обязательно должны быть расположены на одной полипептидной цепи, они могут работать вместе, находясь на разных полипептидных цепях белкового комплекса, так что убиквитинированная субъединица этого комплекса может способствовать деградации своего неубиквитинированного партнера [139]. Таким образом, убиквитинированная субъединица служит адаптером, который связывается с протеасомой и направляет связанный с ним белок на протеолиз. Предположительно, UBL-UBA белки функционируют схожим образом, действуя в качестве нестехиометрических убиквитиновых рецепторов для протеасомы [96].

С другой стороны, протеасома способна перестраивать белковые комплексы, гидролизуя только убиквитинируемую субъединицу и оставляя другие белки в комплексе интактными [140][141]. Такое реструктурирование имеет важное значение для многих регуляторных процессов. Например, во время регуляции клеточного цикла у дрожжей, протеасома извлекает ингибитор циклин-зависимой киназы Sic1 из комплекса с циклином и циклин-зависимой киназой, гидролизуя исключительно Sic1 [142]. Вскоре после этого, циклин убиквитинируется, а затем подвергается гидролизу, оставляя интактную, но при этом неактивную киназу [143]. Наиболее вероятным местом инициации деградации для протеасомы является, скорее всего, неструктурированная область, расположенная ближе ко входу в канал деградации. Действительно, эксперименты показывают, что регион инициации должен быть расположен на некотором расстоянии от убиквитинового тега для того, чтобы белок мог подвергаться гидролизу протеасомой. Данная структурная особенность обусловлена необходимостью одновременного связывания убиквитинового тега и захвата неструктурированного участка АТФазным кольцом протеасомы [129].

3.2.1.6. Процессинг

Хотя большая часть субстратов расщепляется протеасомой целиком, некоторые из них претерпевают ограниченный протеолиз. Протеасома способна распознавать так называемые «стоп-сигналы», закодированные в аминокислотной последовательности белка, например, ~ 60÷300-аминокислотные фрагменты, богатые аланинами и глицинами (glycine-alanine repeat, GAr), найденные в белке EBNA1 вируса Эпштейна-Барра (EBV). Было показано, что EBNA1 способен распознаваться протеасомой и происходит инициация

деградации, однако продвижение субстрата по протеолитическому каналу останавливается по достижении участком GAr ATФ-азного кольца. Предполагается, что ароматическиегидрофобные петли (Ar-Ф) ATФ-азных субъединиц не могут должным образом захватывать глицины и аланины (небольшого размера аминокислоты), из-за чего происходит «проскальзывание» полипептидной цепи, что влечет остановку транслокации субстрата и образование частично процессированных продуктов [144]. Блокирование протеолиза помогает вирусу Эпштейна-Барр избежать презентации антигенных пептидов EBNA1 на MHC I класса и, следовательно, иммунного ответа.

Другим хорошо изученным примером ограниченного протеолиза служит процессинг субъединицы p50 фактора транскрипции NF-кВ из предшественника p105. NF-кВ представляет собой гомо- или гетеродимер, причем наиболее представленной его формой является комплекс p50-p65. Сам предшественник p105 способен ингибировать активность NF-кВ: образуя димеры с белками семейства NF-кВ, он блокирует свой N-концевой сигнал ядерной локализации, тем самым удерживая транскрипционный фактор в цитоплазме. Однако активация сигнального пути NF-кВ запускает процесс убиквитин-зависимого процессинга p105 протеасомой, что приводит к гидролизу его С-конца и высвобождению сигнала ядерной локализации. После этого р50 димеризуется с р65, образуя активный комплекс NF-кВ, и перемещается в ядро, где осуществляет регуляцию транскрипции. Было показано, что остановка протеасомы при процессинге p105 в p50 осуществляется за счет «стоп-сигнала», состоящего из двух компонент: участка с большим количеством остатков глицина и следующего за ним плотно уложенного домена (Rel-гомологичный домен) [145]. Похожие механизмы ограниченной деградации были описаны и для других факторов транскрипции, таких как Spt23 и Mga2 у дрожжей и Cubitus interruptus (Ci) у Drosophila *melanogaster*. Тем не менее наряду с частичным процессингом, p105 способен претерпевать и полный гидролиз, что сложно объяснить в рамках одной лишь вышеизложенной концепции. Недавно было показано, что p105 подвергается модификации не только paнее известной убиквитин-лигазой βTrCP, но и альтернативной КРС [64]. Оказалось, что судьба белка полностью определяется типом убиквитин-лигазы, участвующей в его модификации, что предполагает осуществление этими ферментами различных типов убиквитинирования, и, как следствие, образование различных специфических сигналов.

3.2.2. Убиквитин-независимый протеолиз

Подавляющее большинство клеточных белков подвергается разрушению протеасомой с участием убиквитина, однако ряд белков может разрушаться без

убиквитинирования [146]. В этих случаях субстрат должен иметь альтернативные возможности ассоциации с протеасомой, в качестве которых могут выступать как вспомогательные молекулы, так и участки внутри самого белка (дегроны).

открытым и наиболее хорошо изученным Первым примером является орнитиндекарбоксилаза (ODC), белок, участвующий в биогенезе полиаминов. Регуляция количества полиаминов важна для правильной пролиферации клеток, а повышение их концентрации сопряжено с различными паталогическими процессами, включая канцерогенез. Таким образом, количество ОDC должно строго контролироваться. Оптимальный уровень полиаминов в клетках эукариот поддерживается за счет обратноотрицательной связи. Большая концентрация спермина и спермидина влечет увеличение экспрессии антизима AZ, который замещает одну ODC в каталитически активном гомодимерном комплексе, тем самым ингибируя ферментативную активность ODC. Кроме того, присоединение AZ изменяет конформацию ODC, экспонируя ее С-концевой фрагмент, являющийся неструктурированным, что приводит к значительному ускорению ее гидролиза [147][148]. Было установлено, что деградация ОDC осуществляется 26S протеасомой, но не требует участия убиквитина, а 37-аминокислотный С-концевой участок ОDС совмещает в себе два компонента: участок связывания с протеасомой и неструктурированный участок, инициирующий гидролиз [149][150]. Присоединение данного фрагмента ODC к белкам, не являющимся субстратами протеасомы, также способствует их деградации по убиквитин-независимому пути.



Рисунок 9. (A) Связывание AZ1 с ODC приводит к глобальному изменению конформации ODC. Взято из [148]. (Б) Механизм AZ1-индуцированной убиквитин-независимой протеасомной деградации ODC. Адаптировано из [151].

Одно из возможных объяснений убиквитин-независимой деградации состоит в том, что неструктурированные участки белков связываются достаточно близко к петлям
АТФазного кольца, так что для ассоциации белка с протеасомой убиквитин не требуется. Таким образом, этот механизм можно рассматривать как вариант обычного протеасомного дегрона, в котором отсутствует один из компонентов, а именно убиквитиновый тег, и напоминает дегроны, наблюдаемые в археях и бактериях [152].

Механизмы убиквитин-независимого гидролиза недостаточно хорошо изучены и вполне возможно, что белки, которые *in vitro* расщепляются изолированными коровыми 20S частицами в отсутствии АТФ [153], в естественных условиях гидролизуются 20S протеасомой, активированной альтернативными регуляторными комплексами [154], или даже 26S протеасомой [155]. Белки в этой группе убиквитин-независимых протеасомных субстратов имеют длинные неструктурированные участки. Кроме того, два альтернативных механизма протеасомной деградации, убиквитин-зависимый и убиквитин-независимый, не являются взаимоисключающими, и разные популяции одного и того же белка могут быть отправлены на деградацию по одному из двух путей [156].

Субстраты 20S протеасомы состоят из белков, которые имеют частично или полностью неупорядоченную структуру из-за старения, мутаций или окисления [157]. Нативные белки, содержащие большие неструктурированные области (> 30 аминокислот в длину), называемые природно неупорядоченными областями (IDR), или белки с полностью неупорядоченной последовательностью (природно неупорядоченные белки, IDP) [158], также подвержены деградации 20S протеасомой. В последней группе субстратов преобладают ключевые регуляторные и сигнальные белки, способствующие продвижению клетки по клеточному циклу, участвующие в контроле клеточного роста и онкогенезе [159]. Очевидно, что уровень таких белков в клетке должен строго контролироваться, так как существенные изменения в их концентрации могут привести к развитию различных заболеваний [160].

На настоящий момент известно несколько белков, подвергающихся гидролизу 20S протеасомой, благодаря связыванию субстратов непосредственно с данным протеасомным комплексом.

PSMA2/a2

Было показано, что белок ІкВα способен напрямую взаимодействовать с субъединицей PSMA2/α2 20S протеасомного комплекса благодаря определенным повторяющимся фрагментам в его последовательности [161], возможно тем самым опосредуя убиквитин-независимый гидролиз белка. Не так давно было показано, что кальциневрин также взаимодействует с PSMA2/α2 и способствует деградации ІкВа по убиквитин-зависимому пути [162].

$PSMA4/\alpha 3$

Субъединица PSMA4/α3 взаимодействует с белком F вируса гепатита C и способствует его убиквитин-независимому гидролизу [163].

PSMA7/a4

Есть данные о том, что субъединица PSMA7/ α 4 является одной из α-субъединиц, которая взаимодействует с регуляторными субчастицами REG α/β (PA28 α/β), это было показано с использованием двугибридной дрожжевой системы, а также ингибированием активации протеасомы полипептидом X белка вируса гепатита B, который связывается непосредственно с субъединицей PSMA7/ α 4 [164]. С-концевая часть PSMA7/ α 4 также специфически взаимодействует с N-концевой областью Rab7 и участвует в позднем эндоцитическом транспорте грузовых белков, но данное взаимодействие не способствует деградации Rab7 [165]. Белок паркин, E3-лигаза, участвующая в болезни Паркинсона (PD), взаимодействует своим С-концевым доменом IBR-RING с C-концевой областью PSMA7/ α 4 и может функционировать как вспомогательный белок при гидролизе субстратов протеасомой [166]. Наконец, PSMA7/ α 4 также взаимодействует с нуклеотид-связывающим олигомеризационным доменом белка 1 (NOD1), способствуя его деградации протеасомой [167].

PSMA3/a7

PSMA3/α7 также является одной из субъединиц, которая взаимодействует с субчастицами REGα/β (РА28α/β), опосредующими протеасомную активацию вместе с PSMA1/a1 и PSMA7/a4. С-конец p21WAF1/CIP1 взаимодействует с PSMA3/a7, что способствует его деградации по убиквитин-независимому механизму [168]. Помимо этого, также было показано, что несколько белков выступают в качестве посредников и способствуют гидролизу p21 протеасомой. Так MDM2, E3 убиквитин-лигаза, не убиквитинирует p21, но связывается с данным белком, тем самым усиливая связывание p21 с субъединицей PSMA3/а7 протеасомы [169]. Наконец, связывание p21 с регуляторной субчастицей REGy (РА28у) также опосредует деградацию p21 протеасомой [170]. Белок SRC-3/AIB1 является коактиватором стероидных рецепторов, который может взаимодействовать непосредственно с субъединицей PSMA3/α7 [171] или связываться с REGγ (PA28γ) для деградации протеасомой [172]. MDM2 также связывается с PSMA3/α7 и способствует взаимодействию белка ретинобластомы Rb с данной субъединицей, что аналогично приводит к убиквитин-независимой деградации Rb [173]. Наконец, N-концевая область (аминокислоты 1-60) α-синуклеина, белка, участвующего в болезни Паркинсона,

взаимодействует с С-концевой областью PSMA3/α7, что также обеспечивает его деградацию [174].

PSMB6/β1

Было показано, что PSMB6/β1 напрямую связывается с белком p27Kip1, способствуя его деградации протеасомой [175]. Белок Smad1 подвергается гидролизу протеасомой по убиквитин-зависимому механизму и без предварительной модификации убиквитином [176] путем связывания с PSMB4/β7 и антизимом AZ.

Список клеточных белков, деградация которых не требует предварительного убиквитинирования, постоянно расширяется. Белки, которые уже были подробно описаны [151][155], включают: орнитиндекарбоксилазу (ODC), p21, p53, деградация которого ингибируется NAD(P)H: хинон-оксидоредуктазой 1 (NQO1), гидролиз белка с-Fos также ингибируется NQO1 [177], Fra-1, который напрямую взаимодействует с протеосомной регуляторной субчастицей 19S, TBP-1, имеющий убиквитин-независимый С-концевой дегрон [178], белок ретинобластомы Rb, альфа-синуклеин, HIF-1α, SRC-3/AIB1 транскрипционный коактиватор, IкBα, Y- связывающий белок 1 (YB-1), тимидилатсинтазу (TS) и белок Тау, который участвует в болезни Альцгеймера.

Также в этот список входят белки, которые подвергаются гидролизу протеасомой убиквитин-независимо благодаря взаимодействию с альтернативными протеасомными активаторами, в основном REGy (PA28y) и PA200/Blm10. Кроме p21, субчастица REGy (РА28у) также участвует в протеасомной деградации других регуляторов клеточного цикла, таких как p16 (INK4A) и p19 (Arf) [170]. Цитидин-деаминаза, индуцированная активацией (AID, activation-induced cytidine deaminase), ответственная за инициирование диверсификации генов иммуноглобулинов в активированных В-лимфоцитах, подвергается убиквитин-независимому протеолизу, также благодаря взаимодействию с REGy (PA28y). Активатор PA200/Blm10 связывается с 20S протеасомой своим С-концевым YYX-мотивом и активирует деградацию белка тау in vitro [179]. Совсем недавно было показано, что PA200/Blm10 способствует убиквитин-независимой деградации ацетилированных гистонов [57].

Были предприняты некоторые попытки определить минимальные требования к белковому субстрату, способному подвергаться гидролизу по убиквитин-независимому механизму [180][181][182], но обобщенного механизма данного процесса на настоящий момент не существует. Необходимо определить специфические и неспецифические взаимодействия с протеасомальными субъединицами, которые опосредуют этот процесс. Одной из критически важных проблем является определение, какая из протеасомных

субъединиц в составе 20S, 19S или альтернативных регуляторных субчастиц специфически взаимодействует с теми белками, которые, как сообщается, подвергаются гидролизу с помощью убиквитин-независимого механизма. В то же время существует гипотеза, что субстраты могут попадать в протеолитическую полость через боковую поверхность 20S коровой субчастицы, используя свободное пространство между α и β субъединицами, таким образом минуя торцевые каналы, которые блокированы N-концевыми пептидами α-субъединиц [11].

Было обнаружено несколько защитных механизмов, которые избавляют полностью или частично неструктурированные белки от деградации, например, взаимодействие с так называемыми nanny proteins, которые маскируют неструктурированные области [183], или опосредованная окислением структурная стабилизация [174]. Однако на сегодняшний момент очевидно, что масштабы распространения данных механизмов еще предстоит изучить.

3.3. Основный белок миелина (МВР)

Миелин вещество, покрывающее аксоны большим _ количеством плотноупакованных ламелл в центральной и периферической нервной системе, и способствующее быстрому проведению нервного импульса [184]. Представляет собой мембрану, состоящую из липидов и белков. Белки миелина делят на две группы – внутренние и внешние: внутренние белки пронизывают липидный слой насквозь, внешние же расположены на поверхности мембраны. Одним из основных белковых компонентов миелина центральной нервной системы является основный белок миелина, который составляет около 30% от всего белка по массе. Семейство белков МВР возникает из-за наличия различных транскрипционных сайтов (tss1, tss2 и tss3) и альтернативного сплайсинга 10 (человек) и 11 (мышь) экзонов [185]. Так называемая «классическая» изоформа МВР массой 18.5 кДа (14 кДа у мышей и крыс) – одна из основных белковых компонентов миелина.



Рисунок 10. Строение миелина. Миелинизированный аксон (А), миелиновая оболочка (Б), двухслойные мембраны (В), фосфатидилэтаноламин (Г). Адаптировано из [186].

Основной ролью МВР обычно считается поддержание компактности миелиновой оболочки. Кроме того, этот белок является одним из основных возможных аутоантигенов при рассеянном склерозе [187] – тяжелом демиелинизирующем заболевании центральной нервной системы с неясной этиологией. МВР состоит из 170 аминокислотных остатков («классическая» изоформа у человека), из которых 19 аминокислот приходится на аргинин и 12 – на лизин, что обуславливает его высокую основность, pI приблизительно 12. У МВР отсутствуют цистеины, однако содержится высокий процент аминокислот, обуславливающих неупорядоченность структуры, таких как A, R, G, Q, S, P, E и K. Также МВР является членом быстрорастущей группы структурно неупорядоченных белков, которая включает в себя амилоид и прионные белки [188], для которых неупорядоченное состояние является функциональным. Поскольку взаимодействие между положительно заряженными остатками аргинина и лизина и отрицательно заряженными фосфатными группами мембранных фосфолипидов имеют важное значение для компактной структуры миелина, уменьшение положительного заряда белка приводит к ослаблению прочности этих взаимодействий [189].

MBP – это крайне неудачный объект для определения пространственной структуры: было предпринято множество попыток закристаллизовать MBP, однако все они закончились неудачей. Одной из причин этого является множество посттрансляционных модификаций, которым он подвергается в клетке. К ним относятся фосфорилирование, дезамидирование, деиминирование, метилирование и N-концевое ацетилирование. Они создают группу микрогетеромеров белка или «зарядовых изомеров», которые на практике могут быть разделены хроматографией.

Деиминирование остатков аргинина под действием пептидиларгининдеиминазы (ЕС 7.5-3.15) превращает их в цитруллин, это важная необратимая модификация MBP. В серии исследований было показано, что 20% MBP выделенного из мозга здоровых людей деиминировано, при этом этот процент значительно увеличивается при патологиях. У больных с хроническим рассеянным склерозом 40% MBP деиминировано, а при быстром развитии заболевания его количество увеличивается до 90% [190]. Ясно, что данная модификация имеет важное значение, уменьшая стабильность миелиновой оболочки аксонов нейронов.

3.3.1. Роль основного белка миелина и протеасомы в развитии рассеянного склероза

Убиквитин-протеасомная система – основная система деградации белков в ядрах и цитоплазме эукариотических клеток, она также вовлечена в патогенез многих нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, амиотропный латеральный склероз, прионные болезни и ряд других. Считается также, что протеолитическая деградация является одной из ключевых стадий в разрушении миелина, которое протекает при рассеянном склерозе. Наиболее вероятным является то, что именно протеолитическое расщепление белков является причиной появления аутоантигенов. Одним из возможных механизмов развития рассеянного склероза является разрушение миелиновой оболочки и дальнейший протеолиз основного белка миелина протеасомой, после чего продукты деградации белка презентируются на молекулах МНС I класса и распознаются цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Существуют предварительные данные, свидетельствующие о том, что MBP скорее всего подвергается гидролизу протеасомой без предварительной модификации убиквитином [191]. Более того было показано, что количество иммуносубъединиц протеасомы увеличивается в центральной нервной системе мышей, развивающих экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE). При этом субъединица β1i локализована преимущественно в олигодендроцитах – клетках, экспрессирующих MBP, а β5i в основном в цитотоксических лимфоцитах, проникающих в центральную нервную систему через поврежденный гематоэнцефалический барьер [192].

В свете известных фактов о механизме работы протеасомы можно предложить, что MBP, вероятно, способен связываться либо с 19S регуляторной частицей, либо с одним из

альтернативных регуляторов благодаря своему повышенному положительному заряду [193], так как субъединицы 19S комплекса в большинстве своем заряжены либо нейтрально, либо отрицательно. Кроме того, недавние исследования показали, что иммунопротеасома, гидролизует основные неупорядоченные белки, такие как MBP и гистоны [194], быстрее, чем конститутивная протеасома.

4. Материалы и методы

В работе были использованы указанные материалы и реактивы:

Основные реактивы: трис-гидроксиметиламинометан (трис), хлорид натрия, хлорид магния, персульфат аммония, глицин, тетраборат натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), диметилсульфоксид (ДМСО), дитиотреитол (DTT), аденозин-5'трифосфат (ATP), акриламид, N',N'-метиленбисакриламид, β-меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия (SDS), мочевина sequence grade, nonidet P-40 (NP-40) (Difco, Великобритания), бычий сывороточный альбумин (BSA), Hybond C extra мембрана нитроцеллюлозная (Amersham, США); маркеры молекулярной массы белков (Fermentas, Литва), ядерный краситель Hoechst 33342 (Life Technologies, США), ростовые среды DMEM, Opti-MEM и advanced RPMI.

Генетические конструкции, кодирующие убиквитин с НА и тус эпитипами, Коубиквитин с НА и тус эпитопами, с-Мус с НА-эпитопом, были любезно предоставлены Dr. Kazuhiro Iwai (Высшая школа Медицины, Университет Осака, Осака, Япония). Генетические конструкции, кодирующие p105 с 3FLAG-эпитопом и Ubc6, была любезно предоставлена Dr. Aaron Ciechanover (Лаборатория метаболизма белка, Технион, Хайфа, Израиль). Генетическая конструкция, кодирующая рекомбинантную орнитиндекарбоксилазу с 3FLAG-эпитопом, была любезно предоставлена Dr. Chaim Kahana (Вайзманн институт, Реховот, Израиль).

Малые интерферирующие РНК к убиквитин-лигазе E1, субъединицам протеасомы, а также некодирующая siRNA были произведены Dharmacon RNAi, GE Healthcare, Великобритания.

Белки: бычий сывороточный альбумин, актин из мышц свиньи, лизоцим из куриного яйца, рекомбинантный убиквитин, рекомбинантный К-48 тетраубиквитин, рекомбинантный метилированный убиквитин (Boston Biochem, США).

Ингибиторы и субстраты протеасомы: MG-132 (карбоксибензоил-L-лейцил-Lлейцил-L-лейциналь) (Boston Biochem, США), ингибитор протеасомы PS-341 (PS-341) (LC laboratories, США), β5i-специфический пептидилэпоксикетон, а также β5i-специфический пептидилальдегид были синтезированы в группе синтеза природных соединений ИБХ РАН под руководством И.В.Ямпольского по методике, описаной в [21], субстрат N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Sigma Aldrich, США).

Реактивы для получения клеточных культур и культивирования клеток: рекомбинантные интерлейкин-2 и интерлейкин-7 мыши, селенит натрия, апо-трансферрин,

рекомбинантный цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), рекомбинантный инсулин, биотин, гидрокортизон, трийодтиронин (T3), рекомбенантный интерферн-гамма мыши и человека (Sigma Aldrich, США). Ростовые среды DMEM, opti-MEM и advanced RPMI, фетальная бычья сыворотка (Gibco, США), раствор гентамицина (ПанЭко, Россия).

Эукариотические клетки: клетки линий НЕК293, 293T, HeLa и EL4, первичная культура, была выделена из мозга мышей линии СЗН, обогащенная астроцитами.

Антитела и конъюгаты: антитела к с-тус эпитопу, продуцируемые гибридомой С-МҮС, антитело мыши к β -актину, антитела мыши к субъединицам протеасомы Rpt6, α , β 5, антитела кролика к субъединицам протеасомы β 1i, β 5i, β 1, Rpn13, антитела кролика к убиквитин-лигазе E1 и к полиубиквитиновым конъюгатам (Enzo life sciences, CША), антитела козы к Fc-фрагменту IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела козы к IgM мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела крысы к MBP, антитела кролика к MBP, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела крысы к MBP, антитела кролика к MBP, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела крысы к MBP, антитела кролика к MBP, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела крысы к MBP, антитела кролика к MBP, конъюгированные с пероксидазой хрена, антитела крысы к субъединице протеасомы Rpn10, антитела курицы к HA-эпитопу, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam, Bеликобритания).

Животные: мыши линии Balb/c, мыши линии C3H, мыши линии C57BL/6 (Питомник ФИБХ г.Пущино, Россия); мыши линии SJL (Harlan, Израиль).

Растворы:

TBS: 20 мМ Трис-HCl pH 7,5, 100 мМ NaCl.

PBS: 8,0 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl, 1,15 г/л Na₂HPO₄, 0,2 г/л KH2PO4, pH 7,2.

Конъюгатный буфер для вестерн-блоттинга: TBS, 0,5% BSA или обезжиренное сухое молоко, 0,05% Tween-20.

Буфер для нанесения образцов для электрофореза по Леммли: 50 мМ Трис-HCl pH 6,8, 10% глицерин, 2% SDS, 1% β-меркаптоэтанол, 12,5 мМ ЭДТА, 0,02 % бромфеноловый синий.

Буферный раствор для электрофореза по Леммли: глицин 72 г/л, SDS 5 г/л, Трис-HCl 6,5 г/л, pH 8,3.

Буфер переноса для иммуноблоттинга: 39мМ глицин, 48мМ Трис-HCl, 0.0375% SDS, 20% этанол.

Буферные растворы для выделения протеасомы:

Буфер А: 20 мМ Трис-HCl, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 2 мМ АТФ, 10% глицерина, pH 7.5.

Буфер Б: 20 мМ Трис-HCl, 250 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ, 20% глицерина, pH 7.5

Буфер Г: 20 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ, рН 7.5 Буфер Е: 20 мМ Трис-HCl, 0.1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 0.1 мМ АТФ, 10% глицерина,

pH 7.8

Буфер для хранения: буфер Г + 10% глицерина.

10х ТВЕ: 0.89 М трис, 0.89 М Н₃ВО₃, 20 мМ ЭДТА, pH 8.0.

RIPA буфер: 50мМ Трис-HCl pH 5,5, 150мМ NaCl, 1% NP-40, 0,25% диоксихолат натрия, 1М мочевина.

Бактериальные среды

LB: 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.

LB-агар: LB, 18 г/л агара.

2хҮТ: 16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.

SOB: 20 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 250 мМ KCl, 10 мМ

MgCl₂.

SOC: SOB, 50 мМ глюкоза.

Антибиотики

Раствор ампициллина в воде с концентрацией 50-100 мг/мл.

Раствор зеоцина в воде с концентрацией 50-100 мг/мл.

4.1. Работа с нуклеиновыми кислотами

4.1.1. Амплификация фрагментов ДНК методом ПЦР

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли на приборе Bio-Rad T100 Thermal Cycler (США).

Готовили ПЦР смесь следующего состава:

• буфер Taq/Tersus/Q5 полимеразы

• 10 пМ необходимых праймеров

- по 2 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата
- 1-2 ед. соотвествующей полимеразы

• 0.1-0.2 мкг матричной ДНК

Амплификацию проводили по стандартной схеме, включающей следующие стадии:1) предварительная денатурация 95°С, 3 мин. 1 цикл; 2) денатурация 95°С, 10-30 сек; 3) отжиг праймеров 45-68°С, 10-30 сек; 4) элонгация 72°С, 20 сек-2 мин. 25 циклов; 5) элонгация 72°С, 1-3 мин. 1 цикл

Расчет температуры отжига праймеров (Т) проводили по формуле:

 $T = (2 \times N(A+T)+4 \times N(G+C) \ ^{\circ}C,$

где N - число соответствующих нуклеотидов.

4.1.2. Рестрикция

Рестрикцию проводили в соответствии с методиками производителей ферментов. Рестрикцию ПЦР продуктов вели 2-16 часов, плазмидной ДНК – 1-16 часов, в термостате при 37°С.

4.1.3. Лигирование

Для лигирования использовали ДНК-лигазу фага Т4 и стандартный буферный раствор (Fermentas, Литва) или Rapid Ligation Kit (Fermentas, Литва) согласно инструкции производителя. Лигирование вели в объеме 10 или 20 мкл, при молярном соотношении вектора и вставки 1:10, в течение 1-16 часов при 22°С. Затем лигазную смесь трансформировали методом теплового шока или методом электропорации в клетки XL-1Blue или DH5α, соотвественно. Для трансформации использовали 5-10 мкл лигазной смеси.

4.1.4. Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК осуществлялось с помощью наборов Plasmid Miniprep (Евроген) и GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителей.

4.1.5. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для проведения электрофореза использовали 0.8-2,5% агарозный гель, приготовленный на буфере ТВЕ с бромистым этидием в концентрации 0.5 мкг/мл. Электрофорез вели в буфере ТВЕ при напряжении 5 В/см. По окончании электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм на трансиллюминаторе фирмы LKB или VersaDoc фирмы Bio-Rad.

4.1.6. Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле

Для проведения электрофореза использовали 5% полиакриламидный гель, (акриламида:бисакриламид 19:1), приготовленный на однократном ТВЕ. Толщина аналитического геля составляла 0.75 мм, препаративного – 1.5 мм. По окончании

электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали в ультрафиолетовом свете.

4.1.7. Электроэлюция

Фрагменты ДНК элюировали из агарозных или полиакриламидных гелей. После завершения электрофореза, гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали в ультрафиолетовом свете, далее вырезали нужный фрагмент геля. Очитку ДНК из геля осущесвляли с помощью набора Clean Standart (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя.

4.1.8. Секвенирование плазмидной ДНК

Секвенирование плазмидной ДНК проводили с использованием автоматического секвенатора ABI PRISM.

4.1.9. Секвенирование на платформе Illumina MiSeq

Амплификация образцов и дальнейшее секвенирование были проведены в соответствии с протоколом производителя с использованием с Reagent Kit v2 (2x250).

4.1.10. Создание генетических конструкций

Фрагменты ДНК, кодирующие полноразмерный МВР или других необходимых наработаны методом ПЦР с использованием перекрывающихся белков. были специфических олигонуклеотидов. Полученные ПЦР-продукты были обработаны эндонуклеазами рестрикции NcoI/XhoI или KpnI/XhoI, очищены с помощью электроэлюции, а затем клонированы в вектор pET22N либо pBudCE.EF, обработанные NcoI/XhoI или Kpn/XhoI, соответственно. Лигазной рестриктазами смесью трансформировали клетки Е. coli штамма XL2Blue. Первичный отбор клонов на наличие вставки нужного размера проводили методом ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидов T7rev и T7for или EFfor и Bghrev, комплементарных последовательности плазмидной ДНК. Отобранные положительные клоны были выделены и проанализированы с помощью рестрикции по соответствующим сайтам. Плазмиду, содержащую фрагмент нужного размера, выделяли и определяли ее нуклеотидную последовательность.

4.1.11. Анализ экспрессии генов с помощью микрочиповой системы Affymetrix.

Выделение мРНК осуществляли, как описано в [195]. Образцы мРНК, выделенные из трех независимых образцов клеточной культуры, были смешаны в одинаковом соотношении. Процедура синтеза и мечения кДНК была выполнена с использованием кита Ambion WT Expression Kit (Life Technologies, Darmstadt, Германия) в соотвествтии с инструкциями производителя. В качестве материала использовали 500 нг тотальной РНК, как описано в [196]. Фрагментацию целевой ДНК, гибридизацию на микрочипе Affymetrix GeneChip Mouse Gene 2.0 ST, промывку чипа, окрашивание и сканирование проводили согласно протоколу [197]. Данные сканирования микрочипов были конвертированы в CEL файлы с использованием программного обеспечения сканера и затем были обработаны в Affymetrix Expression Console (build 1.4.1.46) с использованием метода RMA. Достоверная граница кратности изменения была принята равной 1.5. Набор пробосетов, не соответствующих аннотированной открытой рамке считывания, был исключен из анализа. Необработанные данные размещены в Gene Expression Omnibus под учетным номером GSE96899.

4.1.11. Анализ экспресии генов с помощью ПЦР в реальном времени.

Обратная транскрипция РНК в кДНК была осуществлена, как описано в [195], использовались 100 нг РНК в качестве исходного материала. Количественный ПЦР-анализ проводили с использованием реакционной смеси SYRR Green 2,5 × PCR для qPCR (Syntol, Москва, Россия). в [31]. Эффективность всех наборов праймеров была выше 1.93 и ниже 2.06, за исключением H2-K1 (1.81). Все образцы РНК анализировали в трех повторах и затем усредняли. Целевые гены были нормированы на контрольные гены Tpt1, Ap1g1 и Eef1a1, данные обрабатывали с помощью метода $\Delta\Delta$ Ct. Выбор и валидацию эталонного гена осуществляли с использованием подхода, описанного в [195].

4.2. Работа с белками

4.2.1. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили по стандартной методике Лэммли. Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения, прогревали в течение 5 минут при 95°С, наносили на гель и проводили электрофорез при напряжении 90 В до выхода краски из разделяющего геля.

4.2.2. Иммуноблоттинг

Проводили гель-электрофорез белков в денатурирующих условиях по Лэммли с использованием предокрашенного белкового маркера (Fermentas, Литва). Отделяли разделяющий гель и проводили перенос на мембрану HyBond C extra (Amersham, CША). Электроперенос вели в течение 1 часа при силе тока 0,8 мА/см2. По окончании процесса мембрану помещали в блокирующий раствор, содержащий 5% БСА или сухого молока в PBS, и инкубировали 1 час. Гибридизацию с антителами проводили в конъюгатном буфере течение 1 часа. Связавшиеся антитела проявляли антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Далее после тщательной отмывки наносили проявляющий раствор ECL-Developing Kit или ECL-Plus Kit и проявляли, согласно методике фирмыпроизводителя. Денситометрический анализ результатов вестерн-блоттинга, а также электрофореза по Лэммли, проводили с помощью программы Quantity One.

4.2.3. Иммунопреципитация

Иммунопреципитация осуществлялась с помощью ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich, CША). Все процедуры были проведены в соответствии с инструкциями производителя. Смолу ANTI-FLAG M2 Affinity Gel брали из расчета 40 мкл на пробу и промывали один раз RIPA буфером. Затем от исследуемых клеток отбирали среду, промывали их PBS, после чего для лизирования добавляли 1 мл RIPA буфера и инкубировали на льду в течение 20 минут. Далее клеточные лизаты переносли в пробирки и ресуспендировали. 200 мкл смеси отбирали в отдельную пробирку (input), к остальной части смеси добавляли промытую смолу и перемешивали на шейкере при +4°C в течении 1 часа. После этого смолу 3 раза промывали RIPA буфером. Элюировали 100 мкл однократного буфера для нанесения образцов для электрофореза по Леммли. Элюат прогревали на +95°C и наносили на полиакриламидный гель по 25 мкл. К исходной смеси (input) добавляли 50 мкл четырехкратного буфера для нанесения и наносили по 35 мкл. Далее проводили иммуноблоттинг по методике, описанной выше.

4.2.4. Фракционирование протеасомы ультрацентрифугированием

Гомогенат головного мозга мыши в буфере А центрифугировали от дебриса при 1500g, $+4^{\circ}$ C 30 минут, затем супернатант отделяли и центрифугировали при 15000g, $+4^{\circ}$ C, 30 минут. К супернатанту добавляли MBP и 1мкМ PS-341 и наносили 0,8 мл полученной смеси на центрифужный стакан с градиентом глицерина 10-55% в 24 мл в буфере 25 мМ Tris-HCl pH 7.5, 1 мМ DTT, and 4 мМ ATP. Центрифугировали при 125000 g и $+4^{\circ}$ C в

течение 16 часов. Отбирали фракции по 1 мл каждая и определяли в них присутствие протеасомы по активности по флуорогенному субстрату Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC в присутствии 0,02% SDS (активация 20S протеасомы и ингибирование 26S протеасомы) и в отсутствии 0,02% SDS (активация 26S протеасомы и ингибирование 20S протеасомы).

4.2.5. Анализ активности протеасомы in vitro

Очищенный препарат 26S протеасомы был выделен из клеток EL4 или HEK293T по методике, описанной в [8]. К протеасоме (10 мкг/мл в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитола, 1 мМ АТФ) добавляли ингибиторы в указанных концентрациях и инкубировали 30 минут при 37°С. После этого в реакционную смесь добавляли пептидный субстрат Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-4-амино-7-метилкумарин и измеряли скорость его гидролиза по увеличению флуоресценции (поглощение 360 нм, эмиссия 430 нм).

4.2.6. Выделение, ацетилирование и деиминирование МВР

МВР выделяли из головного мозга коровы по методике, описанной в [198], методом химической экстракции с последующей обращенно-фазовой хроматографией на препаративной колонке C4 10/250 (Mashery-Nagel, Германия) на HPLC-хроматографе Waters 1525 (Millipore, CША) в градиенте ацетонитрила 0-80% в 15 объемах колонки. Во всех растворах присутствовала 0.1% трифторуксусная кислота в качестве ион-парного агента. Чистоту полученного препарата MBP определяли электрофорезом в ПААГ по Лэммли.

MBP энзиматически деиминировали по методике, описанной в [199], инкубируя MBP с пептидиларгининдеиминазой (PAD) (Sigma Aldrich, CША) при 52°C в буфере, содержащем HEPES, 5мM CaCl₂, 2мM DTT, pH 7.6. Реакцию останавливали кипячением в течение 5 минут. После ацетилирования или деиминирования MBP очищали на аналитической колонке C4 4.0/150 (Dr. Maisch GmbH, Германия) на HPLC-хроматографе Waters 1525 (Millipore, CША) в градиенте ацетонитрила 0-40% в 15 объемах колонки.

4.2.7. Протеолиз белков in vitro

Гидролиз белков (1-3 мкг) протеасомой осуществляли в объеме реакции 12.5 мкл в реакционной смеси, содержащей 20 мМ Tris (pH 7.5), 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, и очищенную 26S протеасому (0.25 мкг). Реакционную смесь инкубировали при 37°C, реакцию останавливали добавлением буфера для нанесения образцов для электрофореза по Лэммли.

Образцы анализировали методом электрофореза по Лэммли с последующим окрашиванием красителем Кумасси R-250.

4.2.8. In vitro трансляция

Белки rhMBP и p105 транслировали *in vitro* в присутствии L-[³⁵S]-метионина с использованием кита TnT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, USA) в соответствии с инструкциями производителя.

4.2.9. Получение и фракционирование лизата ретикулоцитов

Ретикулоциты получали из кроликов, далее лизаты подготавливали и фракционировали на DEAE целлюлозе на Фракцию I а II, как описано в [200].

4.2.10. Конъюгация MBP in vitro.

Конъюгацию белков осуществляли в объеме 12.5 мкл. Реакционная смесь содержала 20 мМ Tris pH 7.5, 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, а также следующие компоненты, если это было необходимо: Фракция II (60 мкг), экстракт HeLa или BALB/с (60 мкг), убиквитин (5,0 мкг), E1 (0,25 мкг), рекомбинантный UbcH5c с 6xHis-эпитопом (0.75 мкг), ATPγS (2.0 мМ), ATP (1.0 мМ), MG-132 (200 мкМ), PS-341 (1,0 мкМ), и очищенную протеасому (0,25 мкг). Смеси инкубировали при температуре 37°, реакцию останавливали добавлением буфера для нанесения проб на ПААГ. Белки разделяли электрофоретически и визуализировали различными методами в зависимости от начальной концентрации субстрата: [³⁵S]-меченые белки (10,000 срm) с помощью PhosphorImager (Fuji, Japan), 0,1 мкг белка с использованием иммуноблоттинга, и 1,5 мкг белка – окрашивание Кумасси.

4.3. Хроматографические процедуры

4.3.1. Выделение протеасомы.

Клетки осаждали из ростовой среды центрифугированием на 800g. Суспензию клеток ресуспендировали в равном объеме буфера А, гомогенизировали в стеклянной ступке, три раза проводили цикл замораживания в жидком азоте и размораживания. Центрифугировали от дебриса при 1500g, $+4^{\circ}$ C, 30 минут, затем супернатант отделяли и центрифугировали при 13200g, $+4^{\circ}$ C, 30 минут. Полученный супернатант осаждали с помощью (NH₄)₂SO₄ в концентрации 40% от насыщения в течение одного часа при $+4^{\circ}$ C. Центрифугировали при 13200g, $+4^{\circ}$ C, 30 минут, осадок отделяли от супернатанта. При добавлении к полученному супернатанту (NH₄)₂SO₄ до концентрации 70% от насыщения в осадок выпадала фракция, содержащая 20S протеасому. Осадок от высаливания 40%

 $(NH_4)_2SO_4$ ресуспендировали в буфере Б, полученный раствор центрифугировали 13200g, +4°C, 10 минут для удаления нерастворившихся компонентов. Полученный таким образом раствор наносили на колонку Superose 6, уравновешенную буфером Б, и вели элюцию буфером Б на скорости 0,3 мл/мин. Собранные фракции анализировали на присутствие протеасомы, измеряя скорость гидролиза модельного пептидного субстрата Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA.

Фракции, содержащие протеасому, диализовали против буфера E, содержащего 0,275 M NaCl. Полученный раствор наносили на колонку MonoQ, уравновешенную буфером E, содержащего 0,275 M NaCl, и промывали 10 объемами данного буфера, затем проводили элюцию градиентом NaCl с 0,275 M до 1 M в 20-25 объемах буфера E. Собранные фракции анализировали на присутствие протеасомы, измеряя скорость гидролиза модельного пептидного субстрата. Фракции, содержащие протеасому, переводили в буфер для хранения (буфер Г, содержащий 10% глицерина) с помощью диализа.

4.3.2. Выделение и очистка рекомбинантных белков

Для проведения препаративной экспрессии компетентные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) были трансформированы методом электропорации конструкцией, содержащей нуклеотидную последовательность необходимого рекомбинантного белка в составе вектора pET-32b(+). Культуру клеток выращивали в подобранных условиях: в течение 1.5 часов при 37°C до оптической плотности 0.6, с последующей индукцией 1 мМ IPTG 3 часа при 37°C. Поскольку рекомбинантные белки содержали (His)₆ кластеры, их выделение из клеточного лизата проводили с применением металл-хелатной хроматографии. Дальнейшую очистку осуществляли гель-проникающей хроматографией на колонке Superdex75. Гомогенность полученного препарата, которая составляла более 95%, контролировали электрофоретически с последующим окрашиванием Кумасси или иммуноблоттингом.

Для препаративной экспрессии культуру клеток выращивали в подобранных условиях: в течение 1.5 часов при 37°С до оптической плотности 0.6, с последующей индукцией 1 мМ IPTG 1.5 часа при 42°С. Через полчаса после индукции к клеткам добавляли антибиотик рифампицин до концентрации 200 мкг/мл для блокирования работы прокариотических PHK-полимераз и тем самым для увеличения экспрессии белка. Практически весь экспрессированный белок содержался в нерастворимой форме в тельцах включения.

Дополнительно нами была оптимизирована схема очистки рекомбинантного основного белка миелина и его делеционных мутантов. На первой стадии нами была использована металл-хелатная хроматография клеточных лизатов на колонке Ni-NTA в денатурирующих условиях. Далее все белки экстрагировали из элюата смесью хлороформметанола (1:3), после этого осаждали насыщенным сульфатом аммония и переосаждали ацетоном в присутствии соляной кислоты. Дальнейшую очистку вели с использованием обращенно-фазовой хроматографии на колонке C4. Гомогенность полученных препаратов контролировали электрофоретически с последующим окрашиванием Кумасси и методом иммуноблоттинга. Чистота белка составляла более 95%.

4.3.3. Обращенно-фазовая хроматография

Обращенно-фазовую хроматографию проводили с использованием аналитической колонки C4 4.0/150 (Dr. Maisch GmbH, Германия) и препаративной колонки C4 10/250 (Mashery-Nagel, Германия) на HPLC-хроматографе Waters 1525 (Millipore, CША) в градиенте ацетонитрила 0-40% или 0-80% в 15 объемах колонки. Во всех растворах присутствовала 0.1% трифторуксусная кислота в качестве ион-парного агента.

4.3.4. Метод поверхностного плазмонного резонанса

Измерения поверхностного плазмонного резонанса проводили на приборе Biacore T200 optical biosensor (GE Healthcare) в Научно-образовательном центре нанотехнологий РАН Санкт-Петербургского академического университета. Все процедуры выполнялись при 20°С с использованием стандартных чипов для иммобилизации CM5 sensor chips и фирменного буфера HBS (pH 7.4, 0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.05% сурфактанта P-20). MBP иммобилизовали на чипе (до достижения относительного сигнала иммобилизации ~3500 RU) с использованием амино-сшивающего кита, следуя рекомендациям производителя. Очищенные антитела добавляли в качестве аналита при различных концентрациях. Поверхность чипов регенирировали между различными аналитами промывкой 10 mM глициновым буфером, pH 2.5. Диаграммы ППР анализировали для определения динамических констант диссоциации (KD, ka, kd), применяя кинетическую модель связывания Langmuir 1:1 (одна молекула аналита взаимодействует с одной молекулой лиганда).

4.4. Методы работы с бактериями Escherichia coli.

4.4.1. Получение электрокомпетентных клеток

Клетки из музея высевались на чашку Петри с 2хҮТ-агаром без антибиотика, инкубировались 14-20 часов при 37°С в воздушном термостате. Отдельную колонию высевали в 5 мл 2хҮТ без антибиотика для получения ночной культуры и растили при 37°С. Ночную культуру высевали в конические колбы, содержащие по 250 мл среды SOB, и растили при 37°С до оптической плотности 0.4-0.6 ОЕ, но не более двух часов. Затем клетки охлаждали во льду, переносили в стерильных условиях в охлажденные центрифужные стаканы и центрифугировали 10 минут 5000 об/мин при 4°С на центрифуге Beckman J-21. Далее клетки ресуспендировали в небольшом объеме ледяной стерильной воды, еще раз центрифугировали в тех же условиях. Повторяли промывку водой два раза, затем клетки промывали охлажденным 10% глицерином. Осадок суспендировали в 2-3 мл 10% глицерина, разносили по 80-100 мкл в стерильные охлажденные эппендорфы, после чего замораживали в жидком азоте и хранили при –70°С. Компетентность клеток проверялась трансформацией плазмидой с известной концентрацией и принималась равной количеству выросших колоний, поделенной на количество плазмиды в мкг.

4.4.2. Получение химически компетентных клеток

Клетки из музея высевались на чашку Петри с 2хYT-агаром без антибиотика, инкубировались 14-20 часов при 37°C в воздушном термостате. Отдельную колонию высевали в 5 мл 2хYT без антибиотика для получения ночной культуры и растили при 37°C. Ночную культуру высевали в конические колбы, содержащие по 250 мл среды SOB, и растили при 37°C до оптической плотности 0.3-0.6 OE, но не более двух часов. После этого клетки охлаждали и переносили в пробирки объемом 1,5 мл. Центрифугирование производили при 10.000 об/мин в течение 20-60 секунд. После удаления супернатанта к клеткам добавляли 80-100 мкл холодного раствора 50мM CaCl₂ + 10мM MgCl₂ + 20% глицерина, в котором осадок суспендировали. Далее клетки замораживали в жидком азоте и хранили при -70° C.

4.4.3. Трансформация клеток E. coli методом электропорации

Электропорация проводилась на приборе фирмы Genetronics согласно инструкции производителя. К размороженной на льду аликвоте (80-100 мкл) электрокомпетентных клеток добавляли раствор плазмиды или очищенную и обессоленную лигазную смесь, перемешивали, переносили клетки в охлажденную кювету и осуществляли электропорацию

(1.2-1.4 кV/5.19-5.22 мс). Затем клетки переносили в 1 мл теплой среды SOC без антибиотиков, инкубировали в воздушном термостате при 37°C 1 час для репарации клеточной стенки и начала экспрессии генов устойчивости к селективным антибиотикам. Далее высевали на чашку Петри с 2хYT-агаром, с добавлением селективных антибиотиков, и помещали в воздушный термостат на 37°C на 14-16 часов.

4.4.4. Трансформация клеток E. coli методом теплового шока

К размороженной на льду аликвоте (100 мкл) химически компетентных клеток добавляли раствор плазмиды или очищенную и обессоленную лигазную смесь, перемешивали. Далее клетки ставили в термостат на 42°C на 45 сек и после этого в лед на 3-5 минут. Далее клетки переносили в 1 мл теплой среды SOC без антибиотиков, инкубировали в воздушном термостате при 37°C 1 час для репарации клеточной стенки и начала экспрессии генов устойчивости к селективным антибиотикам. Далее высевали на чашку Петри с 2хYT-агаром, с добавлением селективных антибиотиков, и помещали в воздушный термостат на 37°C на 14-16 часов.

4.4.5. ПЦР с колоний

Готовили двукратную смесь для ПЦР следующего состава (в расчете на одну колонию):

- 2 мкл 10х буфера для Таq-полимеразы
- по 10 пМ необходимых праймеров
- по 2 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата

• вода до 10 мкл.

Полученный раствор разносили по пробиркам (по 10 мкл). Бактериальные колонии переносили в пробирки и проводили ПЦР. Продукты полимеразной цепной реакции анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

4.4.6. Ночная культура

Бактериальную колонию помещали в 5 мл среды LB или 2xYT с добавлением селективного антибиотика, наращивали клетки при 37°C и интенсивной аэрации около 12-16 часов.

4.5. Методы работы с эукариотическими клетками линии.

4.5.1. Поддержание в культуре эукариотических клеток линии НЕК.

Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки и 2мM L-глутамина, в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ во флаконах (25 см²). При достижении монослоя клетки рассевали. Отбирали культуральную среду, клетки промывали 5 мл стерильного PBS, потом добавляли 0.5 мл 0.25% раствора трипсина и инкубировали 3-5 минут при 37°C до открепления клеток. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в среде DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки. Далее клетки рассевали 1/5 по объему суспензии.

4.5.2. Приготовление музея эукариотических клеток

При достижении 100% конфлюэнтности клетки открепляли от культуральной поверхности обработкой раствором трипсина. Клеточную суспензию помещали в стерильные пробирки для центрифугирования и осаждали при 800 g и температуре 10-15 °C в течение 10 минут. Супернатант декантировали. Клеточный осадок незамедлительно ресуспендировали в смеси 90% бычьей фетальной сыворотке и 10% ДМСО из расчета 1 мл на 2-3 миллиона клеток. Клеточную суспензию переносили в заранее подписанные криовиалы и помещали на -20°C на 1-2 часа до замораживания. Затем криовиалы переносили на -80°C и хранили 2-3 недели. Затем замороженные клетки переносили на хранение в жидкий азот.

4.5.3. Выведение линии эукариотических клеток из заморозки

Криовиал с клетками размораживали в термостате при температуре 37°С в течение 1-2 минут. Клеточную суспензию незамедлительно переносили в стерильную центрифужную пробирку с 8-10 мл холодной бессывороточной среды и центрифугировали при 800 g и температуре 10-15°С в течение 10 минут. Супернатант декантировали. Клеточный осадок незамедлительно ресуспендировали в смеси 5 мл теплой среды с 10% бычьей фетальной сыворотки. Суспензию клеток переносили в культуральный флакон (25 см²) и помещали в инкубатор при 37°С, 5% СО2 и влажности 98%.

4.5.4. Трансфекция эукариотических клеток методом липофекции.

Липофекцию проводили с использованием Lipofectamine3000/2000/LTX (Invitrogen, США) согласно рекомендации производителя. За день до проведения трансфекции высевали 2-6·10⁴ клеток линии НЕК293 в лунки 24/48-луночного планшета в 500/250 мкл

среды DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки. После трансфекции клетки инкубировали в течение 1-3 дней при 37 °С.

4.5.5. Получение культуры астроцитов

Астроциты получали из головного мозга мышат линии C3H/Не возрастом 3 дня. Все процедуры с мышами проводились в соответствии с протоколами Комиссии ИБХ РАН по контролю за содержанием и использованием животных по методике, описанной в [201]. Первичную культуру, содержащую астроциты и олигодендроциты, культивировали в течение 8 дней. Далее астроциты отделяли от остальных клеток, как описано в [201]. Разделение происходило по принципу различной силы адгезии при качании культуральных флаконов на орбитальной качалке со скоростью 250 оборотов/мин и амплитудой 2.5 см в течение 12 часов. Клетки, находвшиеся в суспензии, содержащие олигодендроциты, удаляли, а адгезионные клетки промывали средой. Клетки снимали с флакона при помощи EDTA и далее высевали на 48-луночные культуральные планшеты в количестве 3×10^4 /см². Полученные клетки культивировали в сбалансированной соляной среде Basal Medium Eagle's, содержащей 15% фетальной сыворотки, 0.1% глутамина, and 0.6% глюкозы. Клетки в трех независимых повторностях были обработаны рекомбинантным мышиным γ IFN (Sigma, 14777, St. Louis, MO, USA) в концентрации 250 IU/мл, или бензтропином в концентрации 2.0 мкМ, за 48 часов до анализа.

4.5.6. Сортировка клеток с помощью проточной цитометрии

Клетки линий НЕК293 или НЕК293Т открепляли от чашек с помощью обработки раствором 0,25% трипсина. Для удаления трипсина суспензию клеток центрифугировали при 900 об./мин (Multi centrifuge CM6M) в течение 10 минут, супернатант отбирали и ресуспендировали клетки в 1 мл раствора PBS. Для проточно-цитофлуориметрического анализа использовали цитометр BD Facs Aria III (BD Biosciences-US, CША). Для детекции флуоресценции белков, меченных резоруфином, использовали следующие параметры: возбуждение лазером 561 нм и регистрация сигнала в полосе фильтра 610/20. Флуоресценцию белка ZsGreen возбуждали лазером 488 нм с регистрацией сигнала в полосе фильтра 530/30. Флуоресценцию BFP возбуждали лазером 405 нм с регистрацией сигнала в полосе фильтра 450/20. Для каждого образца детектировали как минимум 30,000 событий.

4.6. Работа с мышами

4.6.1. Определение максимальной толерантной дозы β1i-специфического пептидилальдегида IPSI-001

Исследуемое вещество вводили интраперитонеально мышам линии C3H/He (n=5) в дозировке 10 и 100 мг/кг. Состояние животных оценивали в течение следующих 48 ч, с последующим патоморфологическим анализом.

5. Результаты и обсуждение

5.1. Исследование взаимосвязи структуры полиубиквитиновой цепи и эффективности деградации протеасомных субстратов

Протеасома гидролизует подавляющее большинство (по меньшей мере 80%) белков в клетках млекопитающих. Она способна быстро разрушать нефолдированные и завершившие свою функцию регуляторные белки, а также остальную массу клеточных белков, но с несколько меньшей скоростью [202]. Очевидно, что корректное функционирование протеасомы необходимо для поддержания белкового гомеостаза клетки и регуляции большинства клеточных процессов, а ингибиторы протеасомы, в свою очередь, являются как незаменимыми исследовательскими инструментами, так и важными терапевтическими агентами.

После открытия роли убиквитина Ub [203] и протеасомы в деградации субстратов, конъюгированных с Ub [204], предполагалось, что сам факт протеолиза белка и скорость деградации регулируются исключительно с помощью убиквитинирования. его Последующие наблюдения показали, что убиквитинирование и даже ассоциация убиквитинированного белка с протеасомой не обязательно приводят к его деградации [58][118]. Таким образом, протеасома – это не просто «машина» для эффективного разрушения конъюгатов и рециркуляции убиквитина, этот сложный протеолитический способен комплекс также самостоятельно определять, подвергнется ЛИ убиквитинированный белок деградации или же останется интактным.

В настоящий момент убиквитин-зависимый протеолиз является объектом исследования множества научных групп по всему миру, тем не менее многие функции и свойства как протеасомы, так и убиквитина остаются не до конца проясненными. Одной из самых больших трудностей является непосредственное наблюдение за протеасомопределенное разнообразие, опосредованным гидролизом белков. Несмотря на существующие на настоящий момент методики довольно ограничены и имеют множество недостатков, например, использование веществ, ингибирующих белковый синтез, может довольно сильно повлиять на клеточный метаболизм, а присоединение к исследуемому белку ДНК-кодируемых флуорофоров может приводить к драматическому изменению его субстратных свойств. В настоящей работе для решения этой задачи нами было предложено использовать panee опубликованный метод PRIME (PRobe Incorporation Mediated by Enzymes), основой которого является модифицированная липоат-лигаза типа A (LplA), способностью in vivo ковалентно которая обладает присоединять молекулу низкомолекулярного флуорофора резоруфина к остатку лизина в составе специфической

13-членной аминокислотной последовательности (LAP2), слитной с белком-мишенью. Кроме того, было показано, что мутагенез субстрат-связывающего кармана лигазы, позволяет ей присоединять к пептиду LAP2 различные синтетические маленькие молекулы, например, алкилазиды [206] или флуорофор кумарин [207]. С нашей точки зрения представлялось интересным апробировать данную методику для анализа внутриклеточного гидролиза белков протеасомой в физиологических условиях, включая метаболизм убиквитина – важнейшего белка убиквитин-протеасомной системы, а также полиубиквитинированных цепей разного типа ветвления.

5.1.1. Подбор оптимальных условий для внутриклеточного энзиматического мечения белков резоруфином

Для внутриклеточного мечения белков, содержащих акцепторный пептид лигазы (LAP2) (13 аминокислот), низкомолекулярным флуорофором резоруфином (ex/em 560/585 нм) нами был использован вариант липоат-лигазы LplA, содержащий три мутации в активном центре E20A/F147A/H149G [далее LplA (AAG)] [208]. Резоруфин был выбран авторами работы [208] в качестве субстрата для лигазы вследствие его относительно небольшой массы в сравнении с Cy5 и Atto 647N, которые настолько громоздки, что для размещения этих флуорофоров в активном центре липоат-лигазы потребовались бы серьезные изменения в полипептидном остове. Еще одним важным преимуществом резоруфина является отсутствие неспецифического связывания с внутриклеточными структурами, что, например, сильно ограничивает применение для *in vivo* визуализации относительно небольших бор-дипиррометенов (BODIPY). Спектральный диапазон резоруфина перекрывается с широко используемым белком mCherry, но при этом он в два раза ярче и сопоставим по этой характеристике с Су3. Помимо обычного использования в световой микроскопии, резоруфин можно также применять для микроскопии на уровне отдельных молекул [209], флуорофор-опосредованной световой инактивации хромофоров [210] и создания контраста для электронной микроскопии в процессе фотоокисления [211]. Таким образом, совокупность фотофизических характеристик делает резоруфин наиболее подходящим флуорофором для использования в методе PRIME.

На начальном этапе необходимо было подобрать оптимальные условия для внутриклеточного мечения белков резоруфином. Чтобы синхронизировать экспрессию исследуемого белка и LplA (AAG), были созданы лентивирусные векторы, кодирующие интересующий нас белок в единой рамке считывания с 3FLAG эпитопом и пептидом LAP2 и слитный белок ZsGreen1-LplA (AAG), где ZsGreen1 – зеленый флуоресцентный белок,

соединенные сайтом внутренней посадки рибосомы (IRES, Internal Ribosome Entry Site), под контролем CMV промотора (**Рис. 11A**). Клетки линии НЕК293, предварительно трансдуцированные полученными лентивирусными конструкциями И стабильно экспрессирующие основной белок миелина (МВР-LAP2), являющийся протеасомным субстратом [191], и ZsGreen1-LplA (AAG), обрабатывали различными концентрациями резоруфина и инкубировали в течение 20 и 60 минут. Затем клетки многократно промывали средой DMEM для удаления непрореагировавшего субстрата, лизировали и лизаты анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей двухцветной флуоресцентной визуализацией в геле. По результатам данного эксперимента были выбраны оптимальные условия для внутриклеточной модификации белков. Инкубация с резоруфином осуществлялась в течение 20 мин при концентрации последнего 5 мкМ (Рис. 11Б). При увеличении концентрации флуорофора и времени инкубации затрудняется процесс вымывания из клеток несвязавшегося резоруфина, что, в свою очередь, может осложнить интерпретацию результатов.



Рисунок 11. (А) Схема лентивирусной конструкции, кодирующей бицистронную мРНК, содержащую последовательности исследуемого белка, участок внутренней посадки рибосомы (IRES, Internal Ribosome Entry Site) и зеленого флуоресцентного белка ZsGreen1, слитного с модифицированной LplA (AAG) лигазой (вверху). Схема сайт-специфической конъюгации белка, слитного с пептидом LAP2, с резоруфином (внизу). (Б) Электрофоретический анализ сайт-специфической внутриклеточной модификации MBP-LAP2

резоруфином под действием LplA (AAG) при различной концентрации резоруфина и времени инкубации клеток с субстратом.

5.1.2. Изучение внутриклеточного гидролиза белков протеасомой в физиологических условиях с использованием методики PRIME

Далее с использованием методики PRIME нами была изучена внутриклеточная деградация MBP, белка со средним временем полужизни, и дигидрофолатредуктазы (DHFR), которая не является субстратом протеасомы [212], в сравнении с классическим методом «pulse-chase». Для мониторинга внутриклеточного протеолиза клетки HEK293, трансфицированные указанными конструкциями, обрабатывали циклогексимидом CHX – реагентом, блокирующим рибосомальный синтез белка, чтобы процесс синтеза белка не интерферировал с его протеолизом. В качестве контроля использовались клетки, обработанные ДМСО. Как и ожидалось, количество резоруфин-меченного MBP-LAP2 уменьшалось независимо от добавления СНХ вследствие гидролиза белка протеасомой, тогда как тотальное количество MBP-LAP2, измеренное с помощью иммуноблоттинга, уменьшалось только в случае ингибирования синтеза белка (Рис. 12А и 12Б). При этом деградация MBP-LAP2 однозначно осуществлялась протеасомой, так как при добавлении ингибитора протеасомы MG-132 его количество с течением времени не изменялось. В случае DHFR-LAP2 общее количество и количество белка, модифицированного резоруфином, в течение 4 часов значительно не менялось. Интересно отметить, что в ингибитора MG-132 присутствии протеасомы ΜЫ выявили появление моноубиквитинированной DHFR (**Рис. 12А**) – модификации, осуществляемой убиквитинлигазой MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) [213]. Флуоресцентная микроскопия живых клеток подтвердила отсутствие сигнала, соответствующего резоруфину, в клетках, экспрессирующих МВР-LAP2, обработанных циклогексимидом СНХ или ДМСО, спустя 4 часа после мечения, в то время как флуоресценция в красной области присутствовала в клетках, инкубированных с ингибитором протеасомы в присутствии СНХ или без него (Рис. 12В). В случае клеток, экспрессирующих DHFR-LAP2, уровень флуоресценции не менялся.



Рисунок 12. (А) Клетки НЕК293, экспрессирующие MBP-LAP2 или DHFR-LAP2, были обработаны резоруфином (Res) и далее инкубированы в присутствии или в отсутствии ингибитора протеасомы MG-132. Далее клетки лизировали, а клеточные лизаты анализировали с помощью флуоресценции в геле и иммуноблоттинга с использованием смеси антител против FLAG-эпитопа и актина. На нижней панели представлено наложение красной и зеленой флуоресценции с хемилюминесцентным сигналом иммуноблоттинга. (Б) Клетки НЕК293, экспрессирующие MBP-LAP2 или DHFR-LAP2, были обработаны резоруфином (Res) и инкубированы в присутствии или в отсутствии циклогексимида (CHX) в течение различных промежутков времени. Далее был проведен анализ клеточных лизатов методом электрофоретического разделения в ПААГ и последующей визуализацией флуоресценции в геле, а также иммуноблоттинг с использованием антител против FLAG-эпитопа или актина. (B) Клетки НЕК293, экспрессирующей визуализацией флуоресценции в геле, а также иммуноблоттинг с использованием антител против FLAG-эпитопа или актина. (B) Клетки НЕК293, экспрессирующей визуализацией флуоресценции в геле, а также иммуноблоттинг с использованием антител против FLAG-эпитопа или актина. (B) Клетки НЕК293, экспрессирующей визуализацией флуоресценции в геле, а также иммуноблоттинг с использованием антител против FLAG-эпитопа или актина. (B) клетки НЕК293, экспрессирующие MBP-LAP или DHFR-LAP, были обработаны резоруфином (Res) и инкубированы в присутствии или в отсутствии СНХ и MG-132. Через 4 часа флуоресценцию внутриклеточного резоруфина визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии.

С применением методики PRIME нами было установлено время полужизни белков MBP и DHFR в клетке (**Puc. 13A и 13Б**): оно составило 2,5 и 9 часов, соответственно. Полученные нами данные согласуются с ранее опубликованной работой, где время полужизни DHFR измерялось классическим методом «pulse-chase» с введением радиоактивной метки ³⁵S-метионина [214]. Анализ времени полужизни белков путем

остановки рибосомального синтеза с использованием циклогексимида CHX показал для MBP и DHFR примерно 2 и 12 часов, соответственно.

Таким образом, было показано, что метод PRIME подходит для изучения метаболизма внутриклеточных белков, при этом обладая рядом ощутимых преимуществ перед используемыми в настоящее время методиками. Наблюдение за меченными белками может осуществляться различными способами, в том числе с помощью анализа их флуоресценции в ПААГ и использованием флуоресцентной микроскопии. Кроме того, присоединение 13-членного пептида LAP2 к исследуемым белкам минимально влияет на их метаболизм, также не требуется предварительная изоляция белка и подавление его синтеза клетке.



Рисунок 13. Клетки НЕК293, экспрессирующие MBP-LAP2 (A) или DHFR-LAP2 (Б), обработали резоруфином (Res) и далее инкубировали в присутствии или в отсутствии циклогексимида (CHX) в течение указанных временных промежутков; контрольные клетки обрабатывали ДМСО. Далее клеточные лизаты анализировали с помощью флуоресценции в геле и иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-эпитопа и актина (сверху). Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанной временной точке к количеству исходного белка (снизу).

5.1.3. Анализ внутриклеточной деградации белков с применением

комбинации методов PRIME и проточной цитометрии

На следующем этапе мы оценили принципиальную возможность мониторинга внутриклеточной деградацией белков на уровне отдельных клеток. Для этого мы проанализировали изменение уровня зеленой и красной флуоресценции во времени в клетках, обработанных резоруфином и предварительно трансдуцированных конструкцией MBP-LAP2-IRES-ZsGreen-LpIA(AAG). Как можно видеть из данных проточной

цитометрии, приведенных на Рис. 14А, флуоресценция резоруфина в популяции клеток, обладающих и красной и зеленой флуоресценцией, снижалась со временем, в то же время в клетках, дополнительно обработанных ингибитором протеасомы PS-341, это снижение происходило значительно медленнее. Сравнение флуоресценции резоруфина в клетках, экспрессирующих MBP-LAP2, с контрольными «пустыми» клетками, обработанными резоруфином, показало, что клетки с MBP-LAP2 становятся полностью идентичны «пустым» клеткам через 4 часа после модификации белка резоруфином (Рис. 14Б). Используя логически выбранные области на гистограмме распределения клеток, соответствующие клеткам с флуоресценцией ZsGreen (G1), и одновременно с низкой (G2) флуоресценцией резоруфина (G3), с применением флуоресцентноили высокой (FACS) активированной сортировки клеток были отобраны нами клетки С соответствующим фенотипом. Анализ соответствующих клеточных лизатов показал, что наблюдаемый сдвиг обусловлен миграцией клеток, экспрессирующих MBP-LAP2, из фракции G3 в G2 (Рис. 14В и 14Г).



Рисунок 14. (А, Б, В) Клетки НЕК293, экспрессирующие MBP-LAP2, обработали (Res) и далее инкубировали в присутствии ДМСО или ингибитора протеасомы PS-341. Далее клетки делили на фракции с использованием проточной флуоресцентно-активированной клеточной сортировки (FACS) через указанные временные

промежутки. Графики представляют собой наложение данных полученных проточной цитометрией. (Г) Клетки, разделенные на фракции с помощью FACS (показаны на (А)), лизировали и далее лизаты анализировали с использованием флуоресценции в ПААГ и иммуноблоттинга с применением антител против FLAG-эпитопа (слева). Графики справа соответствуют относительным значениям флуоресценции меченого резоруфином MBP-LAP2, нормализованного на сигнал ZsGreen1, и хемилюминесцентного сигнала иммуноблоттинга, соответствующего MBP-LAP2, нормализованного на сигнал ZsGreen1, в отсортированных фракциях в зависимости от времени.

В дополнение к стабильному белку DHFR и MBP со средним временем полужизни был гидролизующийся искусственный Ub-зависимый создан быстро субстрат. представляющий собой DHFR-LAP2, слитный с Ub своей N-концевой частью (Ub-DHFR-LAP2). Два С-концевых глицина в последовательности убиквитина были заменены на валин, чтобы предотвратить преждевременное удаление Ub с белка деубиквитинирующими ферментами (DUB). Анализ популяций G2 и G3 клеток, трансдуцированных конструкциями, кодирующими MBP-LAP2, DHFR-LAP2 Ub-DHFR-LAP2, И И обработанных резоруфином, показал, ЧТО после 2 часов инкубации клетки, экспрессирующие DHFR-LAP2, распределялись по фракциям аналогично клеткам в нулевой точке; в то время как клетки, экспрессирующие МВР-LAP2, постепенно перемещались из G3 в G2, а клетки, экспрессирующие Ub-DHFR-LAP2, находились практически полностью во фракции G2 во всех временных точках (Рис. 15В). Для наглядной демонстрации того, что методика PRIME может быть использована для анализа одновременно нескольких белков, клетки НЕК293 времени полужизни были трансдуцированы совместно тремя лентивирусными конструкциями, кодирующими МВР-LAP2, DHFR-LAP2 и Ub-DHFR-LAP2 (Рис. 15Г). Анализ лизатов клеток с низкой и высокой флуоресценцией в красной области показал, что клетки, экспрессирующие DHFR-LAP2, были равномерно распределены по фракциям G2 и G3, тогда как клетки, экспрессирующие MBP и Ub-DHFR, были в основном в фракциях G3 и G2, соответственно (Рис. 15В и 15Д). Суммируя полученные результаты, можно утверждать, что использование метода PRIME позволяет анализировать деградацию белков с помощью проточной цитометрии, кроме того появляется возможность ранжировать полипептидные субстраты в соответствии с их стабильностью в клетке.



Рисунок 15. (А) Клетки, экспрессирующие Ubvv-DHFR-LAP2 или Ubvv-DHFR-LAP2 вместе с DHFR-LAP2, обработали резоруфином и далее инкубировали указанные временные промежутки. Затем клеточные лизаты анализировали с использованием флуоресценции в ПААГ и иммуноблоттинга с использованием смеси антител против FLAG-эпитопа и актина. (Б) Клетки, разделенные на фракции с помощью FACS (данные представлены на панели В), лизировали и затем анализировали с помощью флуоресценции в ПААГ и иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-эпитопа. (В) Клетки, экспрессирующие MBP-LAP2, DHFR-LAP2 или Ubvv-DHFR-LAP2, были обработаны резоруфином и разделены на фракции G2 и G3 с помощью FACS. (Г) Клетки, экспрессирующие одновременно MBP-LAP2, DHFR-LAP2 и Ubvv-DHFR-LAP2, обработали резоруфином и далее инкубировали указанные промежутки времени. Далее клеточные лизаты анализировали с помощью флуоресценции в ПААГ и иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-эпитопа. (В) Клетки, экспрессирующие одновременно MBP-LAP2, DHFR-LAP2 и Ubvv-DHFR-LAP2, обработали резоруфином и далее инкубировали указанные промежутки времени. Далее клеточные лизаты анализировали с помощью флуоресценции в ПААГ и иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-эпитопа или актина. (Д) Клетки, экспрессирующие MBP-LAP2, DHFR-LAP2 и Ubvv-DHFR-LAP2, были обработаны резоруфином и далее проанализированы с помощью проточной цитометрии (указаны соответствующие фракции) через 2 часа после модификации резоруфином. Лизаты отобранных клеток (фракции G2 и G3) были проанализированы с использованием флуоресценции в геле и иммуноблоттинга с использованием сответствующие FLAG-эпитопа и актина.

5.1.4. Определение времени полужизни молекулы убиквитина в клетках млекопитающих

Основная проблема, связанная с невозможностью использования для исследования времени полужизни убиквитина, например, флуоресцентных белков, заключается в том, что длина убиквитина составляет всего 76 аминокислот, поэтому присоединение к нему какого-либо флуорофора большой массы полностью поменяет его субстратные свойства. На настоящий момент из предыдущих исследований известно, что время полужизни убиквитина составляет примерно 10 часов [215], причем 20-25% белка разрушается в лизосомах [216]. Подавляющее большинство имеющихся данных основаны на микроинъекции изотопно-меченного белка, что вызывает определенные сомнения в их релевантности. Поэтому на следующем этапе нами было решено проанализировать метаболизм важнейшего белка убиквитин-протеасомной системы – убиквитина – слитного с LAP2 (LAP2-Ub) своей N-терминальной частью с помощью метода PRIME. Для этого к N-концу убиквитина было добавлено 13 аминокислот, которые, согласно имеющимся литературным данным, не должны повлиять на его физиологические свойства [215]. Сконец белка был сохранен в нативной форме, чтобы обеспечить рекомбинантному LAP2-Ub все функции Ub дикого типа. Клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие LAP2-Ub и ZsGreen-LplA (AAG), инкубировали с резоруфином и дополнительно обрабатывали ингибитором протеасомы PS-341, ингибиторами ферментов деубиквитинирования (DUBs) PR-619 и WP1130 или ДМСО. Альтернативно, сходные операции выполняли в обратном порядке: клетки сначала обрабатывали ингибитором PS-341 и только затем инкубировали клетки с резоруфином. Обе схемы проведения эксперимента привели к накоплению классических полиубиквитинированных (polyUb) цепей, что контролировалось по интенсивности красной флуоресценции клеточных лизатов, нанесенных на ПААГ (Рис. 16А и 16Б), и в живых клетках (Рис. 16В). Данные наблюдения подтверждают успешное встраивание LAP2-Ub в эндогенные полиубиквитиновые цепи. Флуоресцентная микроскопия меченых резоруфином клеток, экспрессирующих LAP2-Ub, показала, что сигнал, соответствующий резоруфину, в значительной степени уменьшается уже через 4-5 часов после удаления флуорофора (Рис. 16Г) в отличие от аналогичных клеток, обработанных PS-341. Исходя из полученных нами данных убиквитин гидролизуется преимущественно протеасомой, так как при добавлении ингибитора протеасомы замедление метаболизма. происходит резкое его Анализ распределения полиубиквитинированных конъюгатов в клетках, обработанных PS-341, осуществленный с помощью флуоресцентной микроскопии, показал, что Ub после 7 часов инкубации компартментализуется в везикулах, фенотипически похожих на лизосомы или аутофагосомы. По-видимому, в компартментах происходит стабилизация Ub вследствие отсутствия там протеасомы (Рис. 16Д). Наблюдаемая компартментализация Ub что соответствует ранее усиливалась в присутствии ингибиторов протеасомы, опубликованным данным об индукции аутофагии посредством PS-341 [217].



Рисунок 16. (А,Б) Клетки, экспрессирующие LAP2-Ub, инкубировали в присутствии ДМСО, ингибитора протеасомы PS-341 или ингибиторов DUB PR-619 и WP1130 и через 6 часов метили резоруфином. (В) Альтернативно, клетки были метили резоруфином и далее инкубированы с PS-341 или без него в течение 6 часов. Флуоресценцию резоруфина визуализировали с помощью ПААГ (А, Б) или флуоресцентной микроскопии (В). (Γ , Д) Клетки, экспрессирующие LAP2-Ub, метили резоруфином и далее инкубированы в присутствии или в отсутствии ингибитора протеасомы PS-341. Клетки фиксировали формальдегидом и визуализировали с использованием флуоресцентной микроскопии через указанные временные промежутки. Стрелки указывают на компартментализацию Ub, меченного резоруфином.

Чтобы более точно оценить время полужизни Ub в клетках млекопитающих, клетки, стабильно экспрессирующие LAP2-Ub, обрабатывали резоруфином в присутствии или отсутствии ингибитора протеасомы PS-341, а затем оценивали интенсивность флуоресценции полиубиквитинированных конъюгатов в ПААГ (Рис. 17А). В процессе анализа полиубиквитиновых конъюгатов, была зафиксирована интенсивная полоса с 25 кДа, идентифицирована массой около которая позднее была как моноубиквитинированный гистон Н2А/Н2А.Х [218] (Рис. 17А). Анализ полученных данных свидетельствует о том, что количество LAP-Ub как в полиубиквитиновых конъюгатах, так и в форме Ub-H2A уменьшается приблизительно в 2 два раза в течение 4 часов (Рис. 17Б). Кроме того, немеченный Ub полностью заменяет меченный LAP_{Res}-Ub в полиубиквитинированных цепях через 10 часов. Интересно, что в присутствии ингибитора протеасомы количество тяжелых конъюгатов увеличивалось в первые 2 часа и далее постепенно уменьшалось до среднего уровня.



Рисунок 17. (**A**) Клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие LAP2-Ub, обрабатывали резоруфином и инкубировали в присутствии или в отсутствии ингибитора протеасомы PS-341, затем клетки лизировали в указанные временные промежутки и анализировали с использованием флуоресценции в ПААГ разной процентности. (**Б**) Графики демонстрируют интенсивность флуоресценции полиубиквитиновых конъюгатов, содержащих Ub-res, и аддукта Ub-H2A, разрешенных в 7,5% и 12% ПААГ (**A**), в зависимости от времени.

5.1.5. Определение средней длины полиубиквитиновой цепи в состоянии динамического равновесия

Следующим этапом исследования было определение средневзвешенного количества молекул убиквитина, конъюгированных с белками, подвергающимися протеасомной деградации. Мы провели сверхразрешающее количественное профилирование распределения полиубиквитиновых конъюгатов, разделенных в градиенте ПААГ (Рис. 18А). Полученные данные показали, что, во-первых, в случае ингибирования протеасомы происходит перераспределение убиквитиновых конъюгатов в сторону более легких. Вовторых, большая часть «супер-убиквитинированных» белков не подвергалось гидролизу протеасомой (Рис. 18Б). Построение зависимости интенсивности флуоресценции резоруфина от массы убиквитиновых конъюгатов (Рис. 18В) вместе с наложением распределения молекулярных масс белков человеческого протеома [219] показало, что равновесие между убиквитинированием и деубиквитинированием динамическое достигается в диапазоне 6-7 мономеров убиквитина на белковую молекулу, принимая во внимание, что средняя масса протеасомных субстратов составляет приблизительно 30 кДа [133]. Эти результаты коррелируют с работой [220], в которой было показано, что полиубиквитиновые цепи длиной в 4 и 6-7 Ub являются самыми распространенными в случае *in vitro* полиубиквитинирования фосфопептидов человеческого циклина E1 и β-катенина с помощью комплекса Cdc34-SCF. Ранее считалось, что цепочка из 4 молекул убиквитина является минимально достаточной для узнавания протеасомой [90], также челночные белки семейства UBL-UBA рекрутируют белки к протеасомой [90], также помечены не менее чем четырьмя молекулами убиквитина [221]. Наши результаты свидетельствуют о том, что оптимальным количеством является не менее 6 молекул убиквитина с верхним лимитом 12-15 мономеров на белковую молекулу. Еще одним важным выводом является то, что полиубиквитинированные белки, ковалентно связанные с более чем 20 мономерами убиквитина, не являются оптимальными субстратами для протеасомы, тогда как активность деубиквитинирующих ферментов по отношению к этим конъюгатам увеличивается логарифмически в соответствии с их длиной.


Рисунок 18. (А) Клетки, стабильно экспрессирующие LAP2-Ub, обрабатывали резоруфином и далее инкубировали в присутствии или в отсутствии ингибитора протеасомы PS-341, далее лизировали через указанные временные промежутки и анализировали интенсивность флуоресценции в ПААГ. (Б) Зависимость интенсивности флуоресценции резоруфина в ПААГ на (А) от оценочной молекулярной массы Ub-конъюгатов. (В) График демонстрирует зависимость изменения флуоресценции резоруфина, соответствующей полиубиквитиновым конъюгатам, от их молекулярной массы (аппроксимация красной линией). Синяя зона представляет собой ареал субстратной специфичности протеасомы, желтая зона соответствует полиубиквитинированным субстратам, подвергающимися действию DUBs. Количество

молекул убиквитин, присоединенных к субстрату, рассчитывалось исходя из наложения распределения человеческого протеома, при средней массе белка в 30 кДа.

Последние структурные исследования 19S регуляторной субчастицы показали, что расстояние от убиквитиновых рецепторов до сайта DUBs Rpn11 или Ubp6 в «связанном состоянии» равно приблизительно длине полиубиквитиновой цепи, состоящей из четырех фрагментов. Если предположить, что 1-2 убиквитина подвергаются деградации вместе с субстратом, тогда субстрат всего связан с 5-6 Ub, что коррелирует с длиной цепи polyUb, описанной нами.





5.1.6. Анализ стабильности полиубиквитиновых цепей различного типа ветвления

Далее нами была проанализирована устойчивость полиубиквитиновых цепей разного типа ветвления. Для этого были созданы варианты убиквитина, содержащие только по одному функциональному лизину, все остальные были заменены на аргинин (**Puc. 20A**). Таким образом, в нашем распоряжении было 10 различных вариантов убиквитина: Ub WT, UbK0 (все лизины заменены на аргинины) и варианты K0 с возвратными заменами UbK0 R6K, UbK0 R11K, UbK0 R27K, UbK0 R29K, UbK0 R33K, UbK0 R48K, UbK0 R63K. Последовательности ДНК, кодирующие данные варианты убиквитина в единой рамке считывания с пептидом LAP2, были интегрированы в лентивирусные векторы, кодирующие слитный белок BFP-LplA (AAG), где BFP – мономерный вариант синего флуоресцентного белка. LAP2-Ub и BFP-LplA(AAG) соединялись сайтом внутренней посадки рибосомы (IRES, Internal Ribosome Entry Site). Полученные варианты убиквитина были протестированы на предмет накопления полиубиквитиновых цепей каждого типа ветвления в клетках, обработанных PS-341. Полиубиквитиновые цепи, составленные из

всех вариантов Ub, кроме K0 и K0 R6K, в явном виде накапливались в присутствии ингибитора протеасомы (**Рис. 20Б**).

На следующем этапе нами был проведен широкомасштабный анализ стабильности полиубиквитиновых цепей различного типа ветвления на уровне отдельных клеток. Клетки линии НЕК293 были трансдуцированы всеми имеющимися вариантами Ub, при этом путем разведения лентивирусов достигалась интеграция не более одной экспрессионной кассеты в геном клетки-хозяина. Трансдуцированные клетки обрабатывали резоруфином, отмывали и по прошествии двух часов сортировали с применением FACS. Было собрано восемь популяций клеток с различным соотношением синей и красной флуоресценции (Рис. 20В). С применением ПЦР мы амплифицировали варианты Ub, содержащиеся в геноме отобранных клеток. Последующее высопроизводительное секвенированирование на платформе Illumina позволило выявить распределение каждого варианта Ub во всех собранных фракциях (Рис. 20Г и 20Д). Как и следует из имеющихся литературных данных, полиубиквитиновые цепи, ветвящиеся по лизинам К11 и К48, были наименее стабильны и значительной степени стабилизировались в результате добавления PS-341. В Полиубиквитиновые цепи со связями через лизины К29, К33 и К63 показали изначально большую стабильность и менее выраженную реакцию на добавление ингибитора протеасомы. Интересно отметить, что цепи с ветвлением по лизину К6 были неустойчивым и одновременно были индифферентны к добавлению PS-341, тогда как цепи с ветвлением по лизину К27 были наиболее стабильными, но аналогично К6 не реагировали на добавление ингибитора протеасомы. Таким образом, обработка клеток ингибитором протеасомы приводила к накоплению цепей, что подтверждает способность протеасомы распознавать неканонические полиубиквитиновые цепи [76].



Рисунок 20. (А) Замены в нуклеотидной последовательности вариантов убиквитина. (Б) Клетки линии НЕК293, экспрессирующие варианты Ub с одним функциональным лизином, инкубировали с ДМСО или PS-341, затем обрабатывали резоруфином, далее лизировали и анализировали флуоресценцию клеточных лизатов после разделения в ПААГ. (В) Клетки, трансдуцированные библиотекой вариантов Ub с одним функциональным лизином, обрабатывали резоруфином, далее фракционировали с помощью FACS после 2 часов инкубации в среде с или без PS-341. Клетки каждой из восьми фракций использовали в качестве исходного материала для ПЦР-амплификации геномной ДНК, кодирующей варианты Ub, с последующим высокопроизводительным секвенированием на платформе Illumina. Индивидуальное (Г) и наложение (Д) распределения вариантов Ub в отобранных фракциях в присутствии и отсутствии PS-341, где 1 фракция – соответствует наименьшей стабильности, а 8 – наибольшей стабильности.

5.1.7. Изучение особенностей моноубиквитинирования гистона H2A

В ходе анализа данных, полученных при профилировании полиубиквитиновых цепей, стало очевидно, что гистон H2A акцептировал на себя до 20% меченного резоруфином убиквитина. Данный факт имеет важное фундаментальное значение, так как последние данные ряда авторов свидетельствуют, что за убиквитинирование гистонов, в частности гистонов H2A/H2A.X, ответственна убиквитин-лигаза RNF168, которая модифицирует таким образом белки в ответ на повреждение ДНК [218]. Нами предварительно было

установлено, что полоса, соответствующая гистону H2A, была обнаружена только в случае варианта UbK0 R27K (**Puc. 21A**), что соотносится с уже известными данными [218]. Для дополнительного подтверждения функциональной значимости лизина K27 в процессе модификации гистона H2A, нами был создан вариант убиквитина, в котором на аргинин был заменен исключительно лизин K27 – UbWT K27R. Анализ интенсивности полосы, соответствующей конъюгату Ub-H2A, подтвердил круциальное значение лизина K27 для процесса моноубиквитинирования гистона H2A (**Puc. 21A**).

Использование лигазы LplA(AAG) с цитоплазматической или ядерной локализацией (BFP-LpIA(AAG)-NLS, NLS (nuclear localization signal)) показало, что H2A связывается с меченым Ub, который диффундирует из цитоплазмы (**Рис. 21Б**), в то время как резоруфинлигаза была не способна модифицировать Ub, который был уже ковалентно связан с гистоном Н2А. Наиболее разумным объяснением данного факта является стерическая недоступность Ub в составе конъюгата Ub-H2A. Аналогично работе [222] нами было обнаружено усиление активности деубиквитинирующих ферментов в отношении убиквитинированного гистона в присутствии ингибитора протеасомы (Рис. 21А и 21Б). Полученные нами данные свидетельствуют о синхронизации моноубиквитинирования гистона Н2А и протеасом-опосредованным метаболизмом убиквитина, таким образом, убиквитин-лигазы цитоплазматической и ядерной локализации конкурируют между собой за пул убиквитина, находящийся в состоянии динамического равновесия [222]. При этом нами была зафиксирована более интенсивная диффузия убиквитина через ядерную мембрану, чем это предполагалось ранее. Проведенное сравнение скорости разрушения убиквитина дикого типа и варианта UbK0 R27К (Рис. 21В) дает основания предположить депонирование убиквитина в виде ковалентного конъюгата с H2AX с его последующим высвобождением в общедоступный клеточный пул.



Рисунок 21. (А) Клетки НЕК293, экспрессирующие LAP2-Ub и BFP-LplA (AAG) с NLS (nuclear localization signal) или без него, инкубировали с ДМСО, ингибитором протеасомы PS-341 или ингибиторами деубиквитиназ PR-619 и WP1130, а затем обрабатывали резоруфином. Лизаты клеток анализировали с использованием флуоресценции в ПААГ геле и иммуноблоттинга с использованием антител против гистона H2A. (Б) Клетки НЕК293, экспрессирующие LAP2-Ub и BFP-LplA (AAG) с NLS или без него, инкубировали с ДМСО, ингибитором протеасомы PS-341 или ингибиторами деубиквитиназ PR-619 и WP1130, а затем обрабатывали резоруфином. Лизаты клеток анализировали с дМСО, ингибитором протеасомы PS-341 или ингибиторами деубиквитиназ PR-619 и WP1130, а затем обрабатывали резоруфином. Лизаты клеток анализировали с использованием флуоресценции в ПААГ геле и флуоресцентной микроскопии. (В) Клетки, стабильно экспрессирующие LAP2-Ub WT и LAP2-UbK0 KR27, обрабатывали резоруфином и инкубировали в присутствии CHX, далее лизировали в указанные временные промежутки и анализировали с использованием флуоресценции в промежутки и анализировали с использованием флуоресценции в пользованием флуоресценции в пользованием флуоресценции в пользованием флуоресценции в пользованием резорующие LAP2-Ub WT и LAP2-UbK0 KR27, обрабатывали резоруфином и инкубировали в присутствии CHX, далее лизировали в указанные временные промежутки и анализировали с использованием флуоресценции в пользованием флуоресценции в пользованием флуоресценции в пользованием флуровали в присутствии CHX, далее лизировали в указанные временные промежутки и анализировали с использованием флуоресценции в пользованием флуровали в пользованием флурованием флуровали в пользованием флурованием

5.2. Изучение молекулярного механизма убиквитин-независимого гидролиза основного белка миелина протеасомой

Как уже упоминалось выше, основной альтернативой убиквитин-зависимого протеолиза является убиквитин-независимый гидролиз белков протеасомой [155]. При этом механизмы убиквитин-независимого протеолиза изучены значительно хуже классического пути с участием убиквитина. Известны механизмы только для единичных белков, например, орнитиндекарбоксилазы ODC [223] и ацетилированных коровых гистонов [57]. Ранее в лаборатории биокатализа были получены данные, свидетельствующие, что один из основных аутоантигенов при рассеянном склерозе – основный белок миелина (МВР) – способен подвергаться гидролизу протеасомой без предварительного убиквитинирования [191]. Было высказано предположение, что одной из вероятных причин подобного явления положительный MBP [193]. является высокий заряд Кроме того. было продемонстрировано, что количество каталитических субъединиц иммунопротеасомы возрастает в центральной нервной системе животных, развивающих экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ) – модели рассеянного склероза у животных. Была изучена фрагментация МВР в норме и патологии, а также исследовано влияние некоторых ингибиторов протеасомы развитие экспериментального на аутоиммунного энцефаломиелита [192].

В связи с тем, что многие функции протеасомы еще не полностью изучены, нам было интересно более детально изучить механизмы убиквитин-независимого протеолиза (в частности MBP), что помогло бы понять не только роль протеасомы в развитии аутоиммунных заболеваний, но и возможно прояснить некоторые фундаментальные закономерности работы этого сложного белкового комплекса.

5.2.1. Исследование необходимости убиквитинирования MBP в процессе его гидролиза протеасомой

На первом этапе был осуществлен гидролиз MBP протеасомой *in vitro* в максимально упрощенной системе: протеасома, очищенный белковый субстрат и ATP (**Puc. 22A**). Протеасома была выделена из печени мышей C3H/He по методике [224], включающей ультрацентрифугирование, гель-фильтрационную и анионообменную хроматографию, что исключает совыделение компонентов системы убиквитинирования. В отличие от других белков – BSA и лизоцима, которые были устойчивы к протеолизу, MBP подвергался гидролизу без участия каких-либо компонентов системы убиквитинирования. Чтобы определить, необходим ли убиквитин для внутриклеточного гидролиза MBP, в клетки

НЕК293 были трансфицированы генетические конструкции, кодирующие человеческий MBP дикого типа – WT MBP и LL-MBP, в котором все остатки лизина заменены на аргинин, вследствие чего присоединение убиквитина к данному варианту МВР по боковой цепи физически невозможно. Чтобы определить время полужизни этих двух белков, клетки, трансфицированные данными конструкциями, обрабатывали ингибитором рибосомы циклогексимидом (СНХ). Лизаты клеток, обработанных СНХ в течение различных временных промежутков, анализировали с помощью иммуноблоттинга (Рис. 22Б), который показал, что WT MBP и LL-MBP гидролизуются с одинаковой скоростью, а время их полужизни составляет примерно 3 часа, при этом деградация обоих белков однозначно осуществляется протеасомой, так как при добавлении ингибитора протеасомы PS-341 происходит накопление как WT MBP, так и LL-MBP. Также для подтверждения отсутствия необходимости убиквитинирования для гидролиза МВР мы использовали малые интерферирующие РНК (siRNA), которые блокируют экспрессию убиквитин-лигазы E1 (UBA1). Е1 – фермент, активирующий убиквитин путем образования тиоэфирной связи, что является первой стадией процесса убиквитинирования. Клетки НЕК293 были трансфицированы siRNA к UBA1 или иррелевантной siRNA в качестве контроля. Через 48 часа эти же клетки были котрансфицированы конструкциями, кодирующими МВР и слитный белок Ub-GFP, в котором Ub присоединен к N-концу зеленого флуоресцентного белка (GFP), что делает это белок убиквитин-зависимым субстратом протеасомы, так как известно, что немодифицированный GFP не подвергается гидролизу протеасомой [225]. Еще через 24 часа анализировали скорость внутриклеточного гидролиза белков с использованием СНХ. Как и ожидалось, введение UBA1 siRNA, блокирующей синтез E1, привело к замедлению скорости гидролиза Ub-GFP, но никак не отразилась на скорости деградации MBP (**Рис. 22B**), что свидетельствует об отсутствии необходимости убиквитинирования МВР для его внутриклеточного гидролиза.



Рисунок 22. (А) MBP, BSA и лизоцим смешивали с очищенной протеасомой и инкубировали указанные промежутки времени, далее реакционные смеси анализировали с помощью электрофореза в ПААГ. (Б) Клетки НЕК293 трансфицировали конструкциями, кодирующими MBP и вариант LL-MBP, через 24 обрабатывали CHX с последующим анализом с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-эпитопа. (В) Клетки НЕК293, трансфицированные siRNA к лигазе E1, котрансфицировали конструкциями, кодирующими MBP и Ub-ZsGreen. Через 24 ч клетки обрабатывали CHX с последующим MBP и Ub-ZsGreen. Через 24 ч клетки обрабатывали CHX с последующим анализом с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против ванализом с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против БLAG-эпитопа и актина или интенсивности флуоресценции в ПААГ.

Самым изученным убиквитин-независимым субстратом протеасомы является орнитиндекарбоксилаза (ODC), этот белок разрушается протеасомой благодаря вспомогательному белку антизиму АZ [223]. Было решено проверить, не способствует ли AZ также и убиквитин-независимому гидролизу MBP. Для этого клетки HEK293 трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими ОDC или MBP, слитных с 3FLAG-эпитопом, затем данные клетки котрансфицировали конструкцией, кодирующей антизим АZ, при этом соотношение ДНК составляло 10:1 (Рис. 23А) или 100:1 (Рис. 23Б и **23В**). В случае анализа деградации белка ОDC клетки были предварительно трансфицированы конструкциями, кодирующими либо убиквитин дикого типа UbWT, либо вариант убиквитина UbK0, у которого все лизины заменены на аргинины, вследствие чего последний не способен образовывать полиубиквитиновые цепи. Через 24 часа внутриклеточный протеолиз ОDC и MBP анализировали с использованием ингибитора СНХ. В случае соотношения AZ:ODC 1:100 наблюдалось общее уменьшение количества ODC в клетке, включая даже начальную точку эксперимента, независимо от присутствия в клетке UbWT или UbK0 (Рис. 23Б). В случае контрансфекции MBP с AZ никаких изменений выявлено не было (Рис. 23В). Таким образом, присутствие антизима в клетке существенно ускоряет деградацию ODC, но не оказывает какого-либо существенного влияния на гидролиз МВР.



Рисунок 23. Клетки НЕК293 были трансфицированы кДНК, кодирующими ОDC или rhMBP, вместе с кДНК, кодирующими Ub WT или UbK0. Конструкции, кодирующие антизим (AZ) и ODC были совместно трансфицированы при разных соотношениях AZ:белок: 1:10 (**A**) или 1:100 (**B** и C). Через 24 ч клетки обрабатывали циклогексимидом (CHX) и далее анализировали с помощью иммуноблоттинга.

Для исследования способности протеасомы гидролизовать MBP в диапазоне наномолярных концентраций субстрата, мы получили белки МВР и р105 (убиквитинзависимый субстрат протеасомы) путем *in vitro* трансляции в присутствии метионина ³⁵S-Met (Рис. 24А). МВР при концентрациях до 10 нМ не подвергался гидролизу протеасомой и в то же время не убиквитинировался в присутствии рекомбинантных ферментов Е1 (активирует убиквитин на первой стадии каскада убиквитинирования) и Е2(5) (переносит активированный убиквитин к лигазе E3) или экстракта клеток Hela (**Рис. 24Б и 24В**). Чтобы отсутствие убиквитинирования является причиной удостовериться, что именно стабильности МВР, мы провели поиск условий, при которых МВР способен убиквитинироваться. Было обнаружено, что экстракт клеток Hela вместе с экзогенным ферментом Е1 способствует полиубиквитинированию МВР (Рис. 24Г). Детальное изучение этого явления привело к тому, что, как и в случае белка p105, этот процесс является ATPγSзависимым и требует обязательного присутствия экзогенного Ub (Puc. 24Д и 24E). В соответствии с этим наблюдением, гидролиз МВР, наблюдаемый в присутствии экстракта клеток Hela вместе с экзогенным E1, находится в прямой зависимости от убиквитина. Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что МВР эффективно гидролизуется протеасомой в отсутствии убиквитина только при концентрациях белка больше, чем 200 нМ. При более низких концентрациях модификация убиквитином необходима для гидролиза MBP протеасомой.



Рисунок 24. (А) Бесклеточная T7-TnT экспрессия белков p105 и rhMBP. Реакционные смеси наносили на ПААГ, высушивали и визуализировали с помощью PhosphorImager. (Б-Г) К рекомбинантным rhMBP и p105, меченных метионином [³⁵S]Met, добавляли E1/Ubc5 вместе с Ub и убиквитин-альдегидом в присутствии или отсутствии ATФ (Б); E1/Ubc5 вместе с Ub, фракцией II и убиквитин-альдегидом в присутствии или отсутствии ATФ (Б); E1/Ubc5 вместе с E1, Ub, убиквитин-альдегидом и MG-132 в присутствии или отсутствии ATФ (Б, слева); и экстракт клеток HeLa вместе с E1, Ub, убиквитин-альдегидом и MG-132 в присутствии или отсутствии ATФ (Г). (Д) Рекомбинантные rhMBP и p105 убиквитин-альдегидам и MG-132. Реакцию останавливали в указанных временных точках и реакционную смесь наносили на ПААГ (дорожки 1-5). В дорожках 6-8 нанесены реакционные смеси (120 мин) без указанных компонентов. (Е) Деградация рекомбинантного rhMBP протеасомой в бесклеточной системе, содержащей экстракт клеток HeLa или E1, a также фракцию II, в присутствии или отсутствии Ub или MG-132.

5.2.2. Роль заряда в убиквитин-независимом гидролизе МВР протеасомой

Ранее нами было сделано предположение, что причиной убиквитин-независимого гидролиза MBP является его высокий положительный заряд [193]. Чтобы проверить эту гипотезу были созданы три варианта MBP: вариант [R], в котором все лизины заменены на аргинины; вариант [6Q], в котором 6 остатков аргинина заменены на глутамин в позициях, где остатки аргинина конвертированы в цитруллин в деиминированной природной изоформе MBP C8 (повышение содержание данной изоформы MBP было обнаружено у пациентов с рассеянным склерозом); и «рационально деиминированный» вариант [9Q], у которого 9 остатков аргинина заменены на глутамин с целью в ещё большей степени понизить положительный заряд белка (**Рис. 25А**). Эти варианты MBP были наработаны в клетках *E.coli* и очищены. С помощью электрофореза в ПААГ в нативных условиях (**Рис. 25Б**) было подтверждено, что положительный заряд вариантов MBP уменьшается в ряду

[R]-[WT]-[6Q]-[9Q]. Анализ *in vitro* гидролиза полученных вариантов MBP очищенной протеасомой, выделенной из головного мозга мышей, продемонстрировал, что скорость гидролиза впрямую коррелирует с величиной положительного заряда (**Puc. 25B**): вариант MBP [R] гидролизуется протеасомой быстрее чем [WT], в то время как скорость гидролиза вариантов [Q] значительно понижается по сравнению с MBP дикого типа.



Рисунок 25. (А) Аминокислотные замены в полученных вариантах MBP по сравнению с белком дикого типа. (Б) Варианты MBP, расположенные в координатах тотального заряда белка и теоретической изоэлектрической точки. Структуры, созданные программным обеспечением PyMOL (предсказанная модель основного белка миелина человека, PDB ID 1QCL), демонстрируют поверхностный электростатический потенциал вариантов MBP. (В) Гидролиз рекомбинантного человеческого MBP дикого типа и его вариантов очищенными протеасомами *in vitro*.

5.2.3. Локализация протеасомного дегрона в составе последовательности MBP

Далее было решено выяснить возможное расположение участков, которыми МВР способен (1) непосредственно связываться с протеасомой и (2) инициировать протеолиз. МВР является природным структурно неупорядоченным белком [226], поэтому в первую очередь необходимо было оценить влияние на гидролиз MBP N- и С-концевых участков белка, так как известно, что они могут иметь важное значение для распознавания белка протеасомой. С этой целью были созданы слитные белки MBP с доменом I27 структурного белка титина, обладающего жесткой фолдированной структурой. Были получены кодирующие MBP, слитный генетические конструкции, с данным доменом, расположенным на N- или C-конце, а также на двух концах одновременно. Все белки были протестированы на предмет внутриклеточного протеасомного гидролиза в клетках НЕК293. Лизаты клеток НЕК293, трансфицированных созданными конструкциями и обработанных циклогексимидом В течение различных промежутков времени, анализировали с помощью иммуноблоттинга. Как можно видеть на Рис. 26А, добавление концевых глобулярных доменов с жесткой структурой приводит к значительному

ослаблению деградации MBP, при наличии домена только на одном конце снижение скорости гидролиза не столь драматическое. Слитный белок MBP с вариантом убиквитина, в котором все лизины замены на аргинины (LLUb), подвергается гидролизу примерно со скоростью, сравнимой с MBP-I27 (**Рис. 26Б**). Так как длина MBP более 150 аминокислот это согласуется с данными, полученными в [72], свидетельствующими о том, что субстрату длиной менее 150 аминокислот достаточно одного убиквитина для гидролиза протеасомой. Таким образом, полученные данные говорят о том что для гидролиза MBP протеасомой недостаточно моноубиквитинирования, а также что эндопротеолитическая активность протеасомы [225] не задействована при гидролизе данного белка. Более того, для деградации MBP протеасомой необходим хотя бы один свободный конец полипептидной цепи.



Рисунок 26. (**A**) Клетки НЕК293 трансфицировали кДНК, кодирующей МВР, и его варианты, слитные с доменами I27, через 24 часа клетки обрабатывали циклогексимидом и инкубировали указанное время, далее клетки лизировали и анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против FLAGэпитопа и актина. (**Б**) Клетки НЕК293 трансфицировали кДНК, кодирующей МВР, и его варианты слитные с Ub WT или LL-Ub. Далее клетки анализировали аналогично (**A**). (**B**) Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка.

Далее мы предположили наличие определенной последовательности в составе MBP, ответственной за гидролиз протеасомой. Чтобы ее обнаружить, мы разделили MBP на три фрагмента: 1-55 (MBP1), 56-110 (MBP2) и 111-170 (MBP3). Были созданы генетические

конструкции, кодирующие делеционные варианты MBP: MBP1-2 (MBP Δ 3), MBP2-3 (MBPΔ1) и MBP1-3 (MBPΔ2). Анализ внутриклеточного протеолиза данных белков свидетельствует, что данные делеционные варианты МВР гидролизуются быстрее по сравнению с полноразмерным белком, и ни один из них не проявляет устойчивости к гидролизу протеасомой (Рис. 27А). Кроме того, детальное изучение протеолиза данных вариантов обнаружило, что скорость гидролиза МВРА1 и МВРАЗ примерно одинакова, в то время как МВРД2 гидролизуется еще быстрее. Полученные данные говорят о том, что фрагменты белка MBP1, MBP2 и MBP3 являются взаимозаменяемыми. Параллельно с этим были созданы генетические конструкции, кодирующие слитные белки MBP1-DHFR-Emb1, MBP2-DHFR-Emb1, MBP3-DHFR-Emb1 и Ubl-DHFR-Emb1, DHFR гле дигидрофолатредуктаза – стабильный белок, различные фьюзы которого используют как модельные субстраты при изучении механизма гидролиза белков; UbL (ubiquitin-like) – домен, являющийся классическим лигандом UIM-мотивов убиквитиновых рецепторов входящих в состав 19S регуляторной субчастицы; Emb1 протеасомы, неструктурированный фрагмент белка Emb1 длиной 60 аминокислот, который не является субстратом для протеасомы [227][228]. Как видно на Рис. 27Б, любой из фрагментов МВР способен направлять белок DHFR, который сам по себе не является субстратом протеасомы, на гидролиз протеасомой. Слитный белок MBP2-DHFR-Emb1 гидролизуется лишь незначительно быстрее по сравнению с контрольным белком DHFR-Emb1 (Рис. 27Б), в то время как MBP1-DHFR-Emb1 и MBP3-DHFR-Emb1 подвергаются деградации более эффективно, что скорее всего означает, первый и второй фрагменты МВР способны связываться с протеасомой, а второй фрагмент связывается намного хуже. Исходя из полученных экспериментальных данных, была выдвинута гипотеза, что для гидролиза МВР протеасомой важна не линейная последовательность аминокислот, а брутто состав этой аминокислотной последовательности. Для проверки этой гипотезы была создана генетическая конструкция, кодирующая аминокислотную последовательность МВР в обратном порядке от С к N-концу – MBP reversed. Изучение внутриклеточного протеолиза данного белка продемонстрировало, что он подвергается гидролизу с такой же скоростью, что и MBP WT (Рис. 27В).



Рисунок 27. (А, Б) Клетки НЕК293 трансфицировали кДНК, кодирующей МВР и его делеционными вариантами, через 24 часа клетки обрабатывали циклогексимидом и инкубировали указанное время, далее клетки лизировали и анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против 3FLAGэпитопа и актина. (В) Клетки НЕК293 трансфицировали кДНК, кодирующей МВР и его «зеркальным» вариантом. Далее клетки анализировали аналогично (А). Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка.

Для того, чтобы выяснить, как взаимное расположение фрагментов МВР влияет на гидролиз протеасомой фолдированного DHFR, были созданы конструкции, кодирующие слитные белки MBP1-MBP2-DHFR-Emb1 и MBP2-MBP1-DHFR-Emb1, как видно из выше полученных данных, MBP1 является более активным сигналом деградации, в то время как MBP2 проявляет эту активность слабее. Порядок фрагментов значительно изменил стабильность DHFR (Рис. 28А). Белок MBP1-MBP2-DHFR-Emb1 был более стабильным, чем MBP2-MBP1-DHFR-Emb1, из чего можно сделать вывод, что сигнал деградации наиболее эффективно работает при расположении в непосредственной близости от субстрата. Частично гидролизованные продукты в случае внутриклеточной деградации MBP2-MBP1-DHFR-Emb1, отсутствующие явно В случае MBP1-DHFR-Emb1, соответствовали N-концевому процессингу фрагмента MBP2.

Далее с применением сайт-направленного мутагенеза мы варьировали заряд фрагментов MBP – был создан ряд вариантов с пониженным (MBP1 и MBP3) и повышенным (MBP2) зарядом. При этом варианты MBP1(R31D, R33E), MBP2(D82R, E83R), MBP3(R159D, R162E) содержат кластеры положительных или отрицательных зарядов, в то время как у вариантов MBP1(R5,25,31,49Q), MBP2(Q78,81,103R), MBP2(Q78,81,103R, E83R), MBP3(R130,162,170Q, K139Q) заряд делокализован по последовательности. Замена положительно заряженных аминокислот на нейтральные или отрицательные приводила к существенному замедлению гидролиза вариантов МВР1 и MBP3, слитных с DHFR, в то время как замена отрицательных аминокислот на положительные, наоборот, приводила к усилению гидролиза фрагмента МВР2 (Рис. 28Б). Важно отметить, что характер распределения заряда по полипептидной цепи существенно влияет на скорость убиквитин-независимого гидролиза протеасомой. Нами было показано, что равномерное распределение заряда в этом смысле значительно эффективнее, чем его кластеризация (Рис. 26В). Таким образом, в ходе описанных экспериментов мы показали, что на способность МВР подвергаться убиквитин-независимому гидролизу протеасомой влияет скорее композиция составляющих его аминокислот и в существенно меньшей степени их линейная последовательность.



Рисунок 28. (А, Б) Клетки НЕК293 трансфицировали кДНК, кодирующей слитные белки фрагментов MBP1 и MBP2, расположенные в разной последовательности, с DHFR и Emb1(1-60), или слитные белки с разными вариантами фрагментов MBP1 (1), MBP2 (2), MBP3 (3), через 24 часа клетки обрабатывали циклогексимидом и инкубировали указанное время и анализировали далее клетки лизировали и анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против 3FLAG-эпитопа и актина. Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка. (В) График зависимости между относительной скоростью гидролиза слитных белков фрагментов MBP с DHFR и Emb1(1-60) от изоэлектрической точки.

5.2.4. Создание искусственных убиквитин-независимых дегронов на основе последовательности MBP

На следующем этапе мы проанализировали аминокислотную последовательность MBP и выявили аминокислоты, встречающиеся в этом белке с большей частотой, чем в среднем по протеому. Как и следовало ожидать, такими аминокислотами оказались, главным образом, нейтральные глицин, серин, аланин, придающие подвижность полипептидной цепи, а также положительно заряженные аргинин и лизин (**Puc. 29A**). Далее на основе этих аминокислот, нами был разработан потенциальный убиквитин-независимый дегрон длиной 63 аминокислоты, состоящий из девяти повторяющихся фрагментов по 7 аминокислот – Basic Elementary Autonomous Degron (BEAD). Было создано три варианта: [KR] - [GRASGKF]9; вариант [R] с заменами остатков лизина на аргинин –[GRASGRF]9, а также вариант [Q] с заменами положительно заряженных остатков лизина и аргинина на нейтральные глутамины [GQASGQF]9.

Для исследования способности всех трех дегронов направлять субстраты на протеасомальную деградацию на основе вектора pBud нами были созданы генетические конструкции, кодирующие последовательности дегронов, описанные выше, с присоединенной к ним дегидрофолатредуктазой (DHFR), 3FLAG эпитопом и структурно неупорядоченным участком белка моркови Emb1 (фрагмент 1-60). Были подготовлены также контрольные конструкции, не включающие последовательности дегронов – DHFR и DHFR-Emb1. Известно, что DHFR является стабильным белком и не деградирует в протеасоме. Emb1 также не является субстратом протеасомы, однако благодаря отсутствию упорядоченной структуры, может играть роль участка инициации гидролиза (**Рис. 29Б**(1)).

Измерение времени полужизни субстратов, представленное на **Рис. 29Б**₍₂₎, показало, что варианты [KR] и [R] в отличие от [Q] обладают функциями дегрона, причем их способность инициировать гидролиз белков наиболее вероятно определяется наличием в его составе положительно заряженных аминокислот.



Рисунок 29. (А) Анализ частоты встречаемости аминокислот в последовательности MBP по сравнению с протеомом человека. (Б) (1) Дизайн модельных субстратов, содержащих созданные дегроны, слитные с DHFR и Emb1(1-60). (2) Клетки НЕК293 трансфицировали кДНК, кодирующими слитные белки разработанных дегронов с DHFR и Emb1(1-60), через 24 часа клетки обрабатывали CHX, далее клетки лизировали в указанные временные промежутки и анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител протиа 3FLAG-эпитопа. Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка.

Кроме того, была исследована возможность деградации BEAD[R]-DHFR в отсутствии неструктурированного фрагмента Emb1. Для этого мы сравнили скорость гидролиза BEAD[R]-DHFR со скоростью гидролиза модельных субстратов UBL-DHFR, UBL-DHFR-Emb1 и UBL-DHFR-[Emb1]₂ (Рис. 30А и 30Б). Известно, что убиквитинподобный домен UBL, присутствующий в шаттл-белке hHR23A, может осуществлять физическую стыковку субстрата с протеасомой, при этом для эффективного гидролиза протеасомой ему необходим довольно протяженный неструктурированный участок. Иммуноблоттинг лизатов клеток, трансфицированных данными конструкциями, показал наименьшую скорость гидролиза UBL-DHFR, не имеющего инициаторного участка, при этом скорость гидролиза заметно росла при присоединении Emb1 и [Emb1]2. В случае BEAD[R]-DHFR отсутствовала необходимость в подобном инициаторном участке, что в свою очередь означает скорость гидролиза наблюдалась для BEAD[R]-DHFR, не имеющего дополнительного участка инициации. Таким образом, было установлено, что для эффективного гидролиза DHFR требуется как участок связывания с протеасомой (UBL), так и протяженный структурно неупорядоченный фрагмент (Emb1). Уникальность миелинподобного дегрона заключается в том, что он совмещает обе этих компоненты в одной компактной последовательности.



Рисунок 30. (А) Клетки НЕК293 трансфицировали кДНК, кодирующими слитные белки UBL-DHFR, UBL-DHFR-Emb1(1-60), UBL-DHFR-Emb1(1-120) и BEAD[R]-DHFR, через 24 часа клетки обрабатывали CHX в указанные временные промежутки, далее клетки лизировали и анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-эпитопа. (Б) Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка.

Далее мы решили исследовать механизм, по которому происходит деградация полученных модельных субстратов, в частности, требуется ли для их деградации убиквитинирование. Клетки НЕК293, трансфицированные генетическими конструкциями, кодирующими модельные субстраты, были котрансфицированы Ub WT или Ub K0. Так как подавляющее большинство убиквитиновых цепей образуется через внутренние лизины, встраивание UbK0 должно прерывать рост цепи и тем самым ингибировать убиквитинзависимый протеолиз. Иммуноблоттинг клеточных лизатов не обнаружил разницы в скорости гидролиза BEAD[R]-DHFR в присутствии Ub WT и Ub K0, что свидетельствует об отсутствии необходимости образования убиквитиновых цепей для гидролиза BEAD[R]-DHFR. Корректное проведение эксперимента было подтверждено рядом функциональных контролей. Мы наблюдали стабилизацию субстрата Ubvv-MBP в присутствии UbK0 и отсутствие подобного эффекта в случае UBL-DHFR-[Emb1]₂ (**Рис. 31A**). В другом эксперименте мы использовали генетическую конструкцию, кодирующую HA-Ub – форму убиквитина дикого типа с НА эпитопом. НА-Ub может как напрямую модифицировать субстрат, так и встраиваться в растущую убиквитиновую цепь, что дает возможность детектировать убиквитинированные субстраты с помощью иммуноблоттинга с антителами против НА-эпитопа. Клетки были котрансфицированы НА-Ub и 3FLAG-содержащими конструкциями, кодирующими MBP, mdm2, BEAD[R]-MBP, а также Emb1-MBP, после чего проводилась иммунопреципитация антителами против FLAG и последующий иммуноблоттинг против НА эпитопа. Было установлено, что BEAD[R]-MBP не модифицируется убиквитином, как и отрицательный контроль МВР, в то время как положительный контроль Mdm2 подвергается убиквитинированию. Кроме того, не было зафиксировано модификации убиквитином Emb1-MBP, что напрямую свидетельствует о

неспособности фрагмента Emb1 самостоятельно инициировать убиквитин-зависимый гидролиз (**Рис. 31Б**).



Рисунок 31. (А) Клетки НЕК293 трансфицировали указанными генетическими конструкциями совместно с UbWT или UbK0, через 24 часа клетки обрабатывали циклогексимидом и инкубировали указанные промежутки времени, затем клеточные лизаты анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против 3FLAG-эпитопа или актина. (Б) Клетки НЕК293 котрансфицировали указанными генетическими конструкциями совместно с HA-UbWT, через 24 часа клетки обрабатывали ингибитором протеасомы PS-341 в течение 2 часов, далее клетки лизировали и иммунопреципитировали белки с использование антител против 3FLAG-эпитопа. Затем преципитаты анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против HA-эпитопа.

Затем мы провели исследование зависимости скорости деградации модельного субстрата DHFR от количества повторяющихся фрагментов в составе дегрона. Для этого мы создали генетические конструкции, кодирующие дегроны, состоящие из 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13 фрагментов [GRASGRF], присоединенные к DHFR, трансфицировали их в клетки HEK293 и проанализировали клеточные лизаты с помощью иммуноблоттинга (**Puc. 32A и 32Б**). Было показано, что при увеличении длины дегрона росла и скорость гидролиза, но после достижения оптимальной длины, составляющей 5 фрагментов, скорость гидролиза начинала падать. Интересно, что ингибирование протеасомы привело к накоплению частично процессированного субстрата, более вероятно, представляющего DHFR с полностью обрезанными BEAD.

Манипуляции с зарядом фрагментов МВР показали, что рассредоточенный положительный заряд в сравнении с кластеризированным более предпочтителен для их захвата протеасомой. Чтобы проверить, справедливо ли это наблюдение в случае BEAD, мы создали два варианта BEADs [R], где 6 аргининов были помещены в центре 35-аминокислотного дегрона или же были равномерно распределены по его длине. Было обнаружено, что вариант BEAD с несколькими оснОвными кластерами был более

восприимчив к протеосомному гидролизу, чем дегрон с шестью аргининами, расположенными в центре (**Рис. 32B**).

А



Рисунок 32. (А) Клетки НЕК293 трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими слитные белки DHFR с различным количеством BEAD повторов (n=0-13), через 24 часа клетки обрабатывали CHX и инкубировали указанные временные промежутки, далее клетки анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против 3FLAG-эпитопа. (Б) Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка. (В) Клетки HEK293 трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими слитные белки DHFR с BEAD с делокализованными [+++] и кластеризованными [+] остатками аргинина, через 24 часа клетки обрабатывали CHX и инкубировали указанные временные промежутки, далее клетки анализировали, как указано в (А).

В работе [229] было продемонстрировано, что неструктурированные участки различного аминокислотного состава определяют период полураспада белков UBL-YFP, слитных с исследуемыми фрагментами. Мы подвергли биоинформатическому анализу которые были протестированы в последовательности 115 фрагментов, данном исследовании. Будучи либо оснОвными, либо кислыми (ниже или выше изоэлектрической точки 7,5), эти полипептидные фрагменты демонстрировали выраженную и статистически значимую разницу в стабильности белков UBL-YFP, слитных с данными участками, при этом оснОвные фрагменты были явно менее стабильными (Рис. 33А). В своем исследовании авторы заявляют, что изученные фрагменты не изменяют стабильность YFP, слитого с DHFR, вместо UBL. Мы заметили, что во всех случаях фрагменты были позиционированы С-терминально, тогда как наши данные свидетельствуют о том, что такое местоположение менее выгодно для гидролиза протеасомой. Нами был протестирован один из самых активных фрагментов – Su9 и было создано три слитых белка с DHFR, где данный фрагмент был позиционирован либо С-, либо N-терминально, также был создан вариант Su9 с заменой R на Q (тип Su9 [Q]), который позиционировали N-терминально. Интересно отметить, что в соответствии с нашими данными, Su9 способствовал протеасомной деградации DHFR, тогда как С-концевое расположение Su9 или снижение его оснОвного заряда стабилизировало DHFR (Рис. 33Б и 33В). Из-за большого количества полупроцессированных продуктов гидролиза Su9 можно классифицировать как BEAD с умеренной эффективностью.



Рисунок 33. (A) График, демонстрирующий стабильность субстратов UBL-DHFR-неструкурированный участок, описанных в [229]. Неструктурированные участки были кластеризованы в соответстии с pI. Более маленькое соотношение YFP/RFP соответствует более низкой стабильности субстрата в клетке. Также указана последовательность одного из самых активных участков – Su9. Основные аминокислоты показаны красным. (Б) Клетки НЕК293 трансфицировали указанными генетическими конструкциями, через 24 часа клетки обрабатывали циклогексимидом и инкубировали указанные промежутки времени, затем клеточные лизаты анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против 3FLAG-эпитопа. (В) Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка.

Заряд-опосредованный гидролиз протеасомой может не ограничиваться наличием в составе белка положительно заряженных аминокислот. Теоретически можно представить, что такой механизм гидролиза может осуществляться при присоединении к белку различных катионных химических веществ. Для проверки такой возможности мы провели коньюгацию BSA со спермином, 1,3-диаминопропаном и 3-аминопропанолом, используя бифункциональный NHS-PEG6-малеимидный линкер (**Рис. 34A**). Мы провели *in vitro* гидролиз очищенных коньюгатов BSA реконструированной химерной 20S-REGa протеасомой (**Рис. 34Б**). Результаты эксперимента свидетельствуют, что коньюгация со сперминомом и в значительно меньшей степени 1,3-диаминопропаном превращает BSA в Ub-независимый субстрат в отличие от 3-аминопропанола (**Рис. 34B**).



Рисунок 34. (А) Очитка конъюгатов BSA на колонке Superdex200 (слева). Анализ собранных фракций в ПААГ (справа). (Б) Очистка 20S протеасомы из печени мыши на колоке Q-Sepharose. Препарат очищенной протеасомы в ПААГ. (В) Конъюгаты BSA со сперминома, 1,3-диаминопропаном и 3-аминопропанолом инкубировали с протеасомой в присутствии и отсутствии REGα. Реакционные смеси анализировали электрофоретически в ПААГ.

Таким образом, была осуществлена экспериментальная проверка выдвинутого ранее в отношении MBP предположения, что главным фактором в его ассоциации с протеасомой выступает не специфическая аминокислотная последовательность, а наличие в его составе большого числа основных аминокислот, таких как лизин и аргинин и, как следствие, высокий положительный заряд. Создание искусственного дегрона по принципу включения в его состав наиболее представленных в MBP аминокислот позволило подтвердить эту гипотезу: несмотря на утрату специфического мотива, эффективность дегрона была значительно повышена по сравнению с естественными дегронами МВР. В то же время замена положительно заряженных аминокислот на нейтральные значительно уменьшала эффективность деградации, а замена лизинов на несколько более положительные аргинины даже способствовала незначительному повышению скорости гидролиза. Эти данные подтверждают исключительную роль заряда в способности дегрона направлять белки на деградацию в протеасому. Второе важное свойство миелин-подобного дегрона, обусловленное большим содержанием небольших подвижных аминокислот в его последовательности, позволяет самостоятельно инициировать собственную ему транслокацию в протеолитическую камеру. Установленная оптимальная длина в 5 повторяющихся фрагментов соответствует 70 Å, что согласуется с ранее установленными допустимыми длинами инициаторных фрагментов [129]. Стоит отдельно отметить, что для эффективной инициации гидролиза миелин-подобному дегрону требуется почти в два раза более короткий неупорядоченный фрагмент, чем классической конструкции UBL-DHFR-Emb1, что может свидетельствовать о наличии в протеасоме альтернативного участка связывания основных дегронов. Дальнейшее изучение убиквитин-независимых дегронов поможет пролить свет на механизмы убиквитин-независимой протеасомной деградации и представляет как фундаментальный, так и практический интерес.

5.2.5. Поиск субъединицы в составе регуляторных элементов протеасомы, осуществляющей функцию рецептора оснОвных субстратов

Далее представлялось интересным понять с какой именно субъединицей протеасомы способен взаимодействовать MBP при протекании убиквитин-независимого протеолиза. Ранее мы предполагали, что MBP взаимодействует с 26S протеасомой [193], однако связывающая субъединица не была в явном виде определена. Чтобы гарантировать, что при проведении трансфекции не изменяет общую экспрессию белка и глобальный клеточный метаболизм, последовательность MBP была интегрирована в кассету, содержащую внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), за которым следовала последовательность зеленого флуоресцентного белка ZsGreen (**Puc. 35A**). Чтобы исключить возможность ингибирования или активации протеасомы, мы получили клетки HEK293, стабильно экспрессирующие искусственный Ub-зависимый субстрат – белок ZsGreen1, N-терминально слитый с Ub. Количество белка Ub-ZsGreen, как и ожидалось, изменялось при обработке клеток циклогексимидом и анисомицином – ингибиторами рибосомы, а также ингибитором протеасомы PS-341 и ингибитором E1 лигазы PYR-41 (**Puc. 35Б**). В первую очередь мы проверили необходимость ATФ для внутриклеточного гидролиза MBP. Чтобы

выяснить это, мы уменьшили количество АТФ в клетках путем обработки клеток смесью 2-дезокси-D-глюкозы и 2,4-динитрофенола. В отличие от белка Ub-ZsGreen, скорость гидролиза MBP не менялась, более того, уменьшение количество АТФ в клетке приводило к значительному уменьшению тотального количества внутриклеточного MBP (**Puc. 35B**). Ингибирование протеасомы в клетках со сниженной концентрацией АТФ приводило к значительному количеству частично процессированного по N-концу MBP – продукта реакции, который мы не обнаруживали ни в каких других условиях (**Puc. 35B**).





Рисунок 35. (А) Упрощенная схема лентивирусных конструкций MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen1. (Б) Клетки НЕК293 трансфицировали указанными генетическими конструкциями, через 24 часа клетки обрабатывали циклогексимидом, анисомицином, PS-341 или ДМСО и инкубировали указанные промежутки времени, затем клеточные лизаты анализировали с помощью визуализации флуоресценции в ПААГ. (В) (1) Внутриклеточный гидролиз MBP и Ub-ZsGreen1 в клетках НЕК293 в нормальных условиях (Glc) и при удалении ATP [инкубация с 2-дезокси-D-глюкозой (dGlc) и 2,4-динитрофенолом (2,4-dNP)]. (2) Образование частично процессированного продукта MBP. (3) Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка.

Наблюдаемая убиквитин- и АТФ-независимая деградация МВР протеасомой свидетельствует об отсутствии активного участия 198-регуляторной субчастицы 268 протеасомы в этом процессе. В работе [230] было показано, что 26S-протеасома, лишенная субъединиц Rpn10 или Rpn13, содержит в своем составе тот же регуляторный комплекс 19S, тогда как уменьшение экспрессии субъединицы hRpn2 в клетке должно приводить к протеасомному комплексу, содержащему только гексамер АТФаз [231], который является аналогом дрожжевого PAN. Полученные стабильные линии клеток HEK293 были трансфицированы siRNA к субъединицам Rpn10 и Rpn13 – основным убиквитиновым рецепторам – и субъединице Rpn2, отвечающей за структурную целостность 19S регулятора. К трансфицированным клеткам был добавлен циклогексимид CHX и PS-341. Как видно на Рис. 36A, подавление экспрессии субъединиц Rpn10, Rpn13 и Rpn2 не приводит к существенному замедлению гидролиза МВР, что соответствует нашим предыдущим наблюдениям, что ни Ub4, ни UBL не могли ингибировать гидролиз MBP, опосредованный протеасомой [193]. Накопление контрольного белка Ub-ZsGreen1 при уменьшении экспрессии субъединиц Rpn10 и Rpn2 подтвердило корректность проведенных экспериментов.

Далее мы проверили возможный вклад в гидролиз MBP альтернативных регуляторных частиц, известных как PA28 или 11S/REG, которые способны образовывать гептамер и связывать в такой форме 20S протеолитическое ядро в отсутствии ATP. Трансфекция siRNA к соответствующим субъединицам (**Рис. 36Б**) показала, что MBP накапливается в случае уменьшения экспрессии REGα и REGγ, но не REGβ. В случае контрольного белка Ub-ZsGreen, количество его не изменялось при ингибировании синтеза REG субъединиц, тогда как уменьшение экспрессии базовой субъединицы Rpt1, входящей в состав ATPазного кольца, значительно увеличивало его внутриклеточную концентрацию. Важно отметить, что, аналогично MBP, количество BEADs-DHFR увеличивалось в клетках, трансфицированных siRNA к субъединицам REG, тогда как белок p21, который, как известно, подвергается гидролизу протеасомой, связанной с регулятором REGγ [170], накапливался только при уменьшении экспрессии REGγ (**Рис. 36Б**).



Рисунок 36. (A) (1) Клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали siRNA к указанным субъединицам 19S регуляторного комплекса. Через 48 часов клетки обработали циклогексимидом и инкубировали в течение указанных промежутков времени. Далее клеточные лизаты анализировали на предмет флуоресценции в ПААГ, а также иммуноблоттингом с использованием антител против 3FLAG-эпитопа. (2) Относительное количество белка рассчитывали как отношение количества белка в клетках, трансфицированными соответствующими siRNA, к количеству белка в клетках, трансфицированными соответствующими siRNA, к количеству белка в клетках, трансфицированными siRNA (nonTarg). (**b**) (1) Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали siRNA к указанным субъединицам REG, а также субъединицам Rpt1 и Rpn13. Через 48 часов клетки обработали циклогексимидом и инкубировали в течение указанных промежутков времени. Далее клетки анализировали как указано в (**A**); (2) Клетки HEK293, трансфицировали конструкциями, кодирующими p21, DHFR или BEAD[R]-DHFR, через 24 часа клетки дополнительно трансфицировали siRNA к субъединицам REG и далее анализировали, как указано в (**b**). (3) Оценку относительного количества белка проводили, как описано в (**b**).

Трансфекция клеток НЕК293, экспрессирующих МВР, различными количествами кДНК, кодирующей субъединицы REG, показала, что REGα и REGγ обладают очевидной способностью увеличивать скорость внутриклеточного гидролиза MBP (**Рис. 37А и 37Б**). Известно, что α- и β-субъединицы регуляторной субчастицы REG образуют гетерогептамер, поэтому мы котрансфицировали кДНК, кодирующие субъединицы REGα и REGβ, однако синергетический эффект отсутствовал (**Рис. 37B**).



Рисунок 37.1 (А, Б, В) Клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими субъединицы REG, как указано. Через 48

часов клеточные лизаты анализировали на предмет флуоресценции в ПААГ, а также иммуноблоттингом с использованием антител против 3FLAG-эпитопа и актина.

Детальный анализ аминокислотной последовательности REG субъединиц (**Рис. 38A**) и структуры гептамера REG [232] показал, что гибкие петли REG мономеров содержат полярные аминокислоты, включая кластеры, содержащие аспартат и глутамат, с изоэлектрической точкой примерно 5,0. Эти данные привели нас к идее, что положительный заряд MBP и BEADs, являющийся движущей силой убиквитиннезависимого протеолиза протеасомой, должен иметь отрицательно заряженный акцептор в структуре REG. Трансфекция клеток, экспрессирующих MBP, кДНК, кодирующей REGa с гибкой полярной петлей, замещенной SG-линкером (REGa Δ), по сравнению с REGa дикого типа, привела к повышению стабильности MBP (**Рис. 38Б и 38B**). Полученные данные указывают на возможное участие этой полярной петли в связывании MBP протеасомой. Важно отметить, что как дикий тип, так и мутированный вариант REGa активируют протеасому с одинаковой эффективностью (**Рис. 38Г**).



Рисунок 38. (A) Аминокислотные последовательности петли субъединиц REG. (Б,В) Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали генетическими конструкциями, кодирующими субъединицы REG дикого типа и с заменой полярной петли на линкер (G_4S)₆ (REG $\alpha\Delta$). Через 48 часов клеточные лизаты анализировали на предмет флуоресценции в ПААГ, а также иммуноблоттингом с использованием антител против FLAG-эпитопа и актина. (Г) Анализ активности протеасомы при добавлении REG дикого типа и REG $\alpha\Delta$.

Гидролиз MBP *in vitro* показал, что протеасома в комплексе с REGα и REGγ гидролизовала MBP значительно быстрее, тогда как добавление регуляторной частицы 19S и REGβ имели менее выраженный эффект (**Рис. 39A и 39B**). В целом, усиление химотрипсиновой активности протеасом с разными регуляторными субчастицами, измеренное с использованием низкомолекулярного флуоресцентного субстрата (**Рис. 39Б**), не имело явной корреляции со скоростью гидролиза MBP. Наиболее выраженное различие было получено в случае REGγ, который активировал протеасому по меньшей мере в три и в два раза менее эффективно, чем REGα и REGβ, соответственно, и в то же время увеличивал гидролиз MBP более эффективно, чем REGβ, и сравнимо с REGα.



Рисунок 39. (A) Гидролиз MBP очищенными препаратами 20S и 26S протеасомы, а также 20S протеасомой с различными регуляторами REG *in vitro*. Отмечена реакция с добавлением PS-341. BSA, инкубированный с комплексом 20S-REGα в аналогичных условиях, показан снизу. (Б) Активность протеасом с различными регуляторами, измеренная с использованием субстрата LLVY-AMC. (В) Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные моменты времени к исходному количеству белка.

Для исследования количественных параметров взаимодействия MBP с субчастицей REGa, мы использовали метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Субъединица REGa, слитая с мальтоз-связывающим белком (MaltBP), пропускалась над MBP, иммобилизованном на сенсорном микрочипе. В отличие от белка-носителя, MaltBP-REGa в той же концентрации связывал MBP, генерируя до десяти раз больший SPR-сигнал, чем MaltBP (**Puc. 40A и 40Б**). Константа диссоциации (K_D) комплекса MBP-REGa составила 0,2 мкМ (**Puc. 40B**), что всего лишь в два раза слабее взаимодействия Ub₄-hRpn10 и в десять раз сильнее взаимодействия MBP-hRpn10 (**Puc. 40Г**). Важно отметить, что «квази-деиминированный» вариант MBP [9Q] связывался с REGa значительно менее эффективно – результирующая K_D составила около 2 мкМ (**Puc. 40Г**).



Рисунок 40. (A) Кривая, полученная методом поверхностного плазмонного резонанса, демонстрирующая связывание MaBiP или слитого белка MaBiP-REGα в концентрации 10 мкМ с иммобилизованным MBP. (**Б**) Сенсограммы титрования иммобилизованного MBP или варианта MBP R/Q белком MaBiP-REGα (156 нМ - 20 мкМ). (**B**) (1) Кривые титрования, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса, отражающие взаимодействие между иммобилизованным на чипе MBP или «псевдо-деиминированным» MBP (6Q) с MaBiP-REGα. (2) Кривые титрования, отражающие взаимодействие между иммобилизованным на чипе MBP или четера-убиквитином с субъединицей протеасомы hRpn10. Rmax – уровень максимального насыщения, рассчитанный для каждой кривой, исходя из теории мономолекулярной адсорбции Ленгмюра 1:1. (**Г**) Сенсограммы титрования иммобилизованного MBP или тетра-убиквитина субъединицей протеасомы hRpn10.

5.2.6. Анализ изменения состава регуляторных комплексов протеасомы в

условиях протекания нейродегенеративных процессов

Как уже упоминалось выше, ранее было показано, что протеасомный гидролиз MBP играет значительную роль в развитии аллергического аутоиммуного энцефоломиелита EAE [192], животной модели рассеянного склероза. В этой связи нами было решено провести широкоформатный транскриптомный анализ глиальной культуры, который помог бы выявить изменение экспрессии протеасом-ассоциированных генов в условиях воспаления, моделируемое добавлением γINF.

Нами была получена первичная культура клеток мозга мыши, обогащенная астроцитами. Чтобы более точно охарактеризовать тип культивируемых клеток, мы проанализировали относительное количество мРНК, кодирующей специфические маркеры разных типов клеток. Было обнаружено, что количество мРНК, кодирующей белки, специфичные для астроцитов (Aqp4, Gfap и Aldh111) и микроглии (Iba1, Tlr2 и Tlr7) [233], было значительно повышено. Важно отметить, что мы обнаружили явную корреляцию между уровнями экспресии белков, специфичных для астроцитов, и уровнями соответствующей мРНК, что указывает на то, что повышение количества этих транскриптов имеет явное физиологические значение (Рис. 41А и 41Б). Построение зависимости уровня экспрессии белков, специфичных для разных типов клеток, согласно [233], относительно профилей экспрессии белков в культивируемых нами клеток мозга мыши подтвердило преобладание астроцитов в данной культуре, а также присутствие небольшого количества CD68-положительных клеток, которые наиболее вероятно являются маркерами макрофагов (Рис. 41В и 41Г). В исследовании [234] было показано, что астроциты образуют два подкласса, отличающиеся различной экспрессией генов Gfap (тип I) и Mfge8 (тип II), а также наличием в культуре двух типов иммунных клеток, которые характеризуются повышенной экспрессией генов Aif1 и Cx3cr1: резидентные макрофаги тканей головного мозга (микроглия) И периваскулярные макрофаги (ΠM), экспрессирующие Mrc1 и Lyve1. Наши данные подтверждают, что культивируемые нами астроциты относились к типу I, тогда как высокий уровень мРНК, кодирующей Mrc1, указывал на наличие периваскулярных макрофагов.



Рисунок 41. Наиболее часто встречающиеся транскрипты в клетках головного мозга мыши. Экспрессионный профиль мРНК из первичной культуры клеток головного мозга, кодирующей белки часто встречающиеся в (A) клетках головного мозга и (Б) разных клетках мозга в соответствии с [233]; (В) Логарифмическая диаграмма увеличения количества мРНК по нашим данным относительно изменения экспрессии

соответствующих белков по сравнению с усредненной распространенностью в клетках мозга в соответствии с [233]. (Г) Типирование астроцитов в соответствии с маркерами, описанными в [234].

Полногеномный транкриптомный анализа проводили с использованием микрочиповой технологии Affymetrix и микрочипов GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array, как описано в работе [196]. Сделанное нами транскриптомное профилирование выявило 474 и 150 генов, экспрессия которых повышалась и понижалась, соответственно, в первичной культуре клеток мозга мыши при обработке клеток у-интерфероном γINF.

Найденные дифференциально экспрессированные гены были подвергнуты биоинформатическому анализу с помощью ресурса DAVID [235]. В клетках, обработанных IFN γ , одним из наиболее перепредставительных оказался кластер генов, отвечающих за процессинг и презентацию антигенов (р < 10⁻¹⁴): гены, ассоциированные с главным комплексом гистосовместимости; гены, кодирующие белки протеасомы и системы убиквитинирования, молекулы клеточной адгезии, а также IFN γ -индуцибельные ГТФазы.

Как уже упоминалось выше, ранее нами было показано, что иммунопротеасома играет важную роль в развитии аутоиммунной нейродегенерации [192], гидролизуя основной белок миелина МВР убиквитин-независимо [236]. Интересно, что гидролиз МВР значительно усиливается в клетках, обработанных IFN₇ [191]. В этой связи мы проанализировали изменение количества мРНК, кодирующей белки, связанные с протеасомой, в первичной культуре клеток головного мозга. В клетках, обработанных IFNy, были обнаружены значительные изменения в экспресии генов, кодирующих каталитические субъединицы иммунопротеасомы *Psmb8*, *Psmb9* и *Psmb10* (рис. 42А). Повышенная транскрипция этих генов была подтверждена с использованием ПЦР в реальном времени (Рис. 42Б). Важно отметить, что мы также продемонстрировали повышенное количество мРНК PSME1, кодирующей белок REGa, который, как мы показали выше, в значительной степени усиливает протеолиз МВР протеасомой.



Рисунок 42. (А) Профиль экспрессии дифференциально экспрессированных генов, кодирующих белки протеасомы в первичной культуре головного мозга без воздействия (контроль) и при обработке γINF; (**Б**) Анализ уровня транскрипции генов иммунопротеасомы с использованием ПЦР в реальном времени. Гены, экспрессия которых меняется статистически значимо отмечены звездочкой.

5.3. Подходы к избирательному контролю процессинга основного белка миелина протеасомой

5.3.1. Апробация β1i-специфического пептидилальдегида IPSI-001 в качестве ингибитора иммунопротеасомы

Ранее было показано, что МВР гидролизуется иммунопротеасомой более эффективно, чем конститутивной протеасомой [191]. Гидролиз МВР протасомой, содержащей преимущественно субъединицу β1i, сопровождается повышенным образованием ряда пептидов, в том числе пептида MBP₈₃₋₉₀[ENPVVHFF], который может быть загружен на МНС І класса. Цитотоксические Т-лимфоциты, специфичные к данному пептиду, способны вызывать лизис культуры олигодендроцитов. Установление механизма убиквитин-независимого гидролиза МВР протеасомой позволило сформулировать ряд подходов, позволяющих направленно ингибировать данный процесс, в том числе in vivo. Принципиально ингибировать существуют две возможности, a именно: (1)непосредственно протеасому (2) влиять на посттрансляционные модификации МВР с целью нивелировать его положительный заряд.

В нашей лаборатории ранее было показано, что β1і-специфический пептидилэпоксикетон UK101 уменьшает тяжесть протекания экспериментального аутоиммуного энцефаломиелита (ЕАЕ), экспериментальной модели рассеянного склероза, у мышей линии SJL [192]. Однако UK-101 характеризуется высокой сложностью синтеза, кроме того, он довольно нестабилен и недостаточного специфичен к иммунопротеасоме: величина IC₅₀ для конститутивной и иммунопротесомы различается всего лишь в 7 раз [237]. В этой связи мы протестировали ингибитор нового поколения – β1i-специфический пептидилальдегид IPSI-001 (Z-LNnL-CHO) [238]. В качестве вещества сравнения использовали пептидилальдегид MG-132, который структурно очень похож на IPSI-001 (Рис. 43А).

В качестве источника конститутивной протеасомы были использованы клетки линии НЕК293. Клетки EL4, предварительно обработанные уINF, были использованы в качестве источника иммунопротеасомы (Рис. 43Б). Эффективность ингибирования определяли по снижению скорости гидролиза пептидного субстрата Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-4-амино-7метилкумарин. MG-132 с одинаковой эффективностью ингибировал протеолитическую активность протеасомы из клеток линий EL4 и HEK 293, в то же время IPSI-001 воздействовал на протеасому из клеток EL4 гораздо более эффективно, чем на протеасому, из клеток НЕК293 (**Рис. 43В**). При концентрациях ингибитора IPSI-001 более 1 мкМ было зафиксировано существенное снижение химотрипсин-подобной активности как конститутивной, так и иммуннопротеасомы. Из полученных данных можно сделать предположение, что при концентрации меньше 1 мкМ ингибитор IPSI-001 способен связываться только с субъединицей β_{1i} , а при концентрациях более 1 мкМ он также может воздействовать и на другие каталитические субъединицы.

Чтобы определить токсичность ингибитора IPSI-001 in vivo, его вводили мышам линии C3H/He однократно внутрибрюшинно в дозировке 10 и 100 мг/кг (n=5). В течение 48 часов, у всех мышей, в том числе получивших максимальную дозу препарата, не физиологических наблюдалось значимых И поведенческих отклонений. Патоморфологический анализ не выявил никаких аномалий, что может говорить о достаточно низкой токсичности данного соединения. Таким образом, эти данные селективность соединения IPSI-001 демонстрируют высокую как ингибитора иммунопротеасомы, проявляющейся уже при наномолярных концентрациях, одновременно с этим оно обладает низкой токсичностью, измеряемой сотнями мг на кг веса животного.



Рисунок 43. Химические структуры ингибиторов (A); содержание каталитических субъединиц конститутивной протеасомы (β1/β5) и иммунопротеасомы (β1/β5i) в клетках линии НЕК293 и EL4, обработанных γINF (Б), активность протеасомы в различных типах клеток, определенная с помощью гидролиза модельного субстрата Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, в зависимости от концентрации ингибиторов IPSI-001 и MG-132 (B). Данные иммуноблоттинга были нормализованы на субъединицу Rpt6, так как количество данной субъединицы одинаково в протеасомах любого типа.

5.3.2. Влияние деиминирования MBP пептидиларгининдеиминазой (PAD) на его гидролиз протеасомой.

В рамках второго подхода к ингибированию убиквитин-независимого гидролиза MBP протеасомой решили исследовать MBP ΜЫ влияние деиминирования пептидиларгининдеиминазой (PAD) на его протеасомальное разрушение. Мы изучили тетразольных 2-хлорамидина (N-{4-[(2действие одного аналогов ИЗ хлорэтанимидоил)амино]-1-(2-трет-бутил-2Н-тетразол-5-ил)бутил}-бифенил-4-

карбоксамид), ингибитора PAD, на деиминирование и гидролиз MBP протеасомой MBP *in vitro* и в клетках млекопитающих. На первом этапе было исследовано влияние вышеописанного ингибитора PAD на деиминирование MBP под действием PAD *in vitro*. После проведения реакции деиминирования MBP различными концентрациями PAD степень деиминирования белка определяли с помощью электрофореза в нативных условиях [239] (**Puc. 44A**). Было обнаружено, что при концентрации PAD около 5-6 ед./мл степень деиминирования MBP приближается к максимальной. Затем к смеси MBP с PAD добавляли различные концентрации исследуемого ингибитора PAD (**Puc. 44Б**). По полученным нами данным IC₅₀ тетразольного аналога 2-хлорамидина составила примерно 25 мкМ. Нам не удалось зафиксировать ингибирование PAD при концентрации ингибитора 1 мкМ и менее.



Рисунок 44. (A) Пептидиларгининдеиминазу (PAD) из скелетных мышц кролика (Sigma-Aldrich, CША) в различных концентрациях инкубировали с бычьим основным белком миелина (MBP) указанное время, далее смесь белков подвергали электрофоретическому разделению в нативном ПААГ (верху слева). Вверху справа представлена зависимость фактора удерживания MBP в нативном ПААГ (Rf) в зависимости от степени деиминирования при различных концентрациях РАD. (**Б**) РАD прединкубировали с ингибитором в указанных концентрациях 30 минут, затем добавляли MBP и инкубировали 1 ч при 52°С, анализ степени деиминирования проводили аналогично предыдущему эксперименту. Внизу справа представлена зависимость фактора удерживания концентувациях РАD и ингибитора (Rf) в зависимости от степени деиминирования концентрациях концентувациях 20 минут, затем добавляли MBP и инкубировали 1 ч при 52°С, анализ степени деиминирования проводили аналогично предыдущему эксперименту. Внизу справа представлена зависимость фактора удерживания MBP в нативном TAAГ (Rf) в зависимости от степени деиминирования при различных концентрациях РАС (Rf) в зависимости от степени деиминирования при различных концентрациях АВР в нативном ПААГ (Rf) в зависимости от степени деиминирования при различных концентрациях РАС и ингибитора (структура приведена сверху).

Ранее нами было показано, что MBP способен связываться с протеасомой [193]. Чтобы понять, может ли деиминирование MBP влиять на данное взаимодействие, данный белок с различным уровнем деиминирования инкубировали с протеасомой. Комплекс протеасомы с MBP иммунопреципитировали антителами к субъединице протеасомы Rpn10 (**Puc. 45A**). В преципитатах из смеси MBP, не подвергавшегося деиминированию, с протеасомой было обнаружено значительное количество MBP, что говорит о связывании MBP с протеасомой. Если MBP был предварительно инкубирован с PAD в присутствии 10 мкМ ингибитора, количество MBP в преципитате было значительно меньше. Если же использовался MBP с максимальной степенью деиминирования (инкубированного с PAD в отсутствии ингибитора) MBP в преципитате отсутствовал. Из полученных данных следует, что деиминирование MBP может непосредственно влиять на его связывание с протеасомой. Кроме того, было изучено влияние деиминированного MBP на его способность
подвергаться гидролизу протеасомой в отсутствии убиквитина. Деиминирование значительно замедляет скорость гидролиза МВР протеасомой, однако при добавлении к реакционной смеси ингибитора PAD скорость гидролиза МВР протеасомой возвращалась к исходному уровню (**Рис. 45Б и 45В**).



Рисунок 45. (А) MBP, обработанный РАD (5.0 ед/мл, 1ч) или смесью РАD и ингибитора (10 мкМ), был инкубирован с очищенной протеасомой в присутствии 1 мкМ ингибитора протеасомы PS-341. Затем комплекс MBP – протеасома был осажден антителами к субъединице протеасомы Rpn10 на протеинА-сефарозе. Реакционные смеси анализировали с помощью иммуноблоттинга. (Б) Протеолиз MBP препаратом очищенной протеасомы проводили в присутствии или в отсутствии РАD и ингибитора РАD, анализировали с помощью электрофореза в ПААГ. (В) Зависимость количества MBP (в % от исходного) от времени и состава реакционной смеси.

Чтобы изучить влияние PAD и ее ингибитора на гидролиз MBP в клетках млекопитающих, генетические конструкции, кодирующие MBP И пептидиларгининдеиминазу второго типа (PAD2) были котрансфецированы в клетки линии HEK293. В качестве контроля использовали клетки, трансфицированные дигидрофолатредуктазой (DHFR). Полученные данные свидетельствуют, что при оверэкспресии PAD2 происходит значительное замедление гидролиза MBP протеасомой, при этом происходит его накопление в клетке. Количество DHFR при оверэкспрессии PAD2 оставалось неизменным.

Таким образом, полученные данные говорят о том, что деиминирование MBP под действием PAD препятствует взаимодействию MBP с протеасомой, а также замедляет гидролиз протеасомой MBP *in vitro* и в эукариотических клетках. Исследованный ингибитор PAD2 при концентрации более 1 мкМ способен ингибировать ферментативную активность PAD *in vitro*. Судя по всему, клетки, инкубированные с ингибитором PAD, презентируют на своей поверхности повышенное количество антигенных пептидов MBP из-за усиления гидролиза MBP протеасомой. Этот эффект может приводить к более эффективному поражению ЦНС цитотоксическими лимфоцитами при рассеянном склерозе.

109

6. Заключение

В настоящей работе на примере ряда природных и искусственных полипептидных субстратов удалось показать возможность использования метода PRIME для мониторинга внутриклеточной деградации в физиологических условиях, в том числе в режиме реального времени. Данный метод позволяет наблюдать за протеасомной активностью в клетках без добавления к ним веществ, останавливающих синтез белков, а также не требует присоединения к изучаемым белкам высокомолекулярных ДНК-кодируемых флуорофоров, сильно влияющих на их субстратные свойства. С помощью описанного метода был изучен метаболизм убиквитина, одного из основных участников убиквитин-протеасомной системы. Было установлено, что время полужизни данного белка составляет около четырех часов. Изучение критериев ассоциации полиубиквитиновых коньюгатов с протеасомой выявило, что на молекулу субстрата в среднем приходится 6 молекул убиквитина, и 1-2 из этих убиквитинов утилизируются вместе с субстратом. Кроме того, с помощью мутантов убиквитина была субстратной функциональных проведена оценка специфичности протеасомы к убиквитиновым цепям разного типа ветвления.

Нами было подтверждено, что один из основных аутоантигенов при рассеянном склерозе – MBP – гидролизуется убиквитин-независимо, причем движущей силой этой деградации является аномально высокий положительный заряд белка. Гидролиз MBP протеасомой является ATP-независимым и ускоряется в присутствии регуляторных элементов REG типа α и γ. Была теоретически предсказана аминокислотная последовательность оснОвного элементарного автономного дегрона (от англ BEAD, Basic Elementary Autonomous Degron), способного придавать полипептидам способность подвергаться гидролизу протеасомой без участия убиквитина. В результате проведенных экспериментов был подтвержден функционал BEAD, что дает основания к его дальнейшему практическому применению, например, для создания ДНК-кодируемых Тклеточных вакцин.

Важным наблюдением является повышение уровня REGα, зафиксированное при широкомасштабном анализе транскриптома первичной культуры клеток головного мозга, находящихся под воздействием воспалительного стимула, опосредованного действием γинтерферона γINF. Таким образом, ранее полученные данные, свидетельствующие об ускоренном протеолизе MBP иммунопротеасомой, могут быть объяснены повышенным содержанием в клетках REGα-протеасом. Эта экспериментальная находка в значительной дополняет картину функциональной значимости убиквитин-независимого гидролиза MBP протеасомой в протекании аутоиммунной нейродегенерации. В процессе выполнения

110

работы апробированы ряд подходов к направленному замедлению протеасомопосредованного метаболизма MBP, направленных как на протеасому, так и на сам субстрат. Специфический ингибитор иммуносубъединицы протеасомы β1i селективно воздействовал на протеасому *in vivo*, проявляя при этом довольно низкую токсичность. Деиминирование MBP под действием PAD препятствует взаимодействию MBP с протеасомой, а также замедляет гидролиз протеасомой MBP *in vitro* и в клетках млекопитающих (**Puc. 46**).



Рисунок 46. Молекулярный механизм гидролиза МВР протеасомой и его физиологическая значимость.

7. Выводы

- Проведена оптимизация методики внутриклеточного ферментативного мечения полипептидных субстратов резоруфином (PRobe Incorporation Mediated by Enzymes – PRIME) для анализа их внутриклеточной деградации в физиологических условиях. Использование данной методики позволило впервые оценить важнейшие параметры функционирования убиквитин-протеасомной системы и молекулярные механизмы ассоциации полиубиквитиновых цепей с протеасомой, в том числе определить стабильность непосредственно убиквитина, полиубиквитиновых цепей разного типа ветвления, а также среднее количество мономерных единиц убиквитина на молекулу субстрата в состоянии динамического равновесия.
- 2. Показано, что молекулярный механизм убиквитин-независимого гидролиза основного белка миелина (MBP) протеасомой обусловлен его аномально высоким положительным зарядом, опосредующим ассоциацию MBP с регуляторными субчастицами протеасомы. Была теоретически предсказана и экспериментально подтверждена аминокислотная последовательность миелин-подобного дегрона, способного придавать полипептидам способность подвергаться гидролизу протеасомой без участия убиквитина.
- Путем широкомасштабного транскриптомного профилирования был зафиксирован повышенный уровень экспрессии субъединицы протеасомы REGα в первичной культуре глии при воздействии воспалительного стимула. Показано, что данные регуляторные комплексы в форме ассоциированного с протеасомой гептамера в значительной степени ускоряют протеолиз MBP.
- 4. Разработаны подходы к направленному замедлению внутриклеточного протеасомопосредованного метаболизма МВР. Показано, что специфический ингибитор иммуносубъединицы β1i селективно воздействует на протеасому *in vivo*, с другой стороны деиминирование МВР под действием пептидиларгининдеиминазы препятствует взаимодействию МВР с протеасомой, что в свою очередь замедляет гидролиз МВР протеасомой как *in vitro*, так и в клетках млекопитающих.

8. Список литературы

- K. L. Rock, C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A. L. Goldberg, "Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules.," *Cell*, vol. 78, no. 5, pp. 761–71, Sep. 1994.
- J. Maupin-Furlow, M. Gil, and I. Karadzic, "Proteasomes: perspectives from the Archaea," *Front Biosci*, pp. 1743–1758, 2004.
- [3] B. Dahlmann, "Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 591. Academic Press, pp. 132–140, 01-Feb-2016.
- [4] G. N. DeMartino and C. A. Slaughter, "The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms.," J. Biol. Chem., vol. 274, no. 32, pp. 22123–6, Aug. 1999.
- [5] N. Tanahashi, Y. Murakami, Y. Minami, N. Shimbara, K. B. Hendil, and K. Tanaka, "Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 19, pp. 14336–45, May 2000.
- [6] B. Fabre, T. Lambour, J. Delobel, F. Amalric, B. Monsarrat, O. Burlet-Schiltz, and M.-P.
 Bousquet-Dubouch, "Subcellular distribution and dynamics of active proteasome complexes unraveled by a workflow combining in vivo complex cross-linking and quantitative proteomics.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 12, no. 3, pp. 687–99, Mar. 2013.
- S. Asano, Y. Fukuda, F. Beck, A. Aufderheide, F. Forster, R. Danev, and W. Baumeister, "A molecular census of 26S proteasomes in intact neurons," *Science (80-.).*, vol. 347, no. 6220, pp. 439–442, Jan. 2015.
- [8] M. Rechsteiner and C. P. Hill, "Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors," *Trends Cell Biol.*, vol. 15, no. 1, pp. 27–33, Jan. 2005.
- [9] K. V Ramachandran and S. S. Margolis, "A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 24, no. 4, pp. 419–430, Apr. 2017.
- [10] T. J. A. Höhn and T. Grune, "The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part III-Redox regulation of the proteasomal system.," *Redox Biol.*, vol. 2, pp. 388–94, Jan. 2014.
- [11] M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, and D. Stock, "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution," *Nature*, 1997.
- [12] M. Groll and R. Huber, "Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1695, no. 1–3, pp. 33–44, Nov. 2004.
- [13] M. Groll, M. Bochtler, H. Brandstetter, T. Clausen, and R. Huber, "Molecular machines for protein degradation.," *Chembiochem*, vol. 6, no. 2, pp. 222–56, Feb. 2005.
- [14] F. Zühl, T. Tamura, I. Dolenc, Z. Cejka, I. Nagy, R. De Mot, and W. Baumeister, "Subunit topology of the *Rhodococcus* proteasome," *FEBS Lett.*, vol. 400, no. 1, pp. 83–90, Jan. 1997.
- [15] B. M. Stadtmueller and C. P. Hill, "Proteasome activators.," *Mol. Cell*, vol. 41, no. 1, pp. 8–19, Jan. 2011.

- [16] W. Baumeister, J. Walz, F. Zühl, and E. Seemüller, "The proteasome: paradigm of a selfcompartmentalizing protease.," *Cell*, vol. 92, no. 3, pp. 367–80, Feb. 1998.
- [17] M. J. Kunjappu and M. Hochstrasser, "Assembly of the 20S proteasome.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1843, no. 1, pp. 2–12, Jan. 2014.
- [18] P. A. Osmulski, M. Hochstrasser, and M. Gaczynska, "A tetrahedral transition state at the active sites of the 20S proteasome is coupled to opening of the alpha-ring channel.," *Structure*, vol. 17, no. 8, pp. 1137–47, Aug. 2009.
- [19] J. Rabl, D. M. Smith, Y. Yu, S.-C. Chang, A. L. Goldberg, and Y. Cheng, "Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases.," *Mol. Cell*, vol. 30, no. 3, pp. 360–8, May 2008.
- [20] C. L. Jones, E. Njomen, B. Sjögren, T. S. Dexheimer, and J. J. Tepe, "Small Molecule Enhancement of 20S Proteasome Activity Targets Intrinsically Disordered Proteins," ACS Chem. Biol., p. acschembio.7b00489, Aug. 2017.
- [21] A. L. Goldberg, "Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins," *Nature*, vol. 426, no. 6968, pp. 895–899, Dec. 2003.
- [22] S. Keck, R. Nitsch, T. Grune, and O. Ullrich, "Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease.," *J. Neurochem.*, vol. 85, no. 1, pp. 115–22, Apr. 2003.
- [23] W. H. Choi, S. A. H. de Poot, J. H. Lee, J. H. Kim, D. H. Han, Y. K. Kim, D. Finley, and M. J. Lee, "Open-gate mutants of the mammalian proteasome show enhanced ubiquitin-conjugate degradation.," *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 10963, Mar. 2016.
- [24] V. A. Kulichkova, O. A. Fedorova, A. S. Tsimokha, T. N. Moiseeva, A. Bottril, L. Lezina, L. N. Gauze, I. M. Konstantinova, A. G. Mittenberg, and N. Barlev, "26S proteasome exhibits endoribonuclease activity controlled by extra-cellular stimuli," *Cell Cycle*, vol. 9, no. 4, pp. 840–849, Feb. 2010.
- [25] A. G. Mittenberg, T. N. Moiseeva, V. O. Kuzyk, and N. A. Barlev, "Regulation of Endoribonuclease Activity of Alpha-Type Proteasome Subunits in Proerythroleukemia K562 Upon Hemin-Induced Differentiation," *Protein J.*, vol. 35, no. 1, pp. 17–23, Feb. 2016.
- [26] P. M. Kloetzel, "Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII," *Nat. Immunol.*, vol. 5, no. 7, pp. 661–669, Jul. 2004.
- [27] E. J. A. M. Sijts and P. M. Kloetzel, "The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 68, no. 9, pp. 1491–502, May 2011.
- [28] M. Chatterjee-Kishore, K. L. Wright, J. P. Ting, and G. R. Stark, "How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene.," *EMBO J.*, vol. 19, no. 15, pp. 4111–22, Aug. 2000.
- [29] K. Tanaka and M. Kasahara, "The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28.," *Immunol.*

Rev., vol. 163, pp. 161–76, Jun. 1998.

- [30] E. J. A. M. Sijts and P.-M. Kloetzel, "The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 68, no. 9, pp. 1491–1502, May 2011.
- [31] N. Qureshi, D. C. Morrison, and J. Reis, "Proteasome protease mediated regulation of cytokine induction and inflammation," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1823, no. 11, pp. 2087–2093, Nov. 2012.
- [32] H. Uechi, J. Hamazaki, and S. Murata, "Characterization of the testis-specific proteasome subunit α4s in mammals.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 18, pp. 12365–74, May 2014.
- [33] U. Tomaru, A. Ishizu, S. Murata, Y. Miyatake, S. Suzuki, S. Takahashi, T. Kazamaki, J. Ohara, T. Baba, S. Iwasaki, K. Fugo, N. Otsuka, K. Tanaka, and M. Kasahara, "Exclusive expression of proteasome subunit 5t in the human thymic cortex," *Blood*, vol. 113, no. 21, pp. 5186–5191, May 2009.
- [34] S. Murata, Y. Takahama, and K. Tanaka, "Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 192–196, Apr. 2008.
- [35] B. I. Florea, M. Verdoes, N. Li, W. A. van der Linden, P. P. Geurink, H. van den Elst, T. Hofmann, A. de Ru, P. A. van Veelen, K. Tanaka, K. Sasaki, S. Murata, H. den Dulk, J. Brouwer, F. A. Ossendorp, A. F. Kisselev, and H. S. Overkleeft, "Activity-Based Profiling Reveals Reactivity of the Murine Thymoproteasome-Specific Subunit β5t," *Chem. Biol.*, vol. 17, no. 8, pp. 795–801, Aug. 2010.
- [36] S. Murata, K. Sasaki, T. Kishimoto, S. -i. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, and K. Tanaka,
 "Regulation of CD8+ T Cell Development by Thymus-Specific Proteasomes," *Science (80-.).*,
 vol. 316, no. 5829, pp. 1349–1353, Jun. 2007.
- [37] R. T. Sauer and T. A. Baker, "AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 80, pp. 587–612, Jan. 2011.
- [38] L. Spyracopoulos, "The Proteasome: More Than a Means to an End," *Structure*, vol. 24, no. 8, pp. 1221–1223, Aug. 2016.
- [39] R. J. Tomko, M. Funakoshi, K. Schneider, J. Wang, and M. Hochstrasser, "Heterohexameric Ring Arrangement of the Eukaryotic Proteasomal ATPases: Implications for Proteasome Structure and Assembly," *Mol. Cell*, vol. 38, no. 3, pp. 393–403, May 2010.
- [40] P. Schreiner, X. Chen, K. Husnjak, L. Randles, N. Zhang, S. Elsasser, D. Finley, I. Dikic, K. J. Walters, and M. Groll, "Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction.," *Nature*, vol. 453, no. 7194, pp. 548–52, May 2008.
- [41] K. Husnjak, S. Elsasser, N. Zhang, X. Chen, L. Randles, Y. Shi, K. Hofmann, K. J. Walters, D. Finley, and I. Dikic, "Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor.," *Nature*, vol. 453, no. 7194, pp. 481–8, May 2008.
- Y. Shi, X. Chen, S. Elsasser, B. B. Stocks, G. Tian, B.-H. Lee, Y. Shi, N. Zhang, S. A. H. de Poot,
 F. Tuebing, S. Sun, J. Vannoy, S. G. Tarasov, J. R. Engen, D. Finley, and K. J. Walters, "Rpn1

provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome.," *Science*, vol. 351, no. 6275, Feb. 2016.

- [43] R. Verma, L. Aravind, R. Oania, W. H. McDonald, J. R. Yates, E. V Koonin, and R. J. Deshaies,
 "Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome," *Science (80-.).*, vol. 298, no. 5593, pp. 611–615, Oct. 2002.
- [44] M. H. Glickman, D. M. Rubin, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, W. Baumeister, V. A. Fried, and D. Finley, "A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitinconjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3.," *Cell*, vol. 94, no. 5, pp. 615–23, Sep. 1998.
- [45] M. E. Matyskiela, G. C. Lander, and A. Martin, "Conformational switching of the 26S proteasome enables substrate degradation," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 20, no. 7, pp. 781–788, Jun. 2013.
- [46] P. Sledz, P. Unverdorben, F. Beck, G. Pfeifer, A. Schweitzer, F. Forster, and W. Baumeister,
 "Structure of the 26S proteasome with ATP- S bound provides insights into the mechanism of nucleotide-dependent substrate translocation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 18, pp. 7264– 7269, Apr. 2013.
- [47] X. Wang, J. Yen, P. Kaiser, and L. Huang, "Regulation of the 26S Proteasome Complex During Oxidative Stress," *Sci. Signal.*, vol. 3, no. 151, p. ra88-ra88, Dec. 2010.
- [48] T. Grune, B. Catalgol, A. Licht, G. Ermak, A. M. Pickering, J. K. Ngo, and K. J. A. Davies, "HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 7, pp. 1355–1364, Oct. 2011.
- [49] P. Tsvetkov, N. Myers, R. Eliav, Y. Adamovich, T. Hagai, J. Adler, A. Navon, and Y. Shaul,
 "NADH binds and stabilizes the 26S proteasomes independent of ATP.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 16, pp. 11272–81, Apr. 2014.
- [50] Q. Huang, H. Wang, S. W. Perry, and M. E. Figueiredo-Pereira, "Negative Regulation of 26S Proteasome Stability via Calpain-mediated Cleavage of Rpn10 Subunit upon Mitochondrial Dysfunction in Neurons," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 17, pp. 12161–12174, Apr. 2013.
- [51] P. Cascio, M. Call, B. M. Petre, T. Walz, and A. L. Goldberg, "Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes.," *EMBO J.*, vol. 21, no. 11, pp. 2636–45, Jun. 2002.
- [52] N. Tanahashi, K. Yokota, J. Y. Ahn, C. H. Chung, T. Fujiwara, E. Takahashi, G. N. DeMartino, C. A. Slaughter, T. Toyonaga, K. Yamamura, N. Shimbara, and K. Tanaka, "Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and gamma-interferon regulation.," *Genes Cells*, vol. 2, no. 3, pp. 195–211, Mar. 1997.
- [53] F. Ossendorp, N. Fu, M. Camps, F. Granucci, S. J. P. Gobin, P. J. van den Elsen, D. Schuurhuis,
 G. J. Adema, G. B. Lipford, T. Chiba, A. Sijts, P.-M. Kloetzel, P. Ricciardi-Castagnoli, and C. J.
 M. Melief, "Differential expression regulation of the alpha and beta subunits of the PA28 proteasome activator in mature dendritic cells.," *J. Immunol.*, vol. 174, no. 12, pp. 7815–22, Jun.

2005.

- [54] K. Sadre-Bazzaz, F. G. Whitby, H. Robinson, T. Formosa, and C. P. Hill, "Structure of a Blm10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate opening.," *Mol. Cell*, vol. 37, no. 5, pp. 728–35, Mar. 2010.
- [55] B. Khor, A. L. Bredemeyer, C.-Y. Huang, I. R. Turnbull, R. Evans, L. B. Maggi, J. M. White, L. M. Walker, K. Carnes, R. A. Hess, and B. P. Sleckman, "Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 8, pp. 2999–3007, Apr. 2006.
- [56] J. Blickwedehl, M. Agarwal, C. Seong, R. K. Pandita, T. Melendy, P. Sung, T. K. Pandita, and N. Bangia, "Role for proteasome activator PA200 and postglutamyl proteasome activity in genomic stability.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 42, pp. 16165–70, Oct. 2008.
- [57] M.-X. Qian, Y. Pang, C. H. Liu, K. Haratake, B.-Y. Du, D.-Y. Ji, G.-F. Wang, Q.-Q. Zhu, W. Song, Y. Yu, X.-X. Zhang, H.-T. Huang, S. Miao, L.-B. Chen, Z.-H. Zhang, Y.-N. Liang, S. Liu, H. Cha, D. Yang, Y. Zhai, T. Komatsu, F. Tsuruta, H. Li, C. Cao, W. Li, G.-H. Li, Y. Cheng, T. Chiba, L. Wang, A. L. Goldberg, Y. Shen, and X.-B. Qiu, "Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis.," *Cell*, vol. 153, no. 5, pp. 1012–24, May 2013.
- [58] D. M. Zaiss, S. Standera, H. Holzhütter, P. Kloetzel, and A. J. Sijts, "The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes.," *FEBS Lett.*, vol. 457, no. 3, pp. 333– 8, Sep. 1999.
- [59] A. De La Mota-Peynado, S. Y.-C. Lee, B. M. Pierce, P. Wani, C. R. Singh, and J. Roelofs, "The proteasome-associated protein Ecm29 inhibits proteasomal ATPase activity and in vivo protein degradation by the proteasome.," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 41, pp. 29467–81, Oct. 2013.
- [60] A. Lehmann, A. Niewienda, K. Jechow, K. Janek, and C. Enenkel, "Ecm29 Fulfils Quality Control Functions in Proteasome Assembly," *Mol. Cell*, vol. 38, no. 6, pp. 879–888, Jun. 2010.
- [61] S. Park, W. Kim, G. Tian, S. P. Gygi, and D. Finley, "Structural Defects in the Regulatory Particle-Core Particle Interface of the Proteasome Induce a Novel Proteasome Stress Response," J. Biol. Chem., vol. 286, no. 42, pp. 36652–36666, Oct. 2011.
- [62] S. Prakash, L. Tian, K. S. Ratliff, R. E. Lehotzky, and A. Matouschek, "An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 11, no. 9, pp. 830–7, Sep. 2004.
- [63] M. Lippai and P. Lőw, "The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, p. 832704, Jun. 2014.
- [64] B. A. Schulman and J. Wade Harper, "Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 5, pp. 319–331, May 2009.
- [65] A. Ciechanover and A. Stanhill, "The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1843, no. 1, pp. 86–96, Jan. 2014.

- [66] L. Herhaus and I. Dikic, "Expanding the ubiquitin code through post-translational modification.," *EMBO Rep.*, vol. 16, no. 9, pp. 1071–83, Sep. 2015.
- [67] D. Komander, M. J. Clague, and S. Urbé, "Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 8, pp. 550–563, Aug. 2009.
- [68] R. J. Deshaies and C. A. P. Joazeiro, "RING Domain E3 Ubiquitin Ligases," Annu. Rev. Biochem., vol. 78, no. 1, pp. 399–434, Jun. 2009.
- [69] M. Rape, S. K. Reddy, and M. W. Kirschner, "The Processivity of Multiubiquitination by the APC Determines the Order of Substrate Degradation," *Cell*, vol. 124, no. 1, pp. 89–103, Jan. 2006.
- [70] W. Kim, E. J. Bennett, E. L. Huttlin, A. Guo, J. Li, A. Possemato, M. E. Sowa, R. Rad, J. Rush,
 M. J. Comb, J. W. Harper, and S. P. Gygi, "Systematic and Quantitative Assessment of the
 Ubiquitin-Modified Proteome," *Mol. Cell*, vol. 44, no. 2, pp. 325–340, Oct. 2011.
- [71] Y. Saeki, T. Kudo, T. Sone, Y. Kikuchi, H. Yokosawa, A. Toh-e, and K. Tanaka, "Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome," *EMBO J.*, vol. 28, no. 4, pp. 359–371, Feb. 2009.
- [72] N. Shabek, Y. Herman-Bachinsky, S. Buchsbaum, O. Lewinson, M. Haj-Yahya, M. Hejjaoui, H. A. Lashuel, T. Sommer, A. Brik, and A. Ciechanover, "The size of the proteasomal substrate determines whether its degradation will be mediated by mono- or polyubiquitylation.," *Mol. Cell*, vol. 48, no. 1, pp. 87–97, Oct. 2012.
- [73] J. A. Nathan, H. T. Kim, L. Ting, S. P. Gygi, and A. L. Goldberg, "Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes?," *EMBO J.*, vol. 32, no. 4, pp. 552–65, Feb. 2013.
- [74] A. Ordureau, C. Münch, and J. W. Harper, "Quantifying Ubiquitin Signaling," *Mol. Cell*, vol. 58, no. 4, pp. 660–676, May 2015.
- [75] S. E. Kaiser, B. E. Riley, T. A. Shaler, R. S. Trevino, C. H. Becker, H. Schulman, and R. R. Kopito, "Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools," *Nat. Methods*, vol. 8, no. 8, pp. 691–696, Jul. 2011.
- [76] P. Xu, D. M. Duong, N. T. Seyfried, D. Cheng, Y. Xie, J. Robert, J. Rush, M. Hochstrasser, D.
 Finley, and J. Peng, "Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation," *Cell*, vol. 137, no. 1, pp. 133–145, Apr. 2009.
- [77] Y. Lu, B. -h. Lee, R. W. King, D. Finley, and M. W. Kirschner, "Substrate degradation by the proteasome: A single-molecule kinetic analysis," *Science (80-.).*, vol. 348, no. 6231, pp. 1250834–1250834, 2015.
- [78] Y. Lu, W. Wang, and M. W. Kirschner, "Specificity of the anaphase-promoting complex: A single-molecule study," *Science* (80-.)., vol. 348, no. 6231, pp. 1248737–1248737, Apr. 2015.
- [79] D. S. Kirkpatrick, N. A. Hathaway, J. Hanna, S. Elsasser, J. Rush, D. Finley, R. W. King, and S. P. Gygi, "Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology," *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 7, pp. 700–710, Jul. 2006.

- [80] K. Martinez-Fonts and A. Matouschek, "A Rapid and Versatile Method for Generating Proteins with Defined Ubiquitin Chains," *Biochemistry*, vol. 55, no. 12, pp. 1898–1908, Mar. 2016.
- [81] K. Flick, I. Ouni, J. A. Wohlschlegel, C. Capati, W. H. McDonald, J. R. Yates, and P. Kaiser, "Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain," *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 7, pp. 634–641, Jul. 2004.
- [82] S. Fishbain, T. Inobe, E. Israeli, S. Chavali, H. Yu, G. Kago, M. M. Babu, and A. Matouschek,
 "Sequence composition of disordered regions fine-tunes protein half-life.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 22, no. 3, pp. 214–21, 2015.
- [83] H.-J. Meyer and M. Rape, "Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains.," *Cell*, vol. 157, no. 4, pp. 910–21, May 2014.
- [84] G. L. Grice, I. T. Lobb, M. P. Weekes, S. P. Gygi, R. Antrobus, and J. A. Nathan, "The Proteasome Distinguishes between Heterotypic and Homotypic Lysine-11-Linked Polyubiquitin Chains," *Cell Rep.*, vol. 12, no. 4, pp. 545–553, Jul. 2015.
- [85] J. M. Boname, M. Thomas, H. R. Stagg, P. Xu, J. Peng, and P. J. Lehner, "Efficient Internalization of MHC I Requires Lysine-11 and Lysine-63 Mixed Linkage Polyubiquitin Chains," *Traffic*, vol. 11, no. 2, pp. 210–220, Feb. 2010.
- [86] E. B. Dammer, C. H. Na, P. Xu, N. T. Seyfried, D. M. Duong, D. Cheng, M. Gearing, H. Rees, J. J. Lah, A. I. Levey, J. Rush, and J. Peng, "Polyubiquitin Linkage Profiles in Three Models of Proteolytic Stress Suggest the Etiology of Alzheimer Disease," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 12, pp. 10457–10465, Mar. 2011.
- [87] F. Ohtake, Y. Saeki, S. Ishido, J. Kanno, and K. Tanaka, "The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF-κB Signaling," *Mol. Cell*, vol. 64, no. 2, pp. 251–266, Oct. 2016.
- [88] Y. Saeki, E. Isono, and A. Toh-e, "Preparation of Ubiquitinated Substrates by the PY Motif-Insertion Method for Monitoring 26S Proteasome Activity," in *Methods in enzymology*, vol. 399, 2005, pp. 215–227.
- [89] H. C. Besche, Z. Sha, N. V. Kukushkin, A. Peth, E.-M. Hock, W. Kim, S. Gygi, J. A. Gutierrez, H. Liao, L. Dick, and A. L. Goldberg, "Autoubiquitination of the 26S Proteasome on Rpn13 Regulates Breakdown of Ubiquitin Conjugates," *EMBO J.*, vol. 33, no. 10, pp. 1159–1176, May 2014.
- [90] J. S. Thrower, L. Hoffman, M. Rechsteiner, and C. M. Pickart, "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal," *EMBO J.*, vol. 19, no. 1, pp. 94–102, Jan. 2000.
- [91] T. Kirisako, K. Kamei, S. Murata, M. Kato, H. Fukumoto, M. Kanie, S. Sano, F. Tokunaga, K. Tanaka, and K. Iwai, "A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains.," *EMBO J.*, vol. 25, no. 20, pp. 4877–87, Oct. 2006.
- [92] S. Zhao and H. D. Ulrich, "Distinct consequences of posttranslational modification by linear versus K63-linked polyubiquitin chains," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 17, pp. 7704–7709, Apr. 2010.

- [93] K.-S. Inn, M. U. Gack, F. Tokunaga, M. Shi, L.-Y. Wong, K. Iwai, and J. U. Jung, "Linear Ubiquitin Assembly Complex Negatively Regulates RIG-I- and TRIM25-Mediated Type I Interferon Induction," *Mol. Cell*, vol. 41, no. 3, pp. 354–365, Feb. 2011.
- [94] Y. Kravtsova-Ivantsiv, S. Cohen, and A. Ciechanover, "Modification by single ubiquitin moieties rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal processing of the p105 NF-kappaB precursor.," *Mol. Cell*, vol. 33, no. 4, pp. 496–504, Feb. 2009.
- [95] O. Braten, I. Livneh, T. Ziv, A. Admon, I. Kehat, L. H. Caspi, H. Gonen, B. Bercovich, A. Godzik, S. Jahandideh, L. Jaroszewski, T. Sommer, Y. T. Kwon, M. Guharoy, P. Tompa, and A. Ciechanover, "Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 32, pp. E4639–E4647, Aug. 2016.
- [96] D. Finley, "Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 78, no. 1, pp. 477–513, Jun. 2009.
- [97] B.-H. Lee, M. J. Lee, S. Park, D.-C. Oh, S. Elsasser, P.-C. Chen, C. Gartner, N. Dimova, J. Hanna,
 S. P. Gygi, S. M. Wilson, R. W. King, and D. Finley, "Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14," *Nature*, vol. 467, no. 7312, pp. 179–184, Sep. 2010.
- [98] P. D'Arcy, S. Brnjic, M. H. Olofsson, M. Fryknäs, K. Lindsten, M. De Cesare, P. Perego, B. Sadeghi, M. Hassan, R. Larsson, and S. Linder, "Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 12, pp. 1636–1640, Nov. 2011.
- [99] A. F. Kisselev, W. A. van der Linden, and H. S. Overkleeft, "Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target.," *Chem. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 99–115, Jan. 2012.
- [100] A. Varshavsky, "The Ubiquitin System, an Immense Realm," 2012.
- [101] B. Crosas, J. Hanna, D. S. Kirkpatrick, D. P. Zhang, Y. Tone, N. a Hathaway, C. Buecker, D. S. Leggett, M. Schmidt, R. W. King, S. P. Gygi, and D. Finley, "Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities.," *Cell*, vol. 127, no. 7, pp. 1401–13, Dec. 2006.
- [102] L. Tian, R. A. Holmgren, and A. Matouschek, "A conserved processing mechanism regulates the activity of transcription factors Cubitus interruptus and NF-κB," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 12, no. 12, pp. 1045–1053, Dec. 2005.
- [103] S. Aviram and D. Kornitzer, "The ubiquitin ligase Hul5 promotes proteasomal processivity.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 30, no. 4, pp. 985–94, Feb. 2010.
- [104] S. Swaminathan, A. Y. Amerik, and M. Hochstrasser, "The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 10, no. 8, pp. 2583–94, Aug. 1999.
- [105] H. Fu, S. Sadis, D. M. Rubin, M. Glickman, S. van Nocker, D. Finley, and R. D. Vierstra,
 "Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 4, pp. 1970–81, Jan. 1998.

- [106] Y. A. Lam, T. G. Lawson, M. Velayutham, J. L. Zweier, and C. M. Pickart, "A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal," *Nature*, vol. 416, no. 6882, pp. 763–767, Apr. 2002.
- [107] K. Paraskevopoulos, F. Kriegenburg, M. H. Tatham, H. I. Rösner, B. Medina, I. B. Larsen, R. Brandstrup, K. G. Hardwick, R. T. Hay, B. B. Kragelund, R. Hartmann-Petersen, and C. Gordon, "Dss1 Is a 26S Proteasome Ubiquitin Receptor," *Mol. Cell*, vol. 56, no. 3, pp. 453–461, 2014.
- [108] T. Yao, L. Song, W. Xu, G. N. DeMartino, L. Florens, S. K. Swanson, M. P. Washburn, R. C. Conaway, J. W. Conaway, and R. E. Cohen, "Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1," *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 9, pp. 994–1002, Sep. 2006.
- [109] R. Verma, R. Oania, J. Graumann, and R. J. Deshaies, "Multiubiquitin Chain Receptors Define a Layer of Substrate Selectivity in the Ubiquitin-Proteasome System," *Cell*, vol. 118, no. 1, pp. 99– 110, Jul. 2004.
- [110] T. Woelk, B. Oldrini, E. Maspero, S. Confalonieri, E. Cavallaro, P. P. Di Fiore, and S. Polo,
 "Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination," *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 11, pp. 1246–1254, Nov. 2006.
- [111] Y. Matiuhin, D. S. Kirkpatrick, I. Ziv, W. Kim, A. Dakshinamurthy, O. Kleifeld, S. P. Gygi, N. Reis, and M. H. Glickman, "Extraproteasomal Rpn10 restricts access of the polyubiquitin-binding protein Dsk2 to proteasome.," *Mol. Cell*, vol. 32, no. 3, pp. 415–25, Nov. 2008.
- [112] A. Haapasalo, J. Viswanathan, K. M. Kurkinen, L. Bertram, H. Soininen, N. P. Dantuma, R. E. Tanzi, and M. Hiltunen, "Involvement of ubiquilin-1 transcript variants in protein degradation and accumulation.," *Commun. Integr. Biol.*, vol. 4, no. 4, pp. 428–32, Jul. 2011.
- [113] S. Raasi, R. Varadan, D. Fushman, and C. M. Pickart, "Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 12, no. 8, pp. 708–714, Aug. 2005.
- [114] H. Richly, M. Rape, S. Braun, S. Rumpf, C. Hoege, and S. Jentsch, "A Series of Ubiquitin Binding Factors Connects CDC48/p97 to Substrate Multiubiquitylation and Proteasomal Targeting," *Cell*, vol. 120, no. 1, pp. 73–84, Jan. 2005.
- [115] I. Kim, J. Ahn, C. Liu, K. Tanabe, J. Apodaca, T. Suzuki, and H. Rao, "The Png1-Rad23 complex regulates glycoprotein turnover.," J. Cell Biol., vol. 172, no. 2, pp. 211–9, Jan. 2006.
- [116] S. Heessen, M. G. Masucci, and N. P. Dantuma, "The UBA2 Domain Functions as an Intrinsic Stabilization Signal that Protects Rad23 from Proteasomal Degradation," *Mol. Cell*, vol. 18, no. 2, pp. 225–235, Apr. 2005.
- [117] C. Heinen, K. Acs, D. Hoogstraten, and N. P. Dantuma, "C-terminal UBA domains protect ubiquitin receptors by preventing initiation of protein degradation," *Nat. Commun.*, vol. 2, p. 191, Feb. 2011.
- [118] S. Fishbain, T. Inobe, E. Israeli, S. Chavali, H. Yu, G. Kago, M. M. Babu, and A. Matouschek, "Sequence composition of disordered regions fine-tunes protein half-life," *Nat. Struct. Mol. Biol.*,

vol. 22, no. 3, pp. 214–221, Feb. 2015.

- [119] S. Elsasser and D. Finley, "Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines," *Nat. Cell Biol.*, vol. 7, no. 8, pp. 742–749, Aug. 2005.
- [120] R. K. Vadlamudi, I. Joung, J. L. Strominger, and J. Shin, "p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins.," J. *Biol. Chem.*, vol. 271, no. 34, pp. 20235–7, Aug. 1996.
- [121] M. L. Seibenhener, J. R. Babu, T. Geetha, H. C. Wong, N. R. Krishna, and M. W. Wooten,
 "Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 18, pp. 8055–68, Sep. 2004.
- [122] S. Pankiv, T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J.-A. Bruun, H. Outzen, A. Øvervatn, G. Bjørkøy, and T. Johansen, "p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 33, pp. 24131– 24145, Aug. 2007.
- [123] J. O. Johnson, J. Mandrioli, M. Benatar, Y. Abramzon, V. M. Van Deerlin, J. Q. Trojanowski, J. R. Gibbs, M. Brunetti, S. Gronka, J. Wuu, J. Ding, L. McCluskey, M. Martinez-Lage, D. Falcone, D. G. Hernandez, S. Arepalli, S. Chong, J. C. Schymick, J. Rothstein, F. Landi, Y.-D. Wang, A. Calvo, G. Mora, M. Sabatelli, M. R. Monsurrò, S. Battistini, F. Salvi, R. Spataro, P. Sola, G. Borghero, G. Galassi, S. W. Scholz, J. P. Taylor, G. Restagno, A. Chiò, B. J. Traynor, and B. J. Traynor, "Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS," *Neuron*, vol. 68, no. 5, pp. 857–864, Dec. 2010.
- [124] F. Madeo, J. Schlauer, H. Zischka, D. Mecke, and K. U. Fröhlich, "Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 9, no. 1, pp. 131–41, Jan. 1998.
- [125] D. J. Anderson, R. Le Moigne, S. Djakovic, B. Kumar, J. Rice, S. Wong, J. Wang, B. Yao, E. Valle, S. Kiss von Soly, A. Madriaga, F. Soriano, M.-K. Menon, Z. Y. Wu, M. Kampmann, Y. Chen, J. S. Weissman, B. T. Aftab, F. M. Yakes, L. Shawver, H.-J. Zhou, D. Wustrow, and M. Rolfe, "Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis," *Cancer Cell*, vol. 28, no. 5, pp. 653–665, Nov. 2015.
- [126] Y. Ye, "Diverse functions with a common regulator: Ubiquitin takes command of an AAA ATPase," J. Struct. Biol., vol. 156, no. 1, pp. 29–40, Oct. 2006.
- [127] H. Meyer, M. Bug, and S. Bremer, "Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system," *Nat. Cell Biol.*, vol. 14, no. 2, pp. 117–123, Feb. 2012.
- [128] R. Beckwith, E. Estrin, E. J. Worden, and A. Martin, "Reconstitution of the 26S proteasome reveals functional asymmetries in its AAA+ unfoldase.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 20, no. 10, pp. 1164–72, Oct. 2013.
- [129] T. Inobe, S. Fishbain, S. Prakash, and A. Matouschek, "Defining the geometry of the twocomponent proteasome degron.," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 161–7, Mar. 2011.

- [130] M. M. Babu, R. van der Lee, N. S. de Groot, and J. Gsponer, "Intrinsically disordered proteins: regulation and disease.," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 21, no. 3, pp. 432–40, Jun. 2011.
- [131] J. Gsponer, M. E. Futschik, S. A. Teichmann, and M. M. Babu, "Tight Regulation of Unstructured Proteins: From Transcript Synthesis to Protein Degradation," *Science (80-.).*, vol. 322, no. 5906, pp. 1365–1368, Nov. 2008.
- [132] P. Tompa, J. Prilusky, I. Silman, and J. L. Sussman, "Structural disorder serves as a weak signal for intracellular protein degradation," *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 71, no. 2, pp. 903– 909, May 2008.
- [133] H.-C. S. Yen, Q. Xu, D. M. Chou, Z. Zhao, and S. J. Elledge, "Global Protein Stability Profiling in Mammalian Cells," *Science* (80-.)., vol. 322, no. 5903, 2008.
- [134] H.-C. S. Yen and S. J. Elledge, "Identification of SCF Ubiquitin Ligase Substrates by Global Protein Stability Profiling," *Science* (80-.)., vol. 322, no. 5903, pp. 923–929, Nov. 2008.
- [135] M. J. Suskiewicz, J. L. Sussman, I. Silman, and Y. Shaul, "Context-dependent resistance to proteolysis of intrinsically disordered proteins.," *Protein Sci.*, vol. 20, no. 8, pp. 1285–97, Aug. 2011.
- [136] P. Radivojac, V. Vacic, C. Haynes, R. R. Cocklin, A. Mohan, J. W. Heyen, M. G. Goebl, and L. M. Iakoucheva, "Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites," *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 78, no. 2, pp. 365–380, Feb. 2010.
- [137] T. Hagai, A. Azia, A. Tóth-Petróczy, and Y. Levy, "Intrinsic disorder in ubiquitination substrates.," J. Mol. Biol., vol. 412, no. 3, pp. 319–24, Sep. 2011.
- [138] T. Hagai and Y. Levy, "Ubiquitin not only serves as a tag but also assists degradation by inducing protein unfolding.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 5, pp. 2001–6, Feb. 2010.
- [139] S. Prakash, T. Inobe, A. J. Hatch, and A. Matouschek, "Substrate selection by the proteasome during degradation of protein complexes.," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. 29–36, Jan. 2009.
- [140] E. S. Johnson, D. K. Gonda, and A. Varshavsky, "Cis-trans recognition and subunit-specific degradation of short-lived proteins," *Nature*, vol. 346, no. 6281, pp. 287–291, Jul. 1990.
- [141] M. Hochstrasser and A. Varshavsky, "In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast alpha 2 repressor.," *Cell*, vol. 61, no. 4, pp. 697–708, May 1990.
- [142] R. Verma, H. McDonald, J. R. Yates, and R. J. Deshaies, "Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk.," *Mol. Cell*, vol. 8, no. 2, pp. 439–48, Aug. 2001.
- [143] K. Nasmyth, M. Shirayama, A. Tóth, and M. Gálová, "APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5.," *Nature*, vol. 402, no. 6758, pp. 203–207, Nov. 1999.
- [144] M. A. Hoyt, J. Zich, J. Takeuchi, M. Zhang, C. Govaerts, and P. Coffino, "Glycine–alanine repeats impair proper substrate unfolding by the proteasome," *EMBO J.*, vol. 25, no. 8, pp. 1720–1729, Apr. 2006.

- [145] L. Tian, R. A. Holmgren, and A. Matouschek, "A conserved processing mechanism regulates the activity of transcription factors Cubitus interruptus and NF-κB," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 12, no. 12, pp. 1045–1053, Dec. 2005.
- [146] J. M. Baugh, E. G. Viktorova, and E. V. Pilipenko, "Proteasomes Can Degrade a Significant Proportion of Cellular Proteins Independent of Ubiquitination," *J. Mol. Biol.*, vol. 386, no. 3, pp. 814–827, Feb. 2009.
- [147] X. Li and P. Coffino, "Degradation of ornithine decarboxylase: exposure of the C-terminal target by a polyamine-inducible inhibitory protein.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 13, no. 4, pp. 2377–83, Apr. 1993.
- [148] D. Wu, H. Y. K. Kaan, X. Zheng, X. Tang, Y. He, Q. Vanessa Tan, N. Zhang, and H. Song, "Structural basis of Ornithine Decarboxylase inactivation and accelerated degradation by polyamine sensor Antizyme1," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 14738, Dec. 2015.
- [149] Z. Bercovich, Y. Rosenberg-Hasson, A. Ciechanover, and C. Kahana, "Degradation of ornithine decarboxylase in reticulocyte lysate is ATP-dependent but ubiquitin-independent.," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 27, pp. 15949–52, Sep. 1989.
- [150] J. Takeuchi, H. Chen, and P. Coffino, "Proteasome substrate degradation requires association plus extended peptide," *EMBO J.*, vol. 26, no. 1, pp. 123–131, Jan. 2007.
- [151] I. Jariel-Encontre, G. Bossis, and M. Piechaczyk, "Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1786, no. 2, pp. 153–77, Dec. 2008.
- [152] B. L. Bertolaet, D. J. Clarke, M. Wolff, M. H. Watson, M. Henze, G. Divita, and S. I. Reed, "UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 8, no. 5, pp. 417–422, May 2001.
- [153] M. Orlowski and S. Wilk, "Catalytic Activities of the 20 S Proteasome, a Multicatalytic Proteinase Complex," Arch. Biochem. Biophys., vol. 383, no. 1, pp. 1–16, Nov. 2000.
- [154] X. Chen, L. F. Barton, Y. Chi, B. E. Clurman, and J. M. Roberts, "Ubiquitin-Independent Degradation of Cell-Cycle Inhibitors by the REGγ Proteasome," *Mol. Cell*, vol. 26, no. 6, pp. 843– 852, Jun. 2007.
- [155] J. Erales and P. Coffino, "Ubiquitin-independent proteasomal degradation.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1843, no. 1, pp. 216–21, Jan. 2014.
- [156] G. Asher, P. Tsvetkov, C. Kahana, and Y. Shaul, "A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73," *Genes Dev.*, vol. 19, no. 3, pp. 316–321, Jan. 2005.
- [157] A. M. Pickering and K. J. A. Davies, "Degradation of Damaged Proteins," in *Progress in molecular biology and translational science*, vol. 109, 2012, pp. 227–248.
- [158] R. van der Lee, M. Buljan, B. Lang, R. J. Weatheritt, G. W. Daughdrill, A. K. Dunker, M.
 Fuxreiter, J. Gough, J. Gsponer, D. T. Jones, P. M. Kim, R. W. Kriwacki, C. J. Oldfield, R. V.
 Pappu, P. Tompa, V. N. Uversky, P. E. Wright, and M. M. Babu, "Classification of Intrinsically

Disordered Regions and Proteins," Chem. Rev., vol. 114, no. 13, pp. 6589-6631, Jul. 2014.

- [159] H. J. Dyson and P. E. Wright, "Intrinsically unstructured proteins and their functions," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 3, pp. 197–208, Mar. 2005.
- [160] C. T. Aiken, R. M. Kaake, X. Wang, and L. Huang, "Oxidative Stress-Mediated Regulation of Proteasome Complexes," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 10, no. 5, p. R110.006924, May 2011.
- [161] B. Alvarez-Castelao and J. G. Castaño, "Mechanism of direct degradation of IκBα by 20S proteasome," *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 21, pp. 4797–4802, Aug. 2005.
- [162] W. Zhang and Q. Wei, "Calcineurin stimulates the expression of inflammatory factors in RAW 264.7 cells by interacting with proteasome subunit alpha type 6," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 407, no. 4, pp. 668–673, Apr. 2011.
- [163] K. Yuksek, W. -I. Chen, D. Chien, and J. -h. J. Ou, "Ubiquitin-Independent Degradation of Hepatitis C Virus F Protein," J. Virol., vol. 83, no. 2, pp. 612–621, Jan. 2009.
- [164] R. Stohwasser, H.-G. Holzhütter, U. Lehmann, P. Henklein, and P.-M. Kloetzel, "Hepatitis B Virus HBx Peptide 116–138 and Proteasome Activator PA28 Compete for Binding to the Proteasome α4/MC6 Subunit," *Biol. Chem.*, vol. 384, no. 1, pp. 39–49, Jan. 2003.
- [165] J. Dong, W. Chen, A. Welford, and A. Wandinger-Ness, "The Proteasome α-Subunit XAPC7 Interacts Specifically with Rab7 and Late Endosomes," J. Biol. Chem., vol. 279, no. 20, pp. 21334–21342, May 2004.
- [166] J. C. Dächsel, C. B. Lücking, S. Deeg, E. Schultz, M. Lalowski, E. Casademunt, O. Corti, C. Hampe, N. Patenge, K. Vaupel, A. Yamamoto, M. Dichgans, A. Brice, E. E. Wanker, P. J. Kahle, and T. Gasser, "Parkin interacts with the proteasome subunit α4," *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 18, pp. 3913–3919, Jul. 2005.
- [167] L. Yang, Z. Tang, H. Zhang, W. Kou, Z. Lu, X. Li, Q. Li, and Z. Miao, "PSMA7 Directly Interacts with NOD1 and Regulates its Function," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 31, no. 6, pp. 952– 959, 2013.
- [168] R. Touitou, J. Richardson, S. Bose, M. Nakanishi, J. Rivett, and M. J. Allday, "A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome," *EMBO J.*, vol. 20, no. 10, pp. 2367–2375, May 2001.
- [169] Z. Zhang, H. Wang, M. Li, S. Agrawal, X. Chen, and R. Zhang, "MDM2 Is a Negative Regulator of p21 ^{WAF1/CIP1}, Independent of p53," J. Biol. Chem., vol. 279, no. 16, pp. 16000–16006, Apr. 2004.
- [170] X. Li, L. Amazit, W. Long, D. M. Lonard, J. J. Monaco, and B. W. O'Malley, "Ubiquitin- and ATP-Independent Proteolytic Turnover of p21 by the REG??-Proteasome Pathway," *Mol. Cell*, vol. 26, no. 6, pp. 831–842, Jun. 2007.
- [171] P. Yi, Q. Feng, L. Amazit, D. M. Lonard, S. Y. Tsai, M.-J. Tsai, and B. W. O'Malley, "Atypical Protein Kinase C Regulates Dual Pathways for Degradation of the Oncogenic Coactivator SRC-3/AIB1," *Mol. Cell*, vol. 29, no. 4, pp. 465–476, Feb. 2008.

- [172] X. Li, D. M. Lonard, S. Y. Jung, A. Malovannaya, Q. Feng, J. Qin, S. Y. Tsai, M.-J. Tsai, and B. W. O'Malley, "The SRC-3/AIB1 Coactivator Is Degraded in a Ubiquitin- and ATP-Independent Manner by the REGγ Proteasome," *Cell*, vol. 124, no. 2, pp. 381–392, Jan. 2006.
- [173] P. Sdek, H. Ying, D. L. F. Chang, W. Qiu, H. Zheng, R. Touitou, M. J. Allday, and Z.-X. Jim Xiao, "MDM2 Promotes Proteasome-Dependent Ubiquitin-Independent Degradation of Retinoblastoma Protein," *Mol. Cell*, vol. 20, no. 5, pp. 699–708, Dec. 2005.
- [174] B. Alvarez-Castelao, M. Goethals, J. Vandekerckhove, and J. G. Castaño, "Mechanism of cleavage of alpha-synuclein by the 20S proteasome and modulation of its degradation by the RedOx state of the N-terminal methionines," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1843, no. 2, pp. 352–365, Feb. 2014.
- [175] F. Yuan, Y. Ma, P. You, W. Lin, H. Lu, Y. Yu, X. Wang, J. Jiang, P. Yang, Q. Ma, and T. Tao, "A novel role of proteasomal β1 subunit in tumorigenesis.," *Biosci. Rep.*, vol. 33, no. 4, Jul. 2013.
- [176] C. Gruendler, Y. Lin, J. Farley, and T. Wang, "Proteasomal degradation of Smad1 induced by bone morphogenetic proteins.," J. Biol. Chem., vol. 276, no. 49, pp. 46533–43, Dec. 2001.
- [177] J. Adler, N. Reuven, C. Kahana, and Y. Shaul, "c-Fos Proteasomal Degradation Is Activated by a Default Mechanism, and Its Regulation by NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 Determines c-Fos Serum Response Kinetics," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 30, no. 15, pp. 3767–3778, Aug. 2010.
- [178] J. L. Pakay, J. Diesch, O. Gilan, Y.-Y. Yip, E. Sayan, W. Kolch, J. M. Mariadason, R. D. Hannan, E. Tulchinsky, and A. S. Dhillon, "A 19S proteasomal subunit cooperates with an ERK MAPKregulated degron to regulate accumulation of Fra-1 in tumour cells," *Oncogene*, vol. 31, no. 14, pp. 1817–1824, Apr. 2012.
- [179] T. Dange, D. Smith, T. Noy, P. C. Rommel, L. Jurzitza, R. J. B. Cordero, A. Legendre, D. Finley,
 A. L. Goldberg, and M. Schmidt, "Blm10 Protein Promotes Proteasomal Substrate Turnover by an Active Gating Mechanism," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 50, pp. 42830–42839, Dec. 2011.
- [180] S. P. Melo, K. W. Barbour, and F. G. Berger, "Cooperation between an intrinsically disordered region and a helical segment is required for ubiquitin-independent degradation by the proteasome.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 42, pp. 36559–67, Oct. 2011.
- [181] A. K. Singh Gautam, S. Balakrishnan, and P. Venkatraman, "Direct Ubiquitin Independent Recognition and Degradation of a Folded Protein by the Eukaryotic Proteasomes-Origin of Intrinsic Degradation Signals," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e34864, Apr. 2012.
- [182] O. S. Alfassy, I. Cohen, Y. Reiss, B. Tirosh, and T. Ravid, "Placing a disrupted degradation motif at the C terminus of proteasome substrates attenuates degradation without impairing ubiquitylation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 18, pp. 12645–53, May 2013.
- [183] P. Tsvetkov, N. Reuven, and Y. Shaul, "The nanny model for IDPs," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 11, pp. 778–781, Nov. 2009.
- [184] B. D. Trapp and G. J. Kidd, "Structure of the Myelinated Axon," in *Myelin Biology and Disorders*, Elsevier, 2004, pp. 3–27.

- [185] A. T. Campagnoni and C. W. Campagnoni, "Chapter 15 Myelin Basic Protein Gene," in *Myelin Biology and Disorders*, 2004, pp. 387–400.
- [186] Y. Min, K. Kristiansen, J. M. Boggs, C. Husted, J. A. Zasadzinski, and J. Israelachvili, "Interaction forces and adhesion of supported myelin lipid bilayers modulated by myelin basic protein.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 9, pp. 3154–9, Mar. 2009.
- [187] L. Steinman, "Multiple sclerosis: a two-stage disease.," Nat. Immunol., vol. 2, no. 9, pp. 762–764, Sep. 2001.
- [188] A. K. Dunker, J. D. Lawson, C. J. Brown, R. M. Williams, P. Romero, J. S. Oh, C. J. Oldfield, A. M. Campen, C. M. Ratliff, K. W. Hipps, J. Ausio, M. S. Nissen, R. Reeves, C. Kang, C. R. Kissinger, R. W. Bailey, M. D. Griswold, W. Chiu, E. C. Garner, and Z. Obradovic, "Intrinsically disordered protein.," *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 19, no. 1, pp. 26–59, 2001.
- [189] S. Cheifetz and M. A. Moscarello, "Effect of bovine basic protein charge microheterogeneity on protein-induced aggregation of unilamellar vesicles containing a mixture of acidic and neutral phospholipids," *Biochemistry*, vol. 24, no. 8, pp. 1909–1914, Apr. 1985.
- [190] D. R. Beniac, D. D. Wood, N. Palaniyar, F. P. Ottensmeyer, M. A. Moscarello, and G. Harauz,
 "Cryoelectron Microscopy of Protein–Lipid Complexes of Human Myelin Basic Protein Charge Isomers Differing in Degree of Citrullination," *J. Struct. Biol.*, vol. 129, no. 1, pp. 80–95, Feb. 2000.
- [191] E. S. Kuzina, E. L. Chernolovskaya, A. A. Kudriaeva, M. A. Zenkova, V. D. Knorre, E. A. Surina, N. A. Ponomarenko, T. V. Bobik, I. V. Smirnov, A. V. Bacheva, A. A. Belogurov, A. G. Gabibov, and V. V. Vlasov, "Immunoproteasome enhances intracellular proteolysis of myelin basic protein.," *Dokl. Biochem. Biophys.*, vol. 453, no. 1, pp. 300–303, Nov. 2013.
- [192] A. Belogurov, E. Kuzina, A. Kudriaeva, A. Kononikhin, S. Kovalchuk, Y. Surina, I. Smirnov, Y. Lomakin, A. Bacheva, A. Stepanov, Y. Karpova, Y. Lyupina, O. Kharybin, D. Melamed, N. Ponomarenko, N. Sharova, E. Nikolaev, and A. Gabibov, "Ubiquitin-independent proteosomal degradation of myelin basic protein contributes to development of neurodegenerative autoimmunity.," *FASEB J.*, vol. 29, no. 5, pp. 1901–13, May 2015.
- [193] E. Kuzina, A. Kudriaeva, I. Smirnov, M. V Dubina, A. Gabibov, and A. Belogurov, "Glatiramer acetate and nanny proteins restrict access of the multiple sclerosis autoantigen myelin basic protein to the 26S proteasome.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, p. 926394, Sep. 2014.
- [194] M. Raule, F. Cerruti, and P. Cascio, "Enhanced rate of degradation of basic proteins by 26S immunoproteasomes.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1843, no. 9, pp. 1942–1947, May 2014.
- [195] D. V Maltseva, N. A. Khaustova, N. N. Fedotov, E. O. Matveeva, A. E. Lebedev, M. U. Shkurnikov, V. V Galatenko, U. Schumacher, and A. G. Tonevitsky, "High-throughput identification of reference genes for research and clinical RT-qPCR analysis of breast cancer samples," *J. Clin. Bioinforma.*, vol. 3, no. 1, p. 13, Jul. 2013.
- [196] L. Oliveira-Ferrer, K. Rößler, V. Haustein, C. Schröder, D. Wicklein, D. Maltseva, N. Khaustova,

T. Samatov, A. Tonevitsky, S. Mahner, F. Jänicke, U. Schumacher, and K. Milde-Langosch, "c-FOS suppresses ovarian cancer progression by changing adhesion," *Br. J. Cancer*, vol. 110, no. 3, pp. 753–763, Feb. 2014.

- [197] D. A. Sakharov, D. V. Maltseva, E. A. Riabenko, M. U. Shkurnikov, H. Northoff, A. G. Tonevitsky, and A. I. Grigoriev, "Passing the anaerobic threshold is associated with substantial changes in the gene expression profile in white blood cells," *Eur. J. Appl. Physiol.*, vol. 112, no. 3, pp. 963–972, Mar. 2012.
- [198] S. D. Miller, W. J. Karpus, and T. S. Davidson, "Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse.," *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. Chapter 15, p. Unit 15.1, May 2007.
- [199] L. B. Pritzker, S. Joshi, J. J. Gowan, G. Harauz, and M. A. Moscarello, "Deimination of myelin basic protein. 1. Effect of deimination of arginyl residues of myelin basic protein on its structure and susceptibility to digestion by cathepsin D.," *Biochemistry*, vol. 39, no. 18, pp. 5374–81, May 2000.
- [200] A. Hershko, H. Heller, S. Elias, and A. Ciechanover, "Components of Ubiquitin-Protein Ligase System," J. Biol. Chem., vol. 258, no. 13, pp. 8206–8214, 1983.
- [201] K. D. McCarthy and J. de Vellis, "Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue.," J. Cell Biol., vol. 85, no. 3, pp. 890–902, Jun. 1980.
- [202] J. Zhao, B. Zhai, S. P. Gygi, and A. L. Goldberg, "mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy.," *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A., vol. 112, no. 52, pp. 15790–7, Dec. 2015.
- [203] A. Hershko, A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas, and I. A. Rose, "Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATPdependent proteolysis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 77, no. 4, pp. 1783–6, Apr. 1980.
- [204] R. Hough, G. Pratt, and M. Rechsteiner, "Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate.," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 17, pp. 8303–13, Jun. 1987.
- [205] T. Inobe and A. Matouschek, "Paradigms of protein degradation by the proteasome.," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 24, pp. 156–64, Feb. 2014.
- [206] J. Z. Yao, C. Uttamapinant, A. Poloukhtine, J. M. Baskin, J. A. Codelli, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, V. V. Popik, and A. Y. Ting, "Fluorophore Targeting to Cellular Proteins via Enzyme-Mediated Azide Ligation and Strain-Promoted Cycloaddition," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 8, pp. 3720–3728, Feb. 2012.
- [207] C. Uttamapinant, K. A. White, H. Baruah, S. Thompson, M. Fernández-Suárez, S. Puthenveetil, and A. Y. Ting, "A fluorophore ligase for site-specific protein labeling inside living cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 24, pp. 10914–9, Jun. 2010.
- [208] D. S. Liu, L. G. Nivón, F. Richter, P. J. Goldman, T. J. Deerinck, J. Z. Yao, D. Richardson, W. S. Phipps, A. Z. Ye, M. H. Ellisman, C. L. Drennan, D. Baker, and A. Y. Ting, "Computational design of a red fluorophore ligase for site-specific protein labeling in living cells.," *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U. S. A., vol. 111, no. 43, pp. E4551-9, Oct. 2014.

- [209] W. Xu, J. S. Kong, Y.-T. E. Yeh, and P. Chen, "Single-molecule nanocatalysis reveals heterogeneous reaction pathways and catalytic dynamics," *Nat. Mater.*, vol. 7, no. 12, pp. 992– 996, Dec. 2008.
- [210] O. Tour, R. M. Meijer, D. A. Zacharias, S. R. Adams, and R. Y. Tsien, "Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation," *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 12, pp. 1505–1508, Dec. 2003.
- [211] G. Gaietta, T. J. Deerinck, S. R. Adams, J. Bouwer, O. Tour, D. W. Laird, G. E. Sosinsky, R. Y. Tsien, and M. H. Ellisman, "Multicolor and Electron Microscopic Imaging of Connexin Trafficking," *Science (80-.).*, vol. 296, no. 5567, pp. 503–507, Apr. 2002.
- [212] A. Hershko and A. Ciechanover, "The Ubiquitin System for Protein Degradation," Annu. Rev. Biochem., vol. 61, no. 1, pp. 761–807, Jun. 1992.
- [213] M. Maguire, P. C. Nield, T. Devling, R. E. Jenkins, B. K. Park, R. Polański, N. Vlatković, and M. T. Boyd, "MDM2 Regulates Dihydrofolate Reductase Activity through Monoubiquitination," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 9, 2008.
- [214] Y.-C. Hsieh, P. Tedeschi, R. Adebisi Lawal, D. Banerjee, K. Scotto, J. E. Kerrigan, K.-C. Lee, N. Johnson-Farley, J. R. Bertino, and E. E. Abali, "Enhanced degradation of dihydrofolate reductase through inhibition of NAD kinase by nicotinamide analogs.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 83, no. 2, pp. 339–53, Feb. 2013.
- [215] N. Shabek, Y. Herman-Bachinsky, and A. Ciechanover, "Ubiquitin degradation with its substrate, or as a monomer in a ubiquitination-independent mode, provides clues to proteasome regulation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 29, pp. 11907–11912, Jul. 2009.
- [216] Y. Hiroi and M. Rechsteiner, "Ubiquitin metabolism in HeLa cells starved of amino acids.," FEBS Lett., vol. 307, no. 2, pp. 156–61, Jul. 1992.
- [217] C. Li and D. E. Johnson, "Bortezomib induces autophagy in head and neck squamous cell carcinoma cells via JNK activation," *Cancer Lett.*, vol. 314, no. 1, pp. 102–107, Jan. 2012.
- [218] M. Gatti, S. Pinato, A. Maiolica, F. Rocchio, M. G. Prato, R. Aebersold, and L. Penengo,
 "RNF168 Promotes Noncanonical K27 Ubiquitination to Signal DNA Damage," *Cell Rep.*, vol. 10, no. 2, pp. 226–238, Jan. 2015.
- [219] J. C. Tran, L. Zamdborg, D. R. Ahlf, J. E. Lee, A. D. Catherman, K. R. Durbin, J. D. Tipton, A. Vellaichamy, J. F. Kellie, M. Li, C. Wu, S. M. M. Sweet, B. P. Early, N. Siuti, R. D. LeDuc, P. D. Compton, P. M. Thomas, and N. L. Kelleher, "Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics," *Nature*, vol. 480, no. 7376, pp. 254–258, Oct. 2011.
- [220] N. W. Pierce, G. Kleiger, S. Shan, and R. J. Deshaies, "Detection of sequential polyubiquitylation on a millisecond timescale," *Nature*, vol. 462, no. 7273, pp. 615–619, Dec. 2009.
- [221] D. Zhang, T. Chen, I. Ziv, R. Rosenzweig, Y. Matiuhin, V. Bronner, M. H. Glickman, and D. Fushman, "Together, Rpn10 and Dsk2 can serve as a polyubiquitin chain-length sensor.," *Mol.*

Cell, vol. 36, no. 6, pp. 1018-33, Dec. 2009.

- [222] N. P. Dantuma, T. A. M. Groothuis, F. A. Salomons, and J. Neefjes, "A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling.," *J. Cell Biol.*, vol. 173, no. 1, pp. 19–26, Apr. 2006.
- [223] Y. Murakami, S. Matsufuji, and T. Kameji, "Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination," *Nature*, vol. 360, 1992.
- [224] J. Schrader, F. Henneberg, R. A. Mata, K. Tittmann, T. R. Schneider, H. Stark, G. Bourenkov, and A. Chari, "The inhibition mechanism of human 20 S proteasomes enables next-generation inhibitor design," *Science* (80-.)., vol. 353, no. 6299, pp. 594–598, Aug. 2016.
- [225] C.-W. Liu, M. J. Corboy, G. N. DeMartino, and P. J. Thomas, "Endoproteolytic activity of the proteasome.," *Science*, vol. 299, no. 5605, pp. 408–11, Jan. 2003.
- [226] K. a. Vassall, A. D. Jenkins, V. V. Bamm, and G. Harauz, "Thermodynamic Analysis of the Disorder-to-α-Helical Transition of 18.5-kDa Myelin Basic Protein Reveals an Equilibrium Intermediate Representing the Most Compact Conformation," *J. Mol. Biol.*, vol. 427, no. 10, pp. 1977–1992, 2015.
- [227] T. U. Ulrich, E. S. Wurtele, and B. J. Nikolau, "Sequence of EMB-1, an mRNA accumulating specifically in embryos of carrot.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 18, no. 9, p. 2826, May 1990.
- [228] J. Eom, W. R. Baker, A. Kintanar, and E. S. Wurtele, "The embryo-specific EMB-1 protein of Daucus carota is flexible and unstructured in solution," *Plant Sci.*, vol. 115, no. 1, pp. 17–24, Mar. 1996.
- [229] H. Yu, A. K. Singh Gautam, S. R. Wilmington, D. Wylie, K. Martinez-Fonts, G. Kago, M. Warburton, S. Chavali, T. Inobe, I. J. Finkelstein, M. M. Babu, and A. Matouschek, "Conserved Sequence Preferences Contribute to Substrate Recognition by the Proteasome.," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 28, pp. 14526–39, Jul. 2016.
- [230] E. Sakata, S. Bohn, O. Mihalache, P. Kiss, F. Beck, I. Nagy, S. Nickell, K. Tanaka, Y. Saeki, F. Förster, and W. Baumeister, "Localization of the proteasomal ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 by electron cryomicroscopy.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 5, pp. 1479–84, Jan. 2012.
- [231] T. Kaneko, J. Hamazaki, S. Iemura, K. Sasaki, K. Furuyama, T. Natsume, K. Tanaka, and S. Murata, "Assembly Pathway of the Mammalian Proteasome Base Subcomplex Is Mediated by Multiple Specific Chaperones," *Cell*, vol. 137, no. 5, pp. 914–925, May 2009.
- [232] C. P. Hill, J. R. Knowlton, S. C. Johnston, F. G. Whitby, C. Realini, Z. Zhang, and M. Rechsteiner, "Structure of the proteasome activator REG|[alpha]| (PA28|[alpha]])," *Nature*, vol. 390, no. 6660, pp. 639–643, Dec. 1997.
- [233] K. Sharma, S. Schmitt, C. G. Bergner, S. Tyanova, N. Kannaiyan, N. Manrique-Hoyos, K. Kongi, L. Cantuti, U.-K. Hanisch, M.-A. Philips, M. J. Rossner, M. Mann, and M. Simons, "Cell typeand brain-resolved mouse brain proteome," *Nat. Neurosci.*, vol. 18, no. November, pp. 1–16,

2015.

- [234] A. Zeisel, A. B. Muñoz-Manchado, S. Codeluppi, P. Lönnerberg, G. La Manno, A. Juréus, S. Marques, H. Munguba, L. He, C. Betsholtz, C. Rolny, G. Castelo-Branco, J. Hjerling-Leffler, and S. Linnarsson, "Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq," *Science (80-.).*, vol. 347, no. 6226, 2015.
- [235] D. W. Huang, B. T. Sherman, and R. A. Lempicki, "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources," *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 1, pp. 44–57, Dec. 2008.
- [236] A. Belogurov, A. Kudriaeva, E. Kuzina, I. Smirnov, T. Bobik, N. Ponomarenko, Y. Kravtsova-Ivantsiv, A. Ciechanover, and A. Gabibov, "Multiple Sclerosis Autoantigen Myelin Basic Protein Escapes Control by Ubiquitination During Proteasomal Degradation.," J. Biol. Chem., Apr. 2014.
- [237] Z. Miller, L. Ao, K. Bo Kim, and W. Lee, "Inhibitors of the Immunoproteasome: Current Status and Future Directions," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, no. 22, pp. 4140–4151, May 2013.
- [238] D. J. Kuhn, S. A. Hunsucker, Q. Chen, P. M. Voorhees, M. Orlowski, and R. Z. Orlowski, "Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors," *Blood*, vol. 113, no. 19, 2009.
- [239] R. A. Reisfeld, U. J. Lewis, and D. E. Williams, "Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels," *Nature*, 1962.