

На правах рукописи

Кудряева Анна Анатольевна

**Молекулярный механизм узнавания полипептидных субстратов
регуляторными субчастицами протеасомы**

Специальность 03.01.04 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2018

Работа выполнена в лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Кандидат химических наук
Белогуров Алексей Анатольевич

Официальные оппоненты:

Хомутов Алексей Радиевич, доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений.

Цимоха Анна Сергеевна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Защита диссертации состоится _____, в _____ на заседании Диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Протеасома представляет собой мультисубъединичный протеиназный комплекс, гидролизующий большинство 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. Сигналом протеасомной деградации является цепь из молекул убиквитина, ковалентно связанная с белком-мишенью. 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. Кроме убиквитин-зависимой деградации, существует также убиквитин-независимая деградация, в этом случае сигналом для протеолиза является либо последовательность внутри самого белка, либо некоторая вспомогательная молекула. На настоящий момент известно около двух десятков белков, подвергающихся гидролизу протеасомой без предварительной модификации убиквитином. В лаборатории биокатализа ИБХ РАН ранее были получены предварительные данные, свидетельствующие о том, что один из основных аутоантигенов при рассеянном склерозе, основной белок миелина, способен разрушаться протеасомой по убиквитин-независимому пути.

Степень разработанности темы исследования. 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 полиубиквитиновой цепи, круговорот и деградация самого убиквитина, а также структурные детерминанты, 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 убиквитин-независимого 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 протеасом-опосредованного метаболизма MBP.

Научная новизна работы. В настоящей работе впервые было корректно определено время полужизни убиквитина, а также среднее количество молекул убиквитина, конъюгированное с субстратами протеасомы. Проведена оценка субстратной 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 процесса. Была теоретически предсказана и экспериментально подтверждена аминокислотная последовательность миелин-подобного дегрона, способного придавать полипептидам способность подвергаться гидролизу протеасомой без участия убиквитина.

Практическая значимость работы. 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 протеасом-опосредованного метаболизма MBP.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 14-14-00585 «Молекулярный механизм убиквитин-независимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии», получившего поддержку в рамках конкурса «Проведение фундаментальных

научных исследований и поисковых научных исследований отдельными научными группами».

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 физико-химической 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 физико-химической 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 включают 5 статей в российских и иностранных журналах и 10 тезисов конференций.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (239 источников). Работа изложена на 130 страницах машинописного текста и содержит 46 рисунков.

В первой главе представлен анализ литературных данных, описывающих общие закономерности функционирования убиквитин-протеасомной системы. Рассмотрено устройство протеасомы, механизм гидролиза субстратов протеасомой, а также описаны свойства основного белка миелина.

Во второй главе приведены сведения о реагентах и материалах, используемых в работе. Изложены методики работы с ДНК и белками, протоколы проведения хроматографических процедур, а также описаны методы работы с бактериальными клетками, клетками млекопитающих и экспериментальными животными.

В третьей главе представлены результаты и обсуждение экспериментов по определению молекулярного механизма гидролиза субстратов протеасомой с участием

и без участия убиквитина, а также созданию подходов к контролю протеасом-опосредованного метаболизма MBP.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

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

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

Одной из самых больших трудностей является наблюдение за протеасом-опосредованным гидролизом белков. В настоящей работе для решения этой задачи было предложено использовать ранее опубликованный метод PRIME (PRobe Incorporation Mediated by Enzymes), основой которого является модифицированная липоат-лигаза типа A (LpIA), содержащая три замены в активном центре E20A/F147A/H149G [LpIA (AAG)], обладающая способностью *in vivo* ковалентно присоединять молекулу низкомолекулярного флуорофора резорурфина (ex/em 560/585 нм) к остатку лизина в составе специфической 13-членной аминокислотной последовательности (LAP2), слитной с белком-мишенью (Рис. 1).

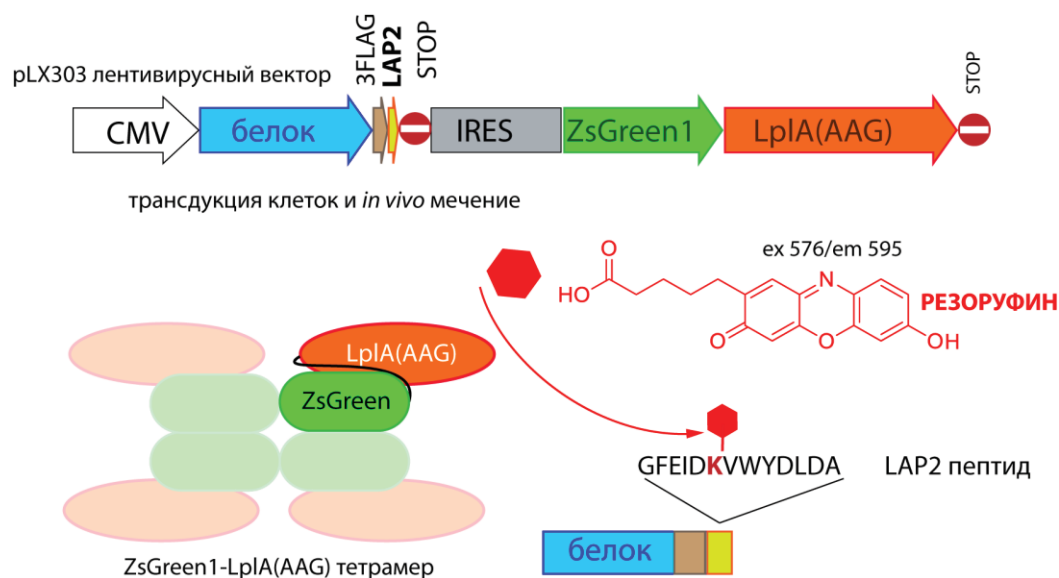


Рисунок 1. Схема конструкции, кодирующей бицистронную мРНК, содержащую последовательности исследуемого белка, участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и зеленого флуоресцентного белка ZsGreen1, слитного с LpIA (AAG) лигазой (вверху). Схема сайт-специфической конъюгации белка, слитного с пептидом LAP2, с резорурфином (внизу).

Для мониторинга внутриклеточного протеолиза клетки HEK293, трансфицированные конструкциями, кодирующими MBP и дигидрофолатредуктазу (DHFR), обрабатывали циклогексимидом (CHX). Как и ожидалось, количество резорурфин-меченного MBP-LAP2 уменьшалось независимо от добавления CHX вследствие гидролиза белка протеасомой, тогда как总量ное количество MBP-LAP2, измеренное с по-

мощью иммуноблоттинга, уменьшалось только в случае ингибирования синтеза белка (**Рис. 2А**). Флуоресцентная микроскопия живых клеток подтвердила отсутствие сигнала, соответствующего резорufину, в клетках, экспрессирующих MBP-LAP2, обработанных циклогексимидом CHX или ДМСО, спустя 4 часа после мечения, в то время как флуоресценция в красной области присутствовала в клетках, инкубированных с ингибитором протеасомы в присутствии CHX или без него (**Рис. 2Б**). В случае белка DHFR-LAP2, который не является протеасомным субстратом, общее количество и количество белка, модифицированного резорufином, в течение 4 часов значительно не менялось. С применением методики PRIME нами было установлено время полужизни белков MBP и DHFR в клетке, оно составило 2,5 и 9 часов, соответственно, что соотносится с уже известными литературными данными.

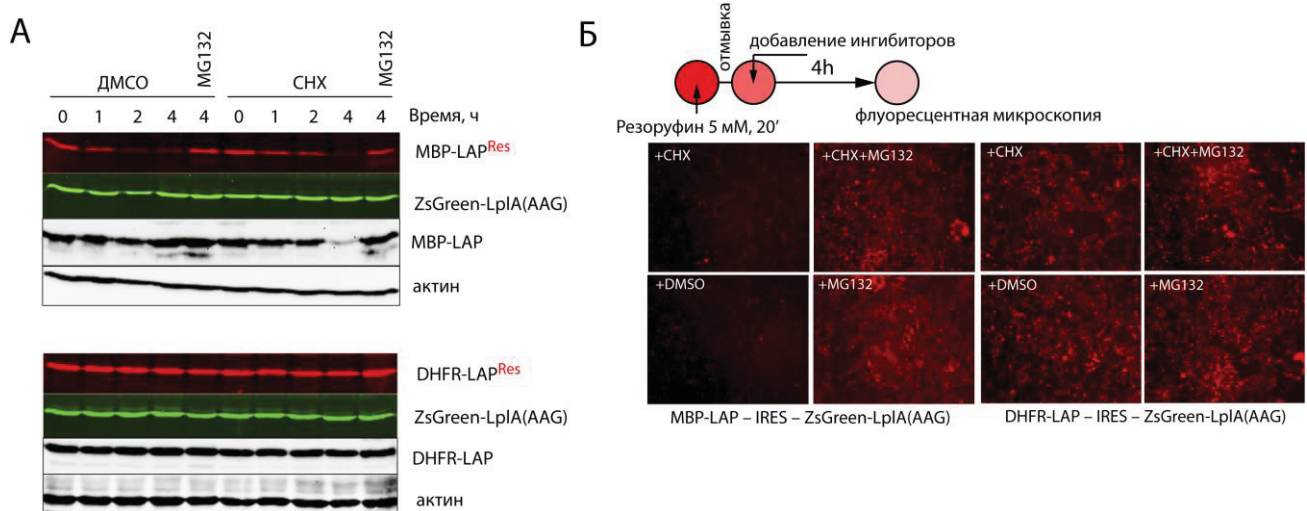


Рисунок 2. (А) Клетки HEK293, экспрессирующие MBP-LAP2 или DHFR-LAP2, были обработаны резорufином и инкубированы в присутствии или в отсутствие CHX в течение различных промежутков времени. Далее был проведен анализ клеточных лизатов в ПААГ и последующей визуализацией флуоресценции в геле, а также иммуноблоттинг с использованием антител против FLAG-эпитопа или актина. (Б) Клетки HEK293, экспрессирующие MBP-LAP или DHFR-LAP, были обработаны резорufином (Res) и инкубированы в присутствии или в отсутствие CHX и MG-132. Через 4 часа флуоресценцию внутриклеточного резорufина визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии.

В дополнение к стабильному белку DHFR и MBP со средним временем полужизни был создан быстро подвергающийся гидролизу Ub-зависимый субстрат, Ub-DHFR-LAP2. Мы анализировали изменение уровня зеленой и красной флуоресценции во времени в клетках, обработанных резорufином. Используя логически выбранные области на гистограмме распределения клеток, соответствующие клеткам с флуоресценцией ZsGreen (G1), и одновременно с низкой (G2) или высокой флуоресценцией резорufина (G3), с применением флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) нами были отобраны клетки с соответствующим фенотипом. Анализ популя-

ций G2 и G3 клеток, трансдуцированных конструкциями, кодирующими MBP-LAP2, DHFR-LAP2 и Ub-DHFR-LAP2, и обработанных резорфуфином, показал, что после 2 часов инкубации клетки, экспрессирующие DHFR-LAP2, распределялись по фракциям аналогично клеткам в нулевой точке; в то время как клетки, экспрессирующие MBP-LAP2, постепенно перемещались из G3 в G2, а клетки, экспрессирующие Ub-DHFR-LAP2, находились практически полностью во фракции G2 во всех временных точках (Рис. 3А). Для наглядной демонстрации того, что методика PRIME может быть использована для анализа времени полужизни одновременно нескольких белков, клетки HEK293 были трансдуцированы совместно тремя лентивирусными конструкциями, кодирующими MBP-LAP2, DHFR-LAP2 и Ub-DHFR-LAP2 (Рис. 3Б). 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. 3В). Суммируя полученные результаты, можно утверждать, что использование метода PRIME позволяет анализировать деградацию белков с помощью детекции их флуоресценции в ПААГ геле, флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии, кроме того появляется возможность ранжировать полипептидные субстраты в соответствии с их стабильностью в клетке.

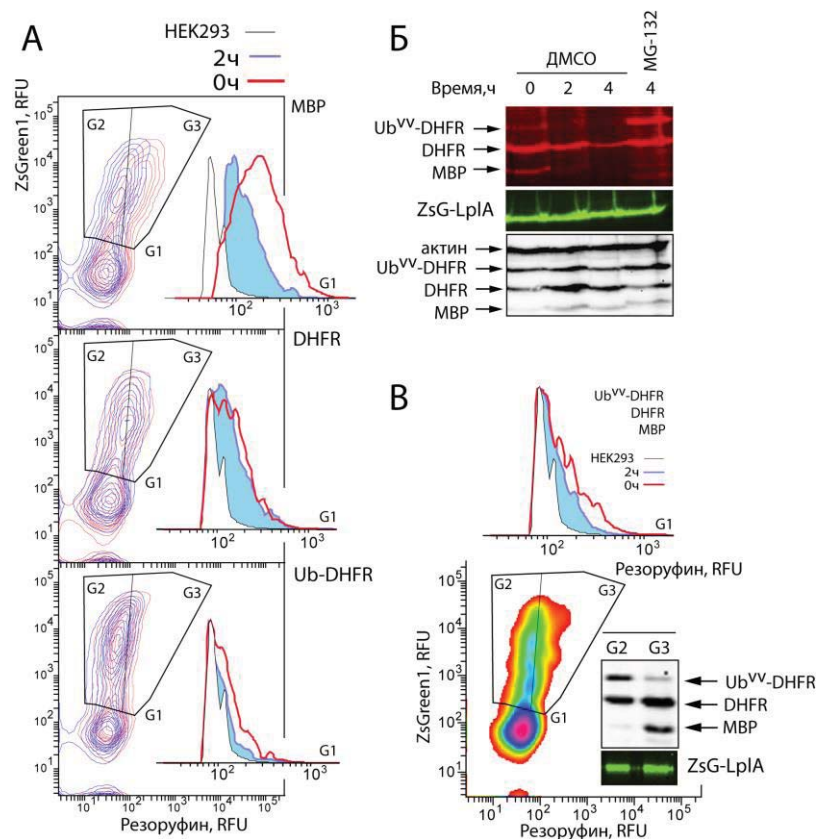


Рисунок 3. (А) Клетки, экспрессирующие MBP-LAP2, DHFR-LAP2 или Ub-DHFR-LAP2, были обработаны резорфуфином и разделены на фракции G2 и G3 с помощью FACS. (Б) Клетки, экспрессирующие одновременно MBP-LAP2, DHFR-LAP2 и Ub-

DHFR-LAP2, обработали резорудином и инкубировали указанные промежутки времени. Клеточные лизаты анализировали с помощью флуоресценции в ПААГ и иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-эпитопа или актина. **(В)** Клетки, экспрессирующие MBP-LAP2, DHFR-LAP2 и Ub-DHFR-LAP2, обработали резорудином и анализированы с помощью FACS через 2 часа после модификации резорудином. Лизаты отобранных клеток (фракции G2 и G3) анализировали как описано в (Б).

1.2. Определение времени полужизни молекулы убиквитина в клетках млекопитающих

Далее был проанализирован метаболизм важнейшего белка убиквитин-протеасомной системы – убиквитина – слитного с LAP2 (LAP2-Ub) с помощью метода PRIME. Клетки HEK293, экспрессирующие LAP2-Ub и ZsGreen-LplA (AAG), инкубировали с резорудином и дополнительно обрабатывали ингибитором протеасомы PS-341, ингибиторами ферментов деубиквитинирования (DUB) PR-619 и WP1130 или ДМСО. Данный эксперимент свидетельствует, что происходит успешное встраивание LAP2-Ub в эндогенные полиубиквитиновые цепи (**Рис. 4А**). Флуоресцентная микроскопия меченых резорудином клеток, экспрессирующих LAP2-Ub, показала, что сигнал, соответствующий резорудину, в значительной степени уменьшается уже через 4-5 часов после удаления флуорофора (**Рис. 4Б**) в отличие от аналогичных клеток, обработанных PS-341. Исходя из полученных нами данных, убиквитин подвергается гидролизу преимущественно протеасомой, так как при добавлении ингибитора протеасомы происходит резкое замедление его метаболизма.

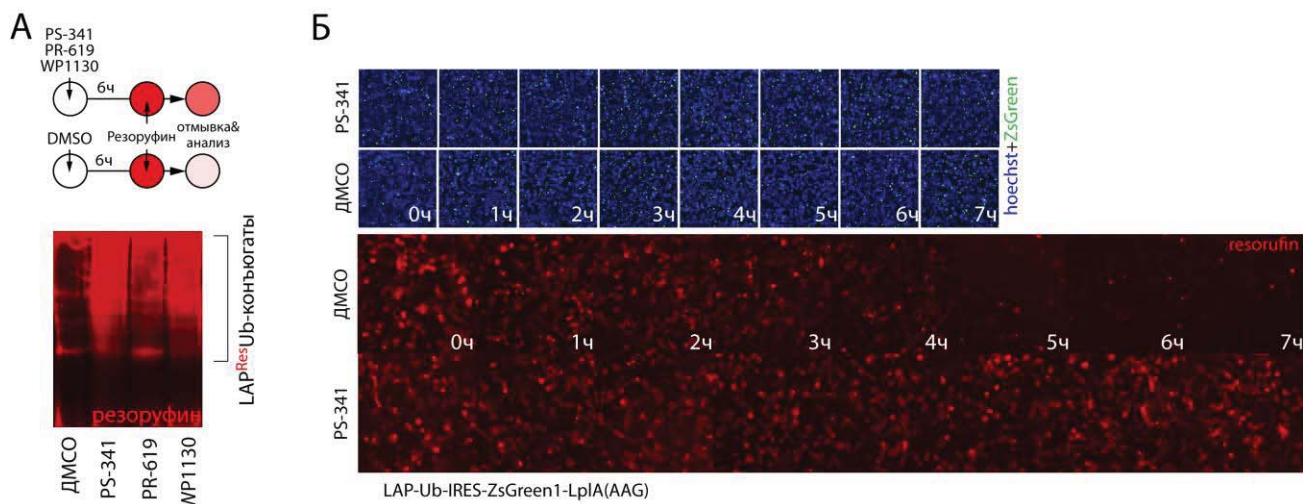
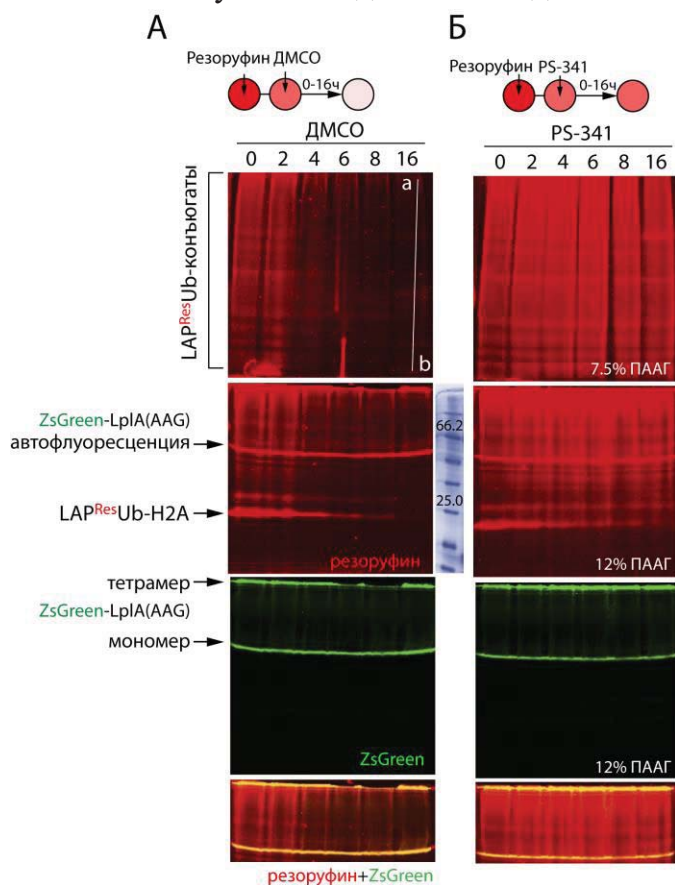


Рисунок 4. (А) Клетки, экспрессирующие LAP2-Ub, инкубировали в присутствии ДМСО, ингибитора протеасомы PS-341 или ингибиторов DUB PR-619 и WP1130 и через 6 часов метили резорудином. Флуоресценцию резорудина визуализировали с помощью ПААГ (А) или флуоресцентной микроскопии (Б).

Чтобы более точно оценить время полужизни Ub в клетках млекопитающих, клетки, стабильно экспрессирующие LAP2-Ub, обрабатывали резорудином в присут-

ствии (**Рис. 5Б**) или отсутствии (**Рис. 5А**) ингибитора протеасомы PS-341, а затем оценивали интенсивность флуоресценции полиубиквитинированных конъюгатов в ПААГ. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что количество LAP-Ub в поли-



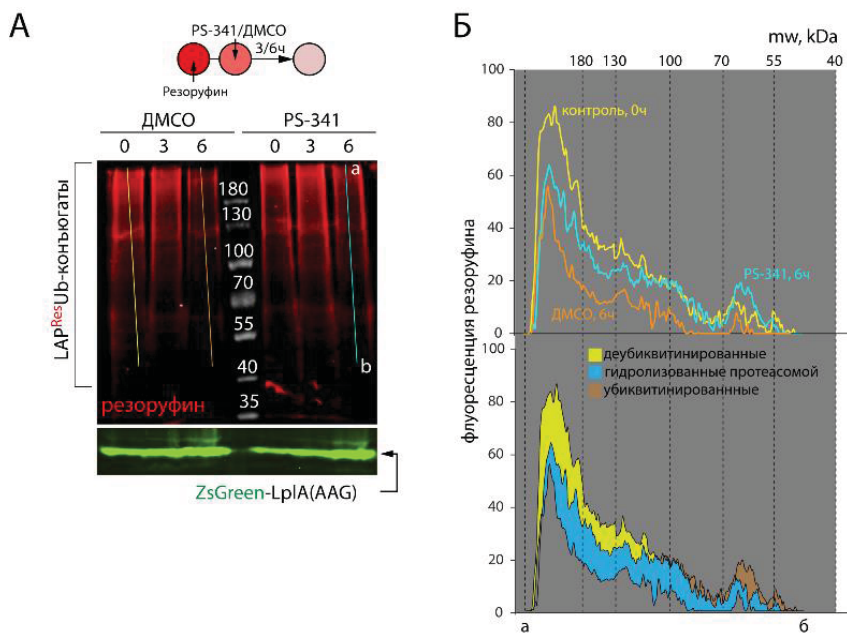
убиквитиновых конъюгатах уменьшается приблизительно в 2 два раза в течение 4 часов. Кроме того, немеченный Ub полностью заменяет меченный LAP_{Res}-Ub в полиубиквитинированных цепях через 10 часов. Интересно, что в присутствии ингибитора протеасомы количество тяжелых конъюгатов увеличивалось в первые 2 часа и далее постепенно уменьшалось до среднего уровня.

Рисунок 5. (А,Б) Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие LAP2-Ub, обрабатывали резорурфином 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.

1.3. 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. 6А**). Полученные данные свидетельствуют, что, во-первых, в случае ингибирования протеасомы происходит перераспределение убиквитиновых конъюгатов в сторону более легких. Во-вторых, большая часть «супер-убиквитинированных» белков не подвергалась гидролизу протеасомой (**Рис. 6Б**). Построение зависимости интенсивности флуоресценции резорурфина от массы убиквитиновых конъюгатов (**Рис. 6В**) вместе с наложением распределения молекулярных масс белков человеческого протеома показало, что динамическое равновесие между убиквитинированием и деубиквитинированием достигается в диапазоне 6-7 мономеров убиквитина на белковую молекулу, принимая во внимание, что средняя масса протеасомных субстратов составляет приблизительно 30 кДа. Эти результаты коррелируют с уже опубликованными данными. Ранее счита-

лось, что цепочка из 4 молекул убиквитина является минимально достаточной для узнавания протеасомой, наши же 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 полиубикитинированные белки, ковалентно связанные с более чем 20 мономерами убиквитина, не являются оптимальными субстратами для протеасомы, тогда как активность деубикитинирующих ферментов по отношению к этим конъюгатам увеличивается логарифмически в соответствии с их длиной.

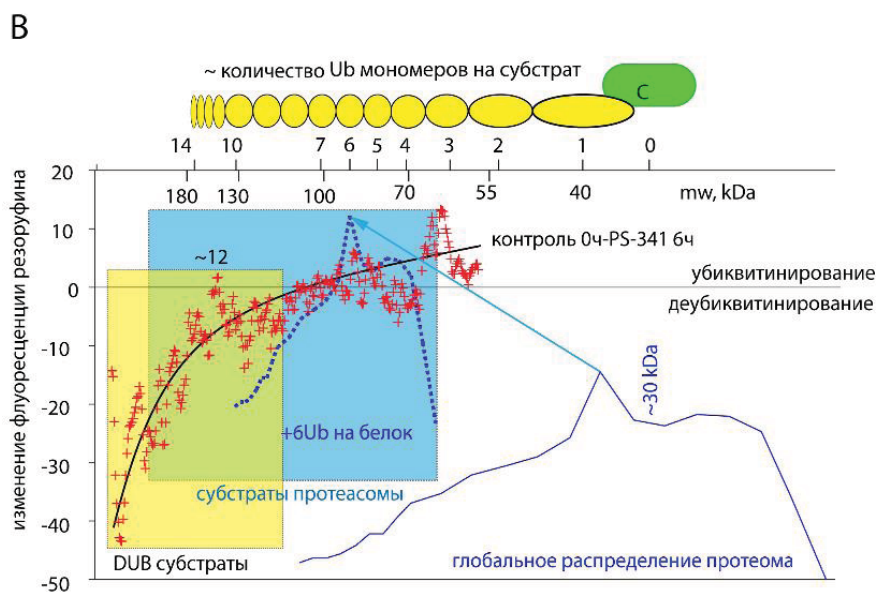


Рисунок 6. (А) Клетки, стабильно экспрессирующие LAP2-Ub, обрабатывали резорфуином и далее инкубировали в присутствии или в отсутствии ингибитора протеасомы PS-341, далее лизировали через

указанные временные промежутки и анализировали интенсивность флуоресценции в ПААГ. (Б) Зависимость интенсивности флуоресценции резорфуина в ПААГ на (А) от оценочной молекулярной массы Ub-конъюгатов. (В) График демонстрирует зависимость изменения флуоресценции резорфуина, соответствующей полиубикитиновым конъюгатам, от их молекулярной массы (аппроксимация красной линией). Синяя зона представляет собой ареал субстратной специфичности протеасомы, желтая зона соответствует полиубикитинированным субстратам, подвергающимся действию DUB. Количество молекул убикитина, присоединенных к субстрату, рассчитывалось исходя из наложения распределения человеческого протеома, при средней массе белка в 30 кДа.

1.4. Анализ стабильности полиубиквитиновых цепей различного типа ветвления.

На следующем этапе был проведен широкомасштабный анализ стабильности полиубиквитиновых цепей различного типа ветвления на уровне отдельных клеток. Для этого были созданы варианты убиквитина, содержащие по одному функциональному лизину, тогда как все остальные были заменены на аргинин. Таким образом, в нашем распоряжении было 10 вариантов убиквитина: Ub WT, UbK0 (все лизины заменены на аргинины) и варианты K0 с возвратными заменами UbK0 R6K/R11K/R27K/R29K/R33K/R48K/R63K. Клетки линии HEK293 были трансдуцированы всеми вариантами Ub, при этом путем разведения лентивирусов достигалась интеграция не более одной экспрессионной кассеты в геном клетки-хозяина. Трансдуцированные клетки обрабатывали резорфуфином и по прошествии двух часов сортировали с применением FACS. Было собрано восемь популяций клеток с различным соотношением синей и красной флуоресценции (**Рис. 7А**).

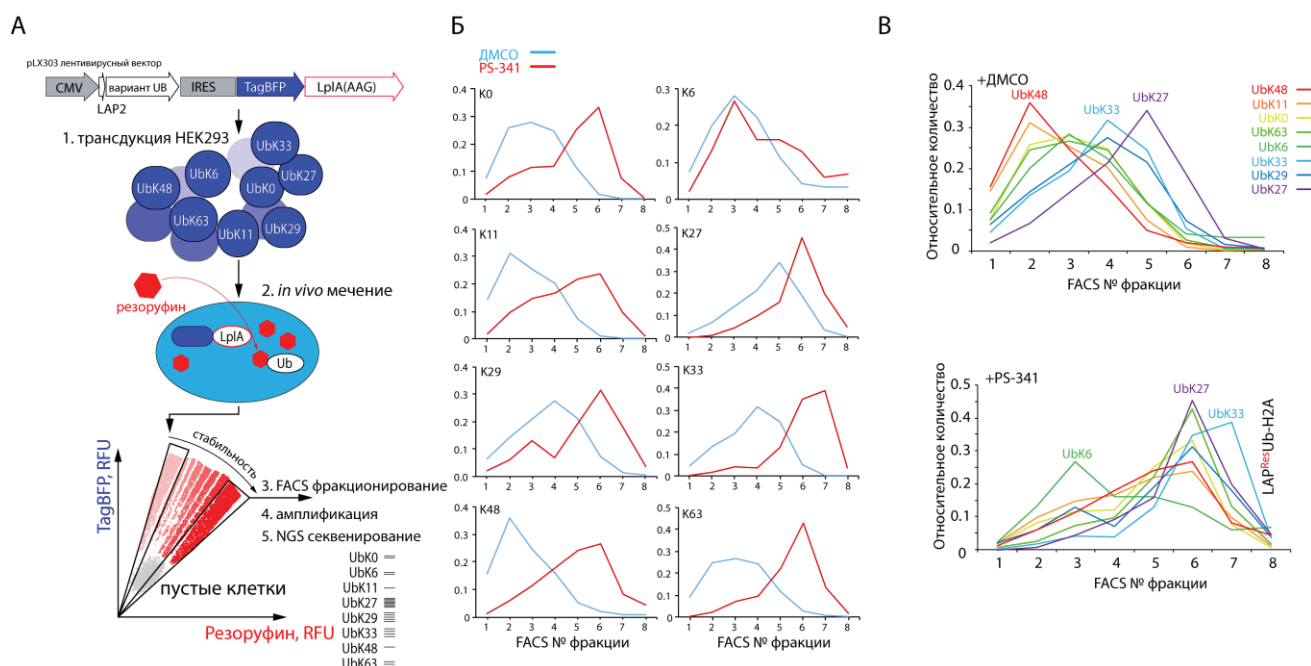


Рисунок 7. (А) Клетки, трансдуцированные библиотекой вариантов Ub с одним функциональным лизином, обрабатывали резорфуфином, далее фракционировали с помощью FACS после 2 часов инкубации в среде с или без PS-341. Клетки каждой из восьми фракций использовали в качестве исходного материала для ПЦР-амплификации геномной ДНК, кодирующей варианты Ub, с последующим высокопроизводительным секвенированием на платформе Illumina. Индивидуальное **(Б)** и наложение **(В)** распределения вариантов Ub в отобранных фракциях в присутствии и отсутствии PS-341, где 1 фракция – соответствует наименьшей стабильности, а 8 – наибольшей стабильности.

С применением ПЦР мы амплифицировали варианты Ub, содержащиеся в геноме отобранных клеток. Последующее высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina позволило выявить распределение каждого варианта Ub во всех со-

бранных фракциях (**Рис. 7Б и 7В**). Как и следует из имеющихся литературных данных, полиубиквитиновые цепи, ветвящиеся по лизинам К11 и К48, были наименее стабильны и в значительной степени стабилизировались в результате добавления PS-341. 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 неустойчивыми 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 различных вариантов полиубиквитиновых цепей, что подтверждает способность протеасомы распознавать неканонические полиубиквитиновые цепи.

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

2.1. Исследование необходимости убиквитинирования MBP в процессе его гидролиза протеасомой

Ранее в лаборатории биокатализа были получены данные, свидетельствующие, что один из основных аутоантигенов при рассеянном склерозе – основной белок миелина (MBP) – способен подвергаться гидролизу протеасомой без предварительного убиквитинирования. Чтобы подтвердить эти данные, был осуществлен гидролиз MBP протеасомой *in vitro* в максимально упрощенной системе: протеасома, очищенный белковый субстрат и АТФ (**Рис. 8А**). В отличие от других белков – BSA и лизоцима, которые были устойчивы к протеолизу, MBP подвергался гидролизу без участия каких-либо компонентов системы убиквитинирования. Кроме того, в клетки HEK293 были трансфицированы генетические конструкции, кодирующие MBP дикого типа – WT MBP и LL-MBP, в котором все остатки лизина заменены на аргинин, вследствие чего присоединение убиквитина к данному варианту MBP по боковой цепи физически невозможно. Клетки, трансфицированные данными конструкциями, обрабатывали циклогексимидом СНХ. Лизаты клеток анализировали с помощью иммуноблоттинга (**Рис. 8Б**), который показал, что WT MBP и LL-MBP гидролизуются с одинаковой скоростью, 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 мы использовали малые интерферирующие РНК (siRNA), которые блокируют экспрессию убиквитин-лигазы E1 (UBA1), фермента, активирующего убиквитин путем образования тиоэфирной связи, что является первой стадией процесса убиквитинирования.

Клетки HEK293 были трансфицированы siRNA к UBA1 или иррелевантной siRNA в качестве контроля. Через 48 часа эти же клетки были котрансфицированы конструкциями, кодирующими MBP и слитный белок Ub-GFP, являющийся убиквитин-зависимым субстратом протеасомы. Далее анализировали скорость внутриклеточного гидролиза белков с использованием CHX. Введение UBA1 siRNA, блокирующей синтез E1, привело к замедлению скорости гидролиза Ub-GFP, но никак не отразилась на скорости деградации MBP (Рис. 8В), что свидетельствует об отсутствии необходимости убиквитинирования MBP для его внутриклеточного гидролиза.

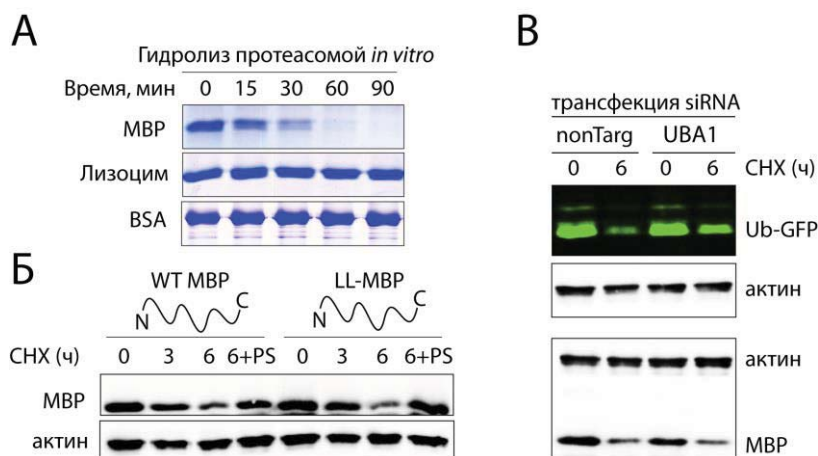


Рисунок 8. (А) MBP, BSA и лизоцим смешивали с очищенной протеасомой и инкубировали указанные промежутки времени, далее реакционные смеси анализировали с помощью электрофореза в ПААГ. (Б) Клетки HEK293 трансфицировали конструкциями, кодирующими MBP и вариант LL-MBP, через 24 обрабатывали CHX с последующим анализом с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-эпитопа. (В) Клетки HEK293, трансфицированные siRNA к лигазе E1, котрансфицировали конструкциями, кодирующими MBP и Ub-ZsGreen. Через 24 ч клетки обрабатывали CHX с последующим анализом с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-эпитопа и актина или интенсивности флуоресценции в ПААГ.

2.2. Роль заряда в убиквитин-независимом гидролизе MBP протеасомой

Ранее нами было сделано предположение, что причиной убиквитин-независимого гидролиза MBP является его высокий положительный заряд. 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. 9А и 9Б). Анализ *in vitro* гидролиза полученных вариантов MBP очищенной протеасомой, выделенной из головного мозга мышей, продемонстрировал, что скорость гидролиза напрямую коррелирует с величиной положительного заряда (Рис. 9В): вариант MBP [R] гидролизуетея протеа-

соемой быстрее чем [WT], в то время как скорость гидролиза вариантов [Q] значительно понижается по сравнению с МВР дикого типа.

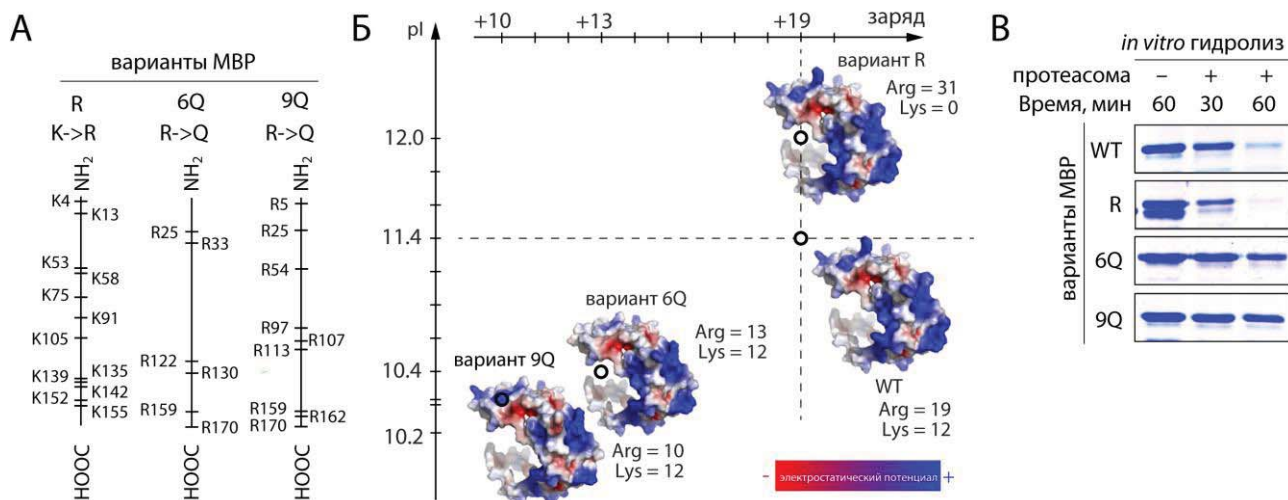


Рисунок 9. (А) Аминокислотные замены в полученных вариантах МВР по сравнению с белком дикого типа. (Б) Варианты МВР, расположенные в координатах тотального заряда белка и теоретической изоэлектрической точки. Структуры, созданные программным обеспечением PyMOL (предсказанная модель основного белка миелина человека, PDB ID 1QCL), демонстрируют поверхностный электростатический потенциал вариантов МВР. (В) Гидролиз рекомбинантного человеческого МВР дикого типа и его вариантов очищенной протеасомой *in vitro*.

2.3. Локализация протеасомного дегрона в составе последовательности МВР

Далее мы предположили наличие определенной последовательности в составе МВР, ответственной за гидролиз протеасомой. Чтобы ее обнаружить, мы разделили МВР на три фрагмента: 1-55 (МВР1), 56-110 (МВР2) и 111-170 (МВР3). Были созданы генетические конструкции, кодирующие делеционные варианты МВР: МВР1-2 (МВРΔ3), МВР2-3 (МВРΔ1) и МВР1-3 (МВРΔ2). 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. 10А). Полученные данные говорят о том, что фрагменты белка МВР1, МВР2 и МВР3 являются взаимозаменяемыми. Параллельно с этим были созданы генетические конструкции, кодирующие слитные белки МВР1-DHFR-Emb1, МВР2-DHFR-Emb1, МВР3-DHFR-Emb1 и Ub1-DHFR-Emb1, где DHFR – 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 протеасомы, входящих в состав 19S регуляторной субчастицы; Emb1 – неструктурированный фрагмент белка Emb1 длиной 60 аминокислот, который не является субстратом для протеасомы. Было обнаружено, что любой из фрагментов МВР способен направлять белок DHFR на гидролиз протеасомой (Рис. 10Б). Исходя из

полученных 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 – МВР reversed. Изучение внутриклеточного протеолиза данного белка продемонстрировало, что он подвергается гидролизу с такой же скоростью, что и МВР WT (**Рис. 10В**).

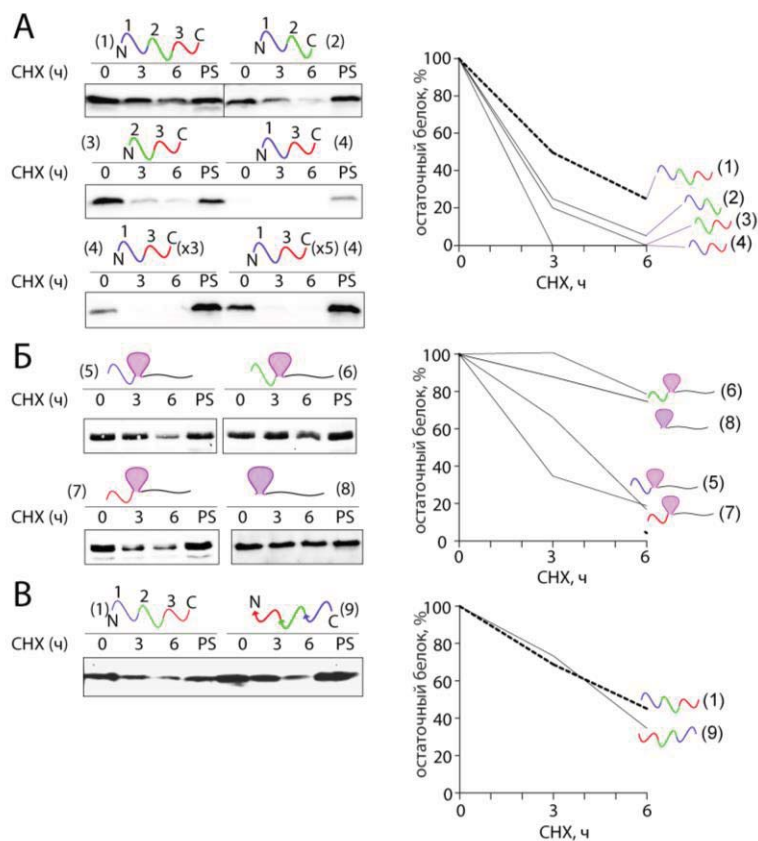


Рисунок 10. (А, Б) Клетки НЕК293 трансфицировали кДНК, кодирующей МВР и его делеционными вариантами, клетки обрабатывали СНХ и инкубировали указанное время, клеточные лизаты анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-эпитопа и актина. **(В)** Клетки НЕК293 трансфицировали кДНК, кодирующей МВР и его «зеркальным» вариантом. Лизаты анализировали аналогично **(А)**. Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка.

2.4. Создание искусственных убиквитин-независимых дегронов на основе последовательности МВР

На следующем этапе мы проанализировали аминокислотную последовательность МВР и выявили аминокислоты, встречающиеся в этом белке с большей частотой, чем в среднем по протеому. Такими аминокислотами оказались, главным образом, нейтральные глицин, серин и аланин, придающие подвижность полипептидной цепи, а также положительно заряженные аргинин и лизин (**Рис. 11А**). На основе этих аминокислот был разработан потенциальный убиквитин-независимый дегрон длиной 63 аминокислоты 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 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) (**рис. 11Б₍₁₎**).

Измерение времени полужизни субстратов показало, что варианты [KR] и [R] в отличие от [Q] обладают функциями дегрона, причем их способность инициировать гидролиз белков очевидно определяется наличием в его составе положительно заряженных аминокислот (**рис. 11Б₍₂₎**).

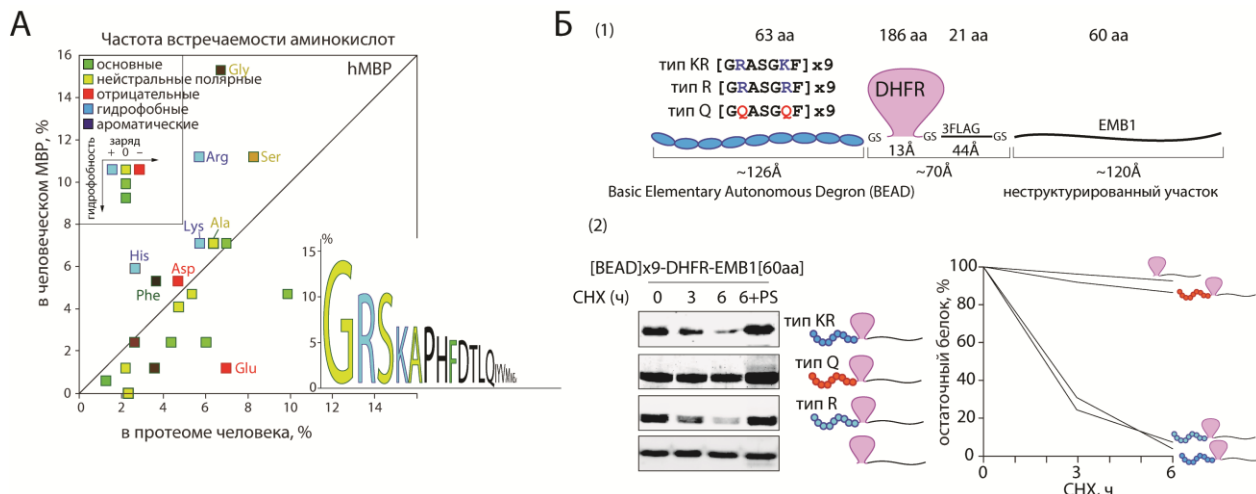


Рисунок 11. (А) Анализ частоты встречаемости аминокислот в последовательности МБР по сравнению с протеомом человека. (Б) (1) Дизайн модельных субстратов, содержащих созданные дегроны, слитные с DHFR и Emb1(1-60). (2) Клетки HEK293 трансфицировали кДНК, кодирующими слитные белки разработанных дегронов с DHFR и Emb1(1-60), через 24 часа клетки обрабатывали CHX, клеточные лизаты анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-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 отсутствие 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. 12А и 12Б**). Известно, что убиквитин-подобный 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. Таким образом, было установлено, что для эффективного гидролиза DHFR

требуется как участок связывания с протеасомой (UBL), так и протяженный структурно неупорядоченный фрагмент (Emb1). Уникальность миелин-подобного дегрона заключается в том, что он совмещает обе этих компоненты в одной компактной последовательности.

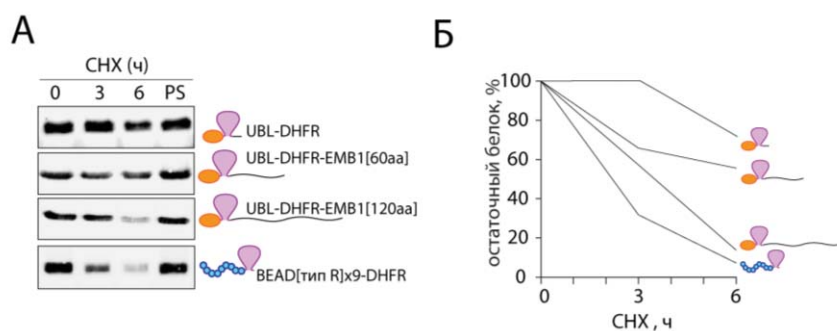


Рисунок 12 (А) Клетки HEK293 трансфицировали указанными конструкциями, через 24 часа клетки обрабатывали CHX в указанные временные промежутки, клеточные лизаты анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против FLAG-эпитопа.

(Б) Процент остаточного белка рассчитывали как отношение количества белка в указанные временные точки к изначальному количеству белка.

Таким образом, была осуществлена экспериментальная проверка выдвинутого ранее в отношении МВР предположения, что главным фактором 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 МВР 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 ему самостоятельно инициировать собственную транслокацию в протеолитическую камеру. Установленная оптимальная длина в 5 повторяющихся фрагментов соответствует 70 Å, что согласуется с ранее установленными допустимыми длинами инициаторных фрагментов. 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.

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, однако связывающая субъединица не была в явном виде определена. Чтобы гарантировать, что проведение 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 (Рис. 13А). Чтобы исключить возможность ингибирования или активации протеасомы, мы получили клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие Ub-зависимый субстрат – белок Ub-ZsGreen1. В первую очередь мы проверили необходимость АТФ для внутриклеточного гидролиза MBP. Чтобы выяснить это, мы уменьшили количество АТФ в клетках путем обработки клеток смесью 2-дезоксид-Д-глюкозы и 2,4-динитрофенола. В отличие от белка Ub-ZsGreen, скорость гидролиза MBP не менялась, более того, уменьшение количества АТФ в клетке приводило к значительному уменьшению тотального количества внутриклеточного MBP (Рис. 13Б) вследствие отсутствия конкуренции со стороны.

Наблюдаемая убиквитин- и АТФ-независимая деградация MBP свидетельствует об отсутствии активного участия 19S регулятора протеасомы в этом процессе. Что подтверждает тот факт, что подавление экспрессии субъединиц Rpn10, Rpn13 и Rpn2 не приводит к существенному замедлению гидролиза MBP.

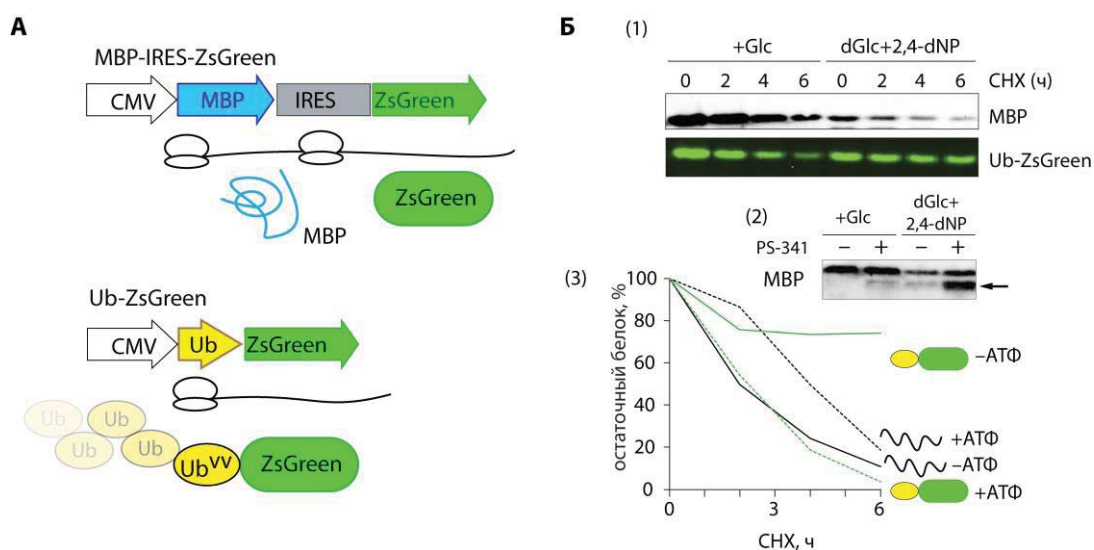


Рисунок 13. (А) Упрощенная схема лентивирусных конструкций MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen1. (Б) (1) Внутриклеточный гидролиз MBP и Ub-ZsGreen1 в клетках НЕК293 в нормальных условиях (Glc) и при удалении внутриклеточного АТФ [инкуба-

ция с 2-дезоксид-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.

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 отсутствие АТФ. Трансфекция siRNA к соответствующим субъединицам (**Рис. 14Б**) показала, что MBP накапливается в случае уменьшения экспрессии REG α и REG γ , но не REG β . В случае контрольного белка Ub-ZsGreen, его количество не изменялось при ингибировании синтеза REG субъединиц, тогда как уменьшение экспрессии базовой субъединицы Rpt1, входящей в состав АТФазного кольца, значительно увеличивало его внутриклеточную концентрацию. Важно отметить, что, аналогично MBP, количество BEADs-DHFR увеличивалось в клетках, трансфицированных siRNA к субъединицам REG α , тогда как белок p21, который подвергается гидролизу протеасомой, связанной с регулятором REG γ , накапливался только при уменьшении экспрессии REG γ (**Рис. 14Б**).

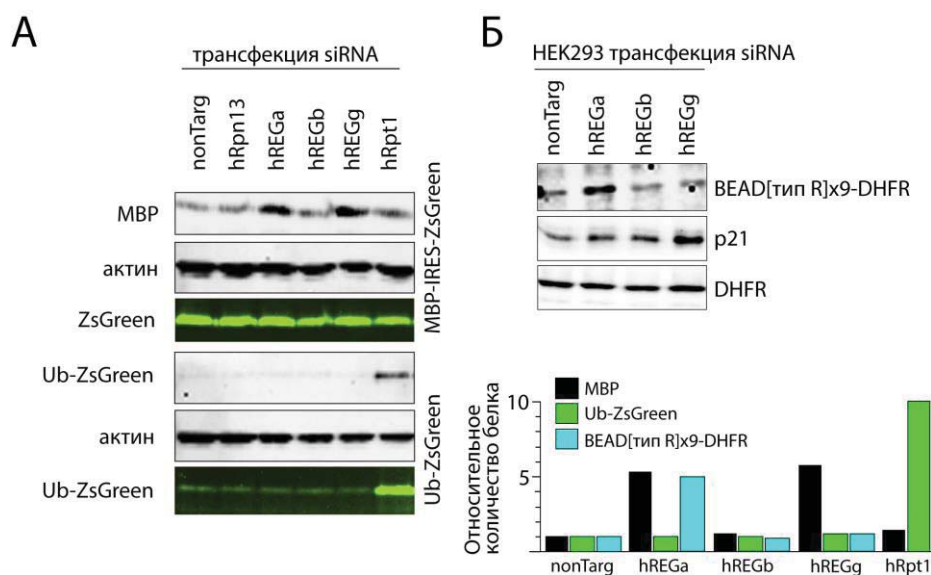


Рисунок 14 (А) Клетки HEK293, экспрессирующие MBP-IRES-ZsGreen и Ub-ZsGreen, трансфицировали siRNA к указанным субъединицам REG, а также субъединицам Rpt1 и Rpn13. Через 48 часов клетки обработали циклогексимидом и инкубировали в течение указанных промежутков времени. Клеточные лизаты анализировали на предмет флуоресценции в ПААГ, а также иммуноблоттингом с использованием антител против FLAG-эпитопа.; **(Б)** 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 **(А)**. Относительное количество белка рассчитывали как отношение количества белка в клетках, трансфицированных соответствующими siRNA, к количеству белка в клетках, трансфицированных контрольными siRNA (nonTarg).

2.6. Анализ изменения состава регуляторных комплексов протеасомы в условиях протекания нейродегенеративных процессов

Ранее было показано, что протеасомный гидролиз МВР играет значительную роль в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ) – животной модели рассеянного склероза. В этой связи было решено провести широкоформатный транскриптомный анализ глиальной культуры, который помог бы выявить изменение экспрессии протеасом-ассоциированных генов в условиях воспаления, моделируемое добавлением γ INF. Нами была получена первичная культура клеток мозга мыши, обогащенная астроцитами. Было проанализировано изменение количества мРНК, кодирующей белки, связанные с протеасомой, в полученной первичной культуре клеток головного мозга (рис. 15А). В клетках, обработанных γ INF, были обнаружены значительные изменения в экспрессии генов, кодирующих каталитические субъединицы

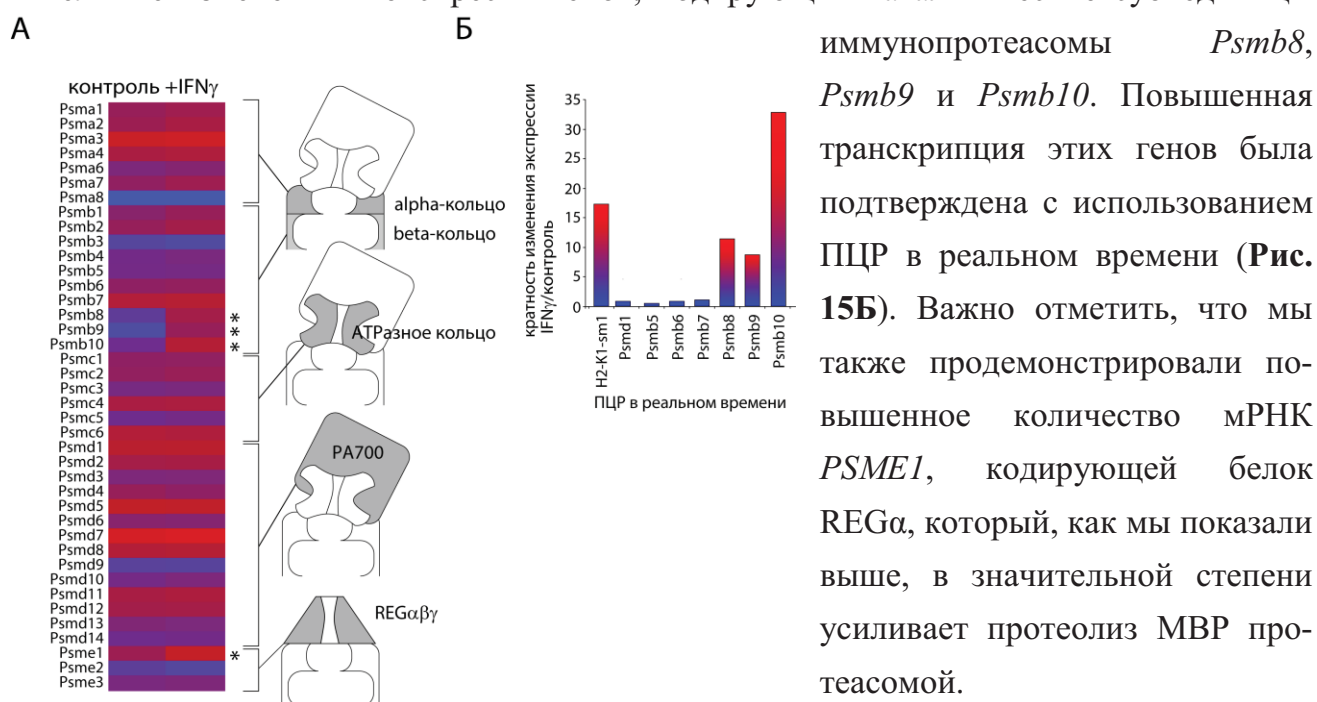


Рисунок 15. (А) Профиль экспрессии дифференциально экспрессированных генов, кодирующих белки протеасомы в первичной культуре головного мозга без воздействия (контроль) и при обработке γ INF; (Б) Анализ уровня транскрипции генов иммунопротеасомы с использованием ПЦР в реальном времени.

3. Подходы к избирательному контролю процессинга основного белка миелина протеасомой

3.1. Апробация β 1i-специфического пептидилальдегида IPSI-001 в качестве ингибитора иммунопротеасомы

Установление механизма убиквитин-независимого гидролиза МВР протеасомой позволило сформулировать ряд подходов, позволяющих направленно ингибировать данный процесс, в том числе *in vivo*. Принципиально существуют две возможности, а

именно: (1) ингибировать непосредственно протеасому (2) влиять на посттрансляционные модификации МВР с целью нивелировать его положительный заряд.

Мы протестировали ингибитор нового поколения – $\beta 1i$ -специфический пептидилальдегид IPSI-001 (Z-LNnL-CHO). В качестве вещества сравнения использовали пептидилальдегид MG-132, который структурно схож с IPSI-001 (Рис. 16А). В качестве источника конститутивной протеасомы были использованы клетки линии HEK293. Клетки EL4, предварительно обработанные γ INF, были использованы в качестве источника иммунопротеасомы (Рис. 16Б). Из полученных данных можно сделать предположение, что при концентрации меньше 1 мкМ ингибитор IPSI-001 способен связываться только с субъединицей $\beta 1i$, а при концентрациях более 1 мкМ он также может воздействовать и на другие каталитические субъединицы (Рис. 16В).

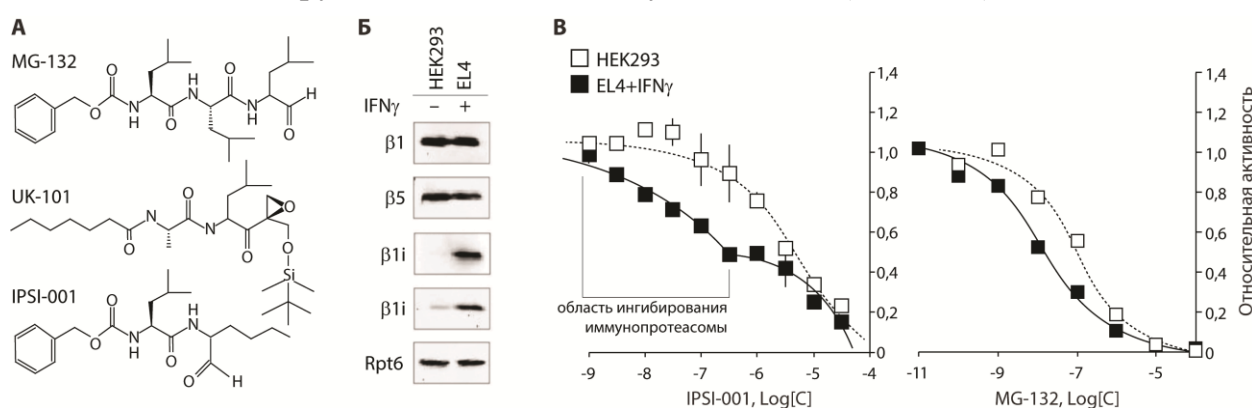


Рисунок 16. (А) Химические структуры ингибиторов; (Б) содержание каталитических субъединиц конститутивной протеасомы ($\beta 1/\beta 5$) и иммунопротеасомы ($\beta 1i/\beta 5i$) в клетках линии HEK293 и EL4, обработанных γ INF; (В) активность протеасомы в различных типах клеток, определенная с помощью гидролиза модельного субстрата Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC в зависимости от концентрации ингибиторов IPSI-001 и MG-132.

3.2. Влияние деиминирования МВР пептидиларгининдеиминазой (PAD) на его гидролиз протеасомой.

В рамках второго подхода к ингибированию убиквитин-независимого гидролиза МВР протеасомой мы решили исследовать влияние деиминирования МВР пептидиларгининдеиминазой (PAD) на его протеасомальное разрушение. Мы изучили действие одного из тетразольных аналогов 2-хлорамидина на деиминирование и гидролиз МВР протеасомой МВР *in vitro*. Комплекс протеасомы с МВР иммунопреципитировали антителами к субъединице протеасомы Rpn10 (Рис. 17А). В преципитатах из смеси МВР, не подвергавшегося деиминированию, с протеасомой было обнаружено значительное количество МВР, что говорит о связывании МВР с протеасомой. Если МВР был предварительно инкубирован с PAD в присутствии 10 мкМ ингибитора, количество МВР в преципитате было значительно меньше. Если же использовался МВР с максимальной степенью деиминирования (инкубированного с PAD в отсутствии ингибитора) МВР в преципитате отсутствовал. Из полученных данных следует, что деиминирование МВР

может непосредственно влиять на его связывание с протеасомой. Кроме того, было изучено влияние деиминированного MBP на его способность подвергаться гидролизу протеасомой в отсутствие убиквитина. Деиминирование значительно замедляет скорость гидролиза MBP протеасомой, однако при добавлении к реакционной смеси ингибитора PAD скорость гидролиза MBP протеасомой возвращалась к исходному уровню (Рис. 17Б и 17В). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что деиминирование MBP под действием PAD препятствует взаимодействию MBP с протеасомой, а также замедляет гидролиз MBP *in vitro*.

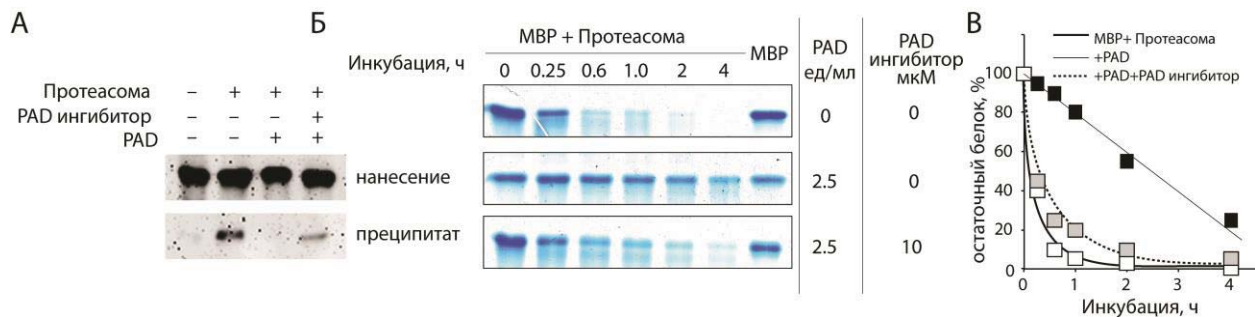


Рисунок 17. (А) MBP, обработанный PAD или смесью PAD и ингибитора (10 мкМ), был инкубирован с очищенной протеасомой в присутствии 1 мкМ ингибитора протеасомы PS-341. Затем комплекс MBP – протеасома был осажден антителами к субъединице протеасомы Rpn10 на протеинА-сефарозе. Реакционные смеси анализировали с помощью иммуноблоттинга. (Б) Протеолиз MBP препаратом очищенной протеасомы проводили в присутствии или в отсутствии PAD и ингибитора PAD, анализировали с помощью электрофореза в ПААГ. (В) Зависимость количества MBP (в % от исходного) от времени и состава реакционной смеси.

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. 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 конъюгатов с протеасомой выявило, что на молекулу субстрата в среднем приходится 6 молекул убиквитина, и 1-2 из этих убиквитинов утилизируются вместе с субстратом (Рис. 18). Кроме того, с помощью функциональных вариантов убиквитина была оценена субстратная специфичность протеасомы к убиквитиновым цепям разного типа ветвления.

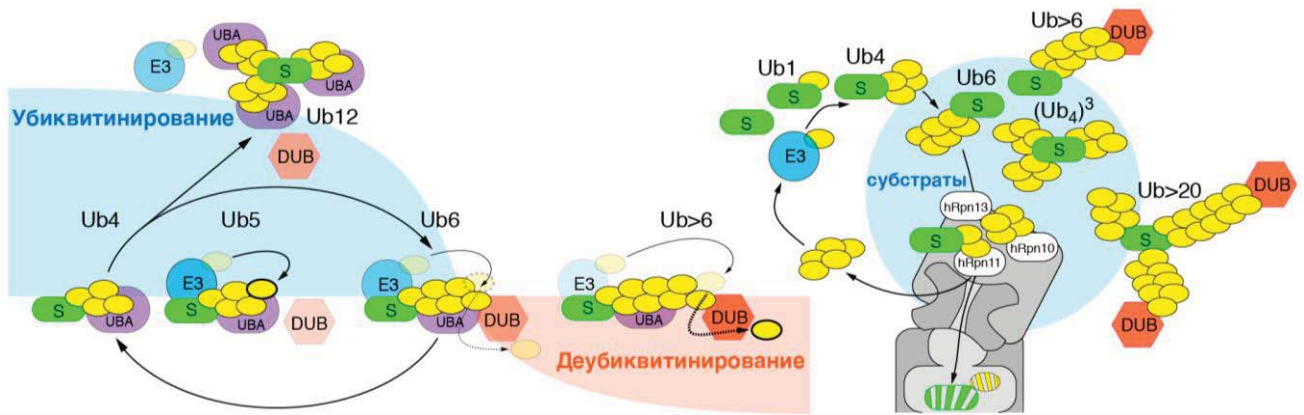


Рисунок 18. Динамическое равновесие как основа функционирования убиквитин-протеасомной системы.

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

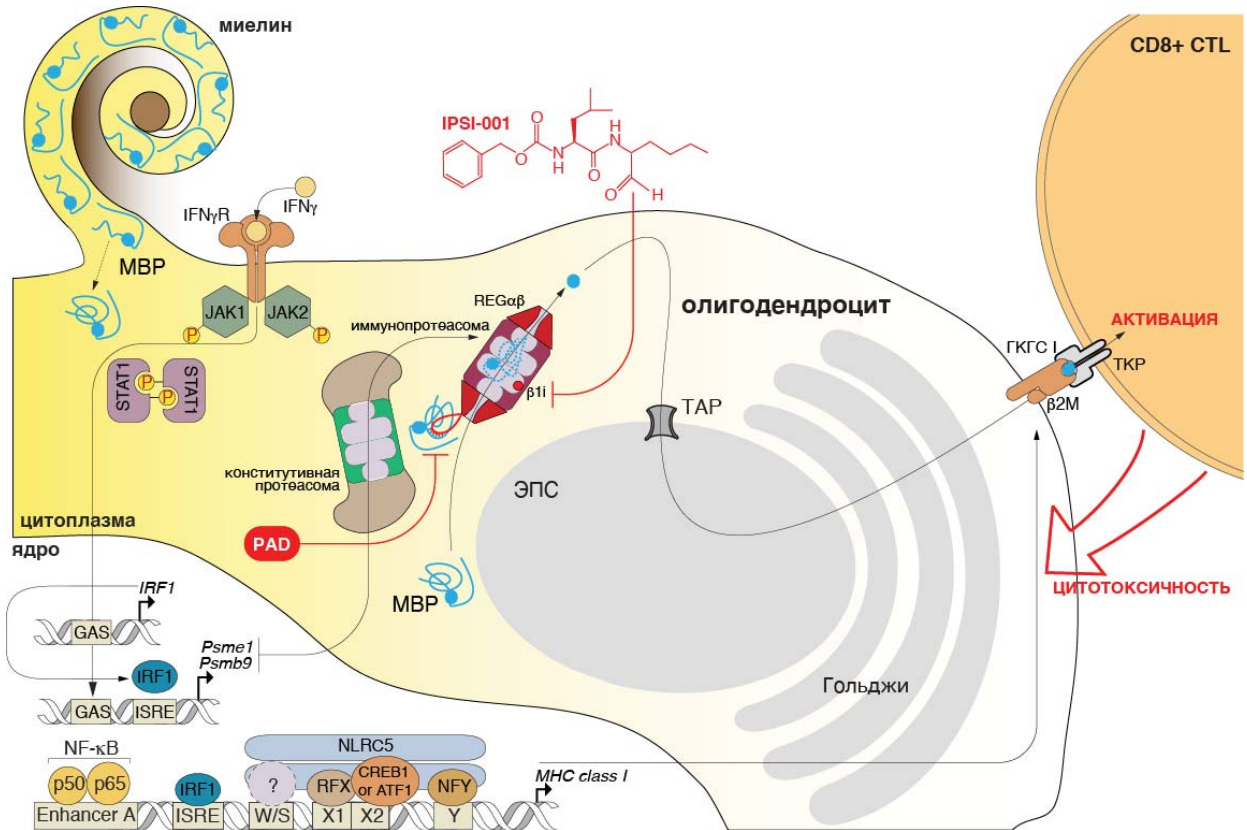


Рисунок 19. Молекулярный механизм гидролиза MBP протеасомой и его физиологическая значимость.

Важным наблюдением является повышение уровня REG α в первичной культуре клеток головного мозга, обработанных γ INF. Таким образом, ранее полученные данные, свидетельствующие об ускоренном протеолизе МВР иммунопротеасомой, могут быть объяснены повышенным содержанием в клетках REG α -протеасом. Также был апробирован ряд подходов к направленному замедлению протеасом-опосредованного метаболизма МВР, направленных как на протеасому, так и на сам субстрат. Специфический ингибитор иммуносубъединицы протеасомы β 1i селективно воздействовал на протеасому *in vivo*, проявляя при этом довольно низкую токсичность. Деиминирование МВР под действием PAD препятствует взаимодействию МВР с протеасомой, а также замедляет гидролиз протеасомой МВР (Рис. 19).

ВЫВОДЫ.

1. Проведена оптимизация методики внутриклеточного ферментативного мечения полипептидных субстратов резорубином (PProbe Incorporation Mediated by Enzymes – PRIME) для анализа их внутриклеточной деградациии 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 (МВР) протеасомой обусловлен его аномально высоким положительным зарядом, опосредующим ассоциацию МВР 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.

3. Путем широкомасштабного транскриптомного профилирования был зафиксирован повышенный уровень экспрессии субъединицы протеасомы REG α в первичной культуре глиии при воздействии воспалительного стимула. Показано, что данные регуляторные комплексы в форме ассоциированного с протеасомой гептамера в значительной степени ускоряют протеолиз МВР.

4. Разработаны подходы к направленному замедлению внутриклеточного протеасом-опосредованного метаболизма МВР. Показано, что специфический ингибитор иммуносубъединицы β 1i 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи в научных журналах:

- 1) Belogurov A. Jr, Kudriaeva A., Kuzina E., Smirnov I., Bobik T., Ponomarenko N., Kravtsova-Ivantsiv Y., Ciechanover A., and Gabibov A. / Multiple sclerosis autoantigen myelin basic protein escapes control by ubiquitination during proteasomal degradation. // *Journal of Biological Chemistry*. — 2014. — Vol. 289, no. 25. — P. 17758–17766.
- 2) Е.С. Кузина, А.А. Кудряева, Д.В. Мальцева, А.А. Белогуров / Пептидилальдегид, специфически взаимодействующий с иммуносубъединицей протеасомы $\beta 1i$: эффекты *in vitro* и *in vivo*. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2016. — Т. 161, № 1. — С. 69-71.
- 3) Кудряева А.А., Хаустова Н.А., Мальцева Д.В., Кузина Е.С., Глаголева И.С., Сурина Е.А., Кнорре В.Д., Белогуров А.А., Тоневицкий А.Г., Габибов А.Г. / Экспрессионный профиль мРНК олигодендроцитов мыши в условиях воспаления. // *Доклады Академии наук, серия Биохимия и биофизика*. — 2016. — Т. 469, № 1. — С. 264–268.
- 4) Кузина Е.С., Кудряева А.А., Глаголева И., Габибов А.Г. и Белогуров А.А. / Деиминирование основного белка миелина замедляет его протеасомо-опосредованный метаболизм. // *Доклады Академии наук, серия Биохимия и биофизика*. — 2016. — Т. 469, № 1. — С. 277–280.
- 5) Kudriaeva A.; Galatenko V.; Maltseva D.; Khaustova N.; Kuzina E.; Tonevitsky A.; Gabibov A.; Belogurov A. Jr. / The Transcriptome of Type I Murine Astrocytes under Interferon-Gamma Exposure and Remyelination Stimulus // *Molecules*. — 2017. — Vol. 22, no. 5. — P. 808-809.

Материалы научных конференций, конгрессов симпозиумов.

- 1) Kudriaeva A., Kuzina E., Gabibov A., Belogurov A. Basic charge rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal degradation of the myelin basic protein. The 38th FEBS Congress, St.Peterburg, Russia, 2013
- 2) Кудряева А.А., Кузина Е.С., Белогуров А.А., Габибов А.Г. Заряд как действующая сила убиквитин-независимого гидролиза основного белка миелина. XXVI Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, Россия, 2014
- 3) Кудряева А.А., Кузина Е.С., Белогуров А.А., Габибов А.Г. hRpn10 как сенсор внутриклеточной концентрации основного белка миелина. Конференция «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга», Санкт-Петербург–Колтуши, Россия, 2014
- 4) Кудряева А.А., Кузина Е.С., Белогуров А.А., Габибов А.Г. Заряд-опосредованный гидролиз основного белка миелина полноразмерной 26S протеасомой в отсутствие полиубиквитиляции. VII Всероссийская конференция "Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция", Петрозаводск, Россия, 2014
- 5) Kudriaeva A., Kuzina E., Gabibov A., Belogurov A. Myelin basic protein binds the Von Willebrand domain of ubiquitin receptor Rpn10 to enable ubiquitin-independent proteasomal degradation. The 40th FEBS Congress, Berlin, Germany, 2015
- 6) Кудряева А.А., Кузина Е.С., Белогуров А.А. Убиквитин-независимое распознавание основного белка миелина 26S протеасомой обусловлено композицией составляющих его аминокислот и не зависит от их линейной последовательности. XXVIII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, Россия, 2016
- 7) Кудряева А.А., Белогуров А.А., Габибов А.Г. Аминокислотный состав основного белка миелина обуславливает его убиквитин-независимый гидролиз протеасомой. V съезд биохимиков России, Дагомыс - Сочи, Россия, 2016
- 8) Кудряева А.А., Белогуров А.А., Габибов А.Г. Механизм гидролиза основного белка миелина на протеасомой. XXIX Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, Россия, 2017
- 9) Кудряева А.А., Белогуров А.А. Изучение внутриклеточного метаболизма убиквитиновых цепей разного типа ветвления. II Всероссийская конференция "Высокопроизводительное секвенирование в геномике", Новосибирск, Россия, 2017
- 10) Kudriaeva A., Belogurov A. Proteasome-mediated hydrolysis of myelin basic protein: charge instead of ubiquitination. The 42th FEBS Congress, Jerusalem, Israel, 2017

Работа была выполнена в рамках проекта РФФ №14-14-00585.