



## МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АФФИННО-ОЧИЩЕННЫХ ПРОТЕАСОМ ИЗ КЛЕТОК МИЕЛОГЕННОЙ ЛЕЙКЕМИИ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ K562

© 2014 г. Т. О. Аргамонова\*, М. А. Ходорковский\*, А. С. Цимоха\*\*.#

\*ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский Государственный Политехнический Университет

\*\*ФГБУН Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

Поступила в редакцию 19.05.2014 г. Принята к печати 11.06.2014 г.

Протеасомы осуществляют регулируемый протеолиз большинства белков в клетке и тем самым играют ключевую роль в регуляции различных клеточных процессов. Одним из важных этапов в понимании функций протеасом в клетке и механизмов их регуляции является определение субъединичного состава и посттрансляционных модификаций протеасом. Для решения этой задачи на примере клеток миелогенной лейкемии человека использована стратегия аффинной очистки протеасом с последующим масс-спектрометрическим анализом. Протеасомы очищали из стабильной клеточной линии K562, экспрессирующей субъединицу  $\beta 7$  (PSMB4) 20S протеасомы, меченную по C-концу НТВН-пептидом, включающим два фрагмента His<sub>6</sub>, специфический сайт расщепления Tobacco Etch Virus (TEV)-протеазой и сигнальную последовательность для биотинилирования *in vivo*, методом нековалентного связывания — через образование комплекса биотина со стрептавидином с последующей элюцией посредством TEV-протеазы. С помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии идентифицированы все субъединицы 26S протеасомы, а также регуляторы PA200 и PA28 $\gamma$ . Показано, что с протеасомами ассоциированы белки теплового шока, компоненты убиквитин-протеасомной системы и некоторые белки цитоскелета. Выявлен ряд новых сайтов фосфорилирования, убиквитинилирования и N-концевые модификации у 16 субъединиц протеасом. Представленный масс-спектрометрический анализ будет крайне полезен для дальнейших протеомных исследований протеасом при клеточном стрессе.

*Ключевые слова:* аффинная очистка, масс-спектрометрия, протеасома, клетки миелогенной лейкемии человека, убиквитин-протеасомная система, убиквитинилирование, фосфорилирование.

DOI: 10.7868/S0132342314060049

### ВВЕДЕНИЕ

В клетках эукариот, большая часть внутриклеточных белков расщепляется по убиквитин-протеасомному пути [1]. Белок помечается полиубиквитиновой цепочкой при участии целого каскада убиквитинилирующих ферментов и расщепляется затем 26S протеасомой до пептидов и отдельных мономеров убиквитина.

26S протеасома — это мультисубъединичный белковый комплекс массой примерно 2.5 МДа, который состоит из протеолитического ядра — 20S протеасомы и одного или двух регуляторов 19S. 20S протеасома представляет собой полый цилиндр, состоящий из четырех сложенных в стопку гептамерных колец: два внешних кольца

образованы субъединицами  $\alpha$ -типа, два внутренних кольца — субъединицами  $\beta$ -типа [2]. У 20S протеасом клеток эукариот субъединицы  $\alpha$ -типа отвечают за сборку 20S комплекса и формируют “ворота”, через которые помеченный к деградации белок доставляется в протеолитическую камеру, а также обеспечивают взаимодействие 20S протеасомы с регуляторными комплексами и с другими белками, которые, согласно литературным данным, взаимодействуют с протеасомами в случае убиквитиннезависимого протеолиза [3, 4]. Предполагается также существование у субъединиц  $\alpha$ -типа специфической эндорибонуклеазной активности [5]. Субъединицы  $\beta$ -типа образуют центральные кольца и протеолитическую полость 20S протеасомы, где осуществляется протеолиз белка. Три из семи субъединиц  $\beta$ -типа,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$ , протеолитически активны по типу каспазы, трипсина и химотрипсина, соответственно. Воздействие  $\gamma$ -интерферона стимулирует экспрессию трех дополнительных каталитических  $\beta$ -субъединиц ( $\beta 1i/LMP2$ ,  $\beta 2i/MECL1$  и  $\beta 5i/LMP7$ ),

Сокращения: AMC — 7-амино-4-метилкумарин; MALDI-ICR — масс-спектрометрия ионно-циклотронного резонанса с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией, TEV — Tobacco Etch Virus.

# Автор для связи (тел.: +7 (812) 297-37-40, факс: +7(812) 297-0341; эл. почта: atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru).

называемых иммунными, которые замещают соответствующие конститутивные  $\beta$ -субъединицы, что в свою очередь приводит к изменению продуктов расщепления белкового субстрата — образованию иммуногенных пептидов, выставляемых на молекулах главного комплекса гистосовместимости класса I [6]. У позвоночных обнаружена дополнительная каталитически активная субъединица, названная  $\beta 5t$ , которая экспрессируется в кортикальных эпителиальных клетках тимуса и играет роль в селекции Т-киллеров [7].

Регуляторный комплекс протеасом 19S служит для узнавания полиубиквитинированных белков и подготовки их к деградации в 20S протеасоме [8]. Комплекс 19S имеет молекулярную массу около 1 МДа и состоит из шести АТФ-азных (Rpt1–6) и из одиннадцати неАТФ-азных (Rpn1–3, Rpn5–12) субъединиц. С развитием новых подходов к очистке и идентификации белков обнаружили новые белки протеасомного регулятора 19S, но пока неясно, какую функцию они несут [9, 10].

20S протеасомы помимо регуляторной частицы 19S могут связывать и другие регуляторные комплексы: PA28 и PA200. Регуляторный комплекс PA28 $\alpha/\beta$  с молекулярной массой около 200 кДа имеет структуру гетерогептамерного кольца и состоит из гомологичных субъединиц PA28 $\alpha$  и PA28 $\beta$ , которые индуцируются под действием  $\gamma$ -интерферона [11]. Моногептамерный комплекс PA28 $\gamma$  предположительно участвует в процессе деления клетки и в онкогенезе [12]. Регулятор PA200 состоит из одного белка с молекулярной массой 200 кДа и в комплексе с 20S протеасомой участвует в репарации ДНК [13]. Важно отметить, что 20S протеасома, имея один регулятор 19S, может связывать дополнительно PA28- или PA200-регулятор, формируя гибридную протеасому 19S-20S-PA28 или 19S-20S-PA200 [11, 14].

За счет деградации специфических регуляторных белков убиквитин-протеасомная система играет центральную роль в регуляции таких основных клеточных процессов, как клеточная дифференцировка, транскрипция, репарация ДНК, прохождение клеточного цикла, пролиферация, иммунный и воспалительный ответы, апоптоз [2, 5]. Нарушения в убиквитин-протеасомной системе часто коррелируют с возникновением патологических событий, таких как опухолеобразование, метастазирование, воспалительные процессы, нейродегенеративные заболевания [15], вследствие чего компоненты системы рассматриваются как фармацевтические мишени. Так, например, ингибитор протеасом Velcade (бортезомиб или PS341) сегодня успешно используется в лечении онкологических больных [16]. Показано, что Velcade и подобные ему ингибиторы протеасом вызывают апоптоз в быстро пролиферирующих клетках, в то время как нормальные клетки не-

чувствительны или менее чувствительны к их действию [17]. Оказалось, однако, что регуляция апоптоза протеасомами более тонкая и комплексная и определяется, по-видимому, широким спектром клеточных процессов, протекающих с их участием.

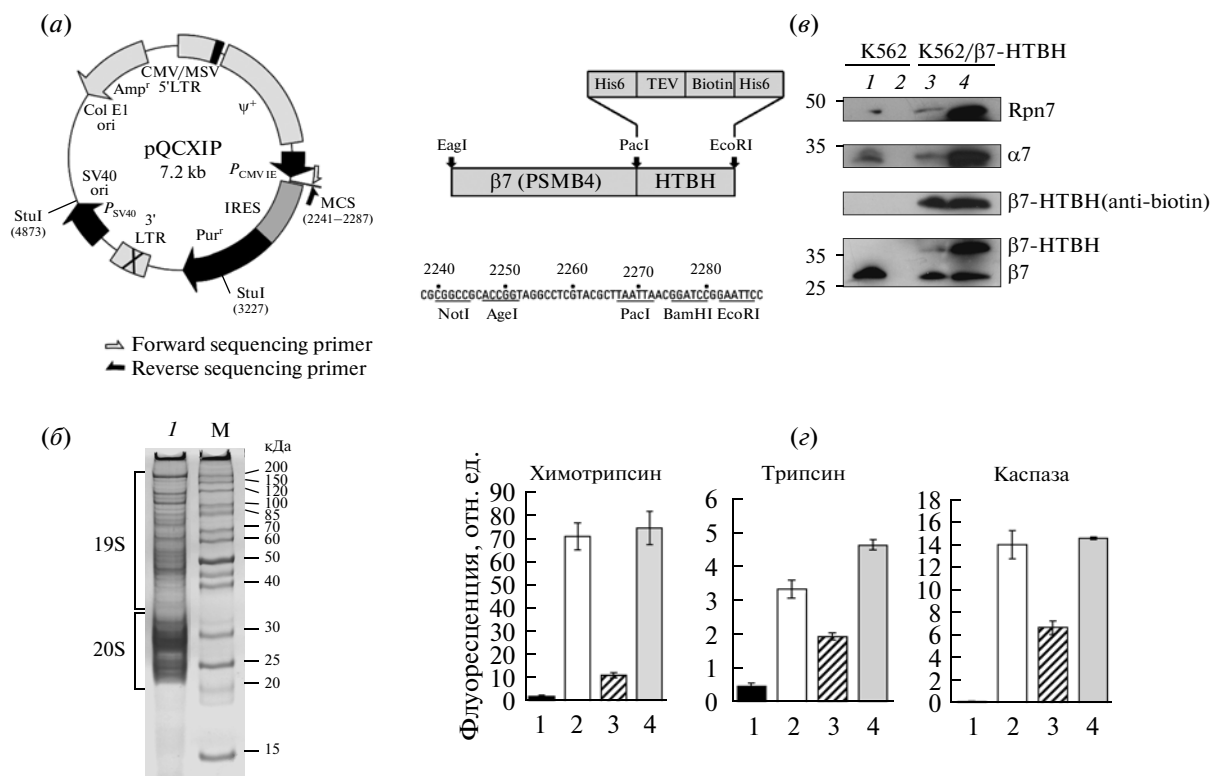
Основными способами регуляции активностей протеасом, как известно, являются модуляция их состава в клетке и посттрансляционные модификации протеасомных белков [15]. Поэтому для понимания функций протеасом в клеточных процессах и способах их регуляции важно исследовать состав протеасом и посттрансляционные модификации протеасомных субъединиц. Несмотря на существование немалого количества протеомных исследований протеасом, стоит отметить, что, во-первых, большинство из них были сосредоточены на 20S протеасомах [18–20] и, во-вторых, многие из этих исследований были выполнены на протеасомах из дрожжей.

Ранее показано, что экспрессия в клетках человека линии НЕК293 субъединицы 19S регулятора протеасом Rpn11 (PSMD14), слитой по С-концу с пептидом НТВН, включающим два фрагмента His<sub>6</sub>, специфический сайт расщепления TEV-протеазой и сигнальную последовательность для биотинилирования *in vivo*, позволяет быстро выделять протеасомы высокой степени очистки [21]. Мы полагаем, что выбор авторами этой субъединицы для мечения с целью аффинной очистки комплекса и последующего протеомного анализа не является оптимальным в силу ограничения в наборе субпопуляций протеасом: очищены будут лишь те субпопуляции протеасом, в составе которых присутствует комплекс 19S, исключая свободные 20S протеасомы и 20S протеасомы в комплексе с другими регуляторами (PA28, PA200). Кроме того, популяция очищенных протеасом будет содержать свободные комплексы 19S, которые, как известно, участвуют в регуляции транскрипции независимо от протеолитической функции протеасом [5].

В настоящей работе мы выбрали для мечения субъединицу  $\beta 7$  (PSMB4) 20S протеасомы с целью аффинной очистки всех протеолитически активных субпопуляций протеасом из клеток миелогенной лейкемии человека линии К562. Для протеомного анализа аффинно-очищенных протеасом использовали MALDI-ICR-масс-спектрометрию (масс-спектрометрию ионно-циклотронного резонанса с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для очистки протеасом из клеток человека линии К562,  $\beta 7$ -субъединица 20S протеасомного комплекса была помечена по С-концу пептидом



**Рис. 1.** Аффинная очистка протеасом из клеток K562, стабильно экспрессирующих меченый белок  $\beta 7$ -HTBН (K562/ $\beta 7$ -HTBН). (а) Схематическое представление слитой конструкции  $\beta 7$ -HTBН [21], содержащей последовательности His<sub>6</sub> (H), сайт для расщепления TEV-протеазой (T) сигнальную последовательность для биотинилирования *in vivo* (B). (б) Иммунохимическое выявление протеасомных антигенов в комплексе со стрептавидин-биотином после инкубации стрептавидинового носителя с клетками K562, контрольными и K562/ $\beta 7$ -HTBН. Денатурирующий электрофорез в 13% ПААГ 50 мкг клеточного экстракта из клеток K562 – контрольных (1) и K562/ $\beta 7$ -HTBН (3), и белков в комплексе со стрептавидин-биотином после инкубации стрептавидинового носителя с клетками K562 – контрольными (2) и K562/ $\beta 7$ -HTBН (4). (в) Электрофоретическое разделение белков протеасом, аффинно-очищенных из клеток K562/ $\beta 7$ -HTBН. Денатурирующий электрофорез в 13% ПААГ 10 мкг очищенных протеасом (1). Окраска геля Кумасси G-250, M – маркеры мол. масс (МВІ Fermentas, Литва). (г) Пептидазные активности протеасом, аффинно-очищенных из клеток K562 – контрольных (1) и K562/ $\beta 7$ -HTBН (2, 3), и протеасом, очищенных из клеток НЕК293 Rpn11-HTBН (4) [21]. Для контроля за специфичностью протеасомной активности в реакцию добавлен ингибитор протеасомной активности MG132 (3). Средние значения и стандартные отклонения трех независимых определений флуоресценции освобожденного АМС (100 ед. флуоресценции соответствует освобождению 50 пмоль продукта; концентрация протеасом в пробах составляет 1 мкг.

HTBН (рис. 1а). Ранее показано [21], что экспрессия в клетках НЕК293 протеасомного белка Rpn11 (PSMD14), удлиненного по С-концу таким пептидом, позволяет быстро выделять функционально активные протеасомы с высокой степенью очистки. Эта сложная метка включает два фрагмента His<sub>6</sub>, специфический сайт расщепления TEV-протеазой и сигнальную последовательность для биотинилирования *in vivo* (рис. 1а). Пептид HTBН, включенный в состав белка, позволяет осуществлять его трехступенчатую очистку: связывание с Ni<sup>2+</sup>-NTA-колонкой за счет гистидиновых последовательностей (шаг 1), элюирование с нее и связывание со стрептавидиновым носителем за счет биотинилированного фрагмента пептида (шаг 2), элюирование с носителя путем отщепления с помощью TEV-протеазы (шаг 3). Данная стратегия очистки была разработана на

клетках дрожжей [22], которые содержат большое количество биотинилированных эндогенных белков. В клетках млекопитающих, в отличие от клеток дрожжей, биотинилированные эндогенные белки встречаются редко, поэтому первый шаг очистки можно исключить.

Субъединица  $\beta 7$  была выбрана по ряду причин. Чтобы гарантировать очистку всех протеолитически активных форм протеасом в комплексе с различными регуляторами, нам необходимо было выбрать субъединицу 20S комплекса. Мы не могли рассматривать на эту роль ни один белок 20S протеасомы  $\alpha$ -типа, поскольку, во-первых, эти белки могут находиться в клетке в свободном состоянии, а не только в комплексе с протеасомами [23, 24], и, во-вторых, показано, что мечение субъединицы  $\alpha 5$  (PSMA5) или  $\alpha 7$  (PSMA3) полностью предотвращало присоединение к 20S про-

теасоме регуляторных комплексов [25]. Мы выбрали субъединицу  $\beta 7$  20S протеасомы, потому что несмотря на то, что белки протеасом  $\beta$ -типа формируют протеолитическую полость 20S протеасомы, данная субъединица, во-первых, не является каталитически активной, и во-вторых, по сравнению со всеми другими субъединицами  $\beta$ -типа имеет более короткое время жизни [26].

Временные трансфекции часто приводят к сверхэкспрессии исследуемого гена, на несколько порядков превышающей его физиологический уровень в клетке. Чтобы свести к минимуму сверхэкспрессию  $\beta 7$ -НТВН, мы использовали ретровирусный способ доставки конструкции в клетки, для чего трансфицировали в клетки линии НЕК293 вектор рQСХІР- $\beta 7$ -НТВН, а также плазмиды, необходимые для сборки вирусов. Через 2 сут после трансфекции, собранными вирусами, несущими нашу конструкцию, заражали клетки линии К562, из которых после 7 сут селекции при концентрации пурамицина 5 мкг/мл, получали стабильную клеточную линию. Уровень экспрессии меченого белка в прошедших селекцию клетках К562, экспрессирующих белок  $\beta 7$ -НТВН (К562/ $\beta 7$ -НТВН), показан на рис. 1б. С помощью антител против биотина мы наблюдали сигнал на уровне предсказанной подвижности белка, меченого НТВН, в системе одномерного SDS-электрофореза (43 кДа).

Следующим этапом стал анализ возможности очистки протеасом за счет аффинного связывания стрептавидина с биотинилированным участком пептида НТВН. К экстракту контрольных клеток К562 и клеток, экспрессирующих белок  $\beta 7$ -НТВН, добавляли стрептавидин-агарозу, которая за счет высокого сродства к биотину связывала меченую протеасомную субъединицу. Мы наблюдаем сигнал на уровне предсказанной подвижности меченого белка в системе одномерного SDS-электрофореза в клеточном лизате и во фракции со стрептавидиновым носителем только в клетках К562/ $\beta 7$ -НТВН (рис. 1б). Мы показали присутствие протеасомных антигенов в полученных нами препаратах аффинно-очищенных протеасом, несущих в себе меченую субъединицу 20S комплекса, и отсутствие их в комплексе со стрептавидином, инкубированным с клеточным лизатом контрольных клеток К562 (рис. 1б), что подтверждает высокую специфичность одностадийной очистки протеасом за счет реакции стрептавидин-биотин. Картина распределения протеасомных белков в системе электрофореза в присутствии SDS показана на рис. 1в и аналогична представленной ранее [21].

Ранее показано, что мечение субъединицы протеасом Rpn11 пептидом НТВН не влияет на протеолитическую функцию очищенной протеасомы [21]. Чтобы доказать отсутствие влияния

пептида НТВН в комплексе с  $\beta 7$  на активность протеасом, мы определили пептидазную активность химотрипсинового, трипсинового и каспазаподобного типов очищенных протеасом по гидролизу флуорогенных олигопептидов, специфичных для всех трех каталитических центров протеасом (рис. 1з). В качестве контроля за специфичностью пептидазной активности мы использовали протеасомный пептидный ингибитор MG132 (Enzo Life Sciences, США). Важно отметить, что мы не наблюдали никакой пептидазной активности в отрицательном контроле. Согласно полученным результатам, протеасомы, содержащие меченый белок  $\beta 7$ -НТВН, сохраняют высокую пептидазную активность по трем типам. Мы не можем исключить, однако, тот факт, что несущие метку протеасомы могут иметь некоторые функциональные отличия по сравнению с протеасомами в контрольных клетках, несмотря на отсутствие заметного влияния экспрессии меченого протеасомного белка на рост и жизнедеятельность клеток.

Чтобы охарактеризовать субъединичный состав и посттрансляционные модификации протеасом, был проведен MALDI-ICR-масс-спектрометрический анализ протеасом, аффинно-очищенных из клеток К562/ $\beta 7$ -НТВН. Схема эксперимента представлена на рис. 2. Клетки линии К562, экспрессирующие  $\beta 7$ -НТВН, промывали охлажденным PBS и лизировали в буфере, содержащем АТФ. В течение ночи клеточный экстракт инкубировали со стрептавидин-агарозой, после чего протеасомы элюировали с аффинного носителя с помощью буфера, содержащего TEV-протеазу. Белки протеасом (10 мкг) разделяли в системе SDS-электрофореза. Белки в геле визуализировали окраской Кумасси, после чего окрашенные полоски вырезали из геля в количестве 43 штук (рис. 3). Белки, содержащиеся в полосках геля, подвергали воздействию трипсина и анализировали методом MALDI-ICR-масс-спектрометрии.

Для каждого из 43 образцов были получены масс-спектры, один из которых соответствующий пробе 8, представлен на рис. 4. Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FTDocViewer (Varian, США) и созданы пик-листы в txt-формате. При помощи программы Mascot методом "пептидный фингерпринт" провели поиск в базе данных, результаты которого представлены в табл. 1. Идентифицированы все 14 субъединиц 20S протеасомы: 7 субъединиц  $\alpha$ -типа и 7 субъединиц  $\beta$ -типа. Показано наличие 6 АТФ-азных белков и 13 неАТФ-азных субъединиц регулятора 19S. Среди выявленных нами неАТФ-азных субъединиц наблюдаются два дополнительных к общеизвестным белкам комплекса 19S белки Rpn13 (ADRM1) и Gankyrin (PSMD10).



**Рис. 2.** Схематическое изображение этапов эксперимента, включая очистку протеасом из клеток, разделение протеасомных белков в системе денатурирующего электрофореза и масс-спектрометрический анализ подготовленных проб.

В дополнение к идентифицированным белкам 26S протеасомы, обнаружены белки PA28 $\alpha$ , PA28 $\gamma$  и PA200. Интересно, что нами обнаружена недавно описанная новая каталитическая субъединица  $\beta 5t$  [27], которая, как полагают, экспрессируется исключительно в клетках тимуса. Чтобы утверждать, однако, что субъединица  $\beta 5t$  действительно экспрессируется в клетках K562, необходимо доказать это иммуноанализом с использованием специфических антител.

В популяции протеасом, аффинно-очищенных из клеток K562/β7–НТВН, мы не обнаружили иммунорегуляторную субъединицу протеасом PA28 $\beta$ , хотя существуют свидетельства того, что этот белок не только экспрессируется в клетках K562, но может вместе с PA28 $\alpha$  также участвовать в регуляции эндорибонуклеазной активности протеасом [28]. Мы полагаем, что наблюдаемое расхождение в данных может быть связано с тем, что экспрессия этих белков в клетках невысока, а многие белки протеасом имеют близкую молекулярную массу, поэтому одномерного электрофоретического разделение белков протеасом перед масс-спектрометрическим анализом может быть недостаточно для идентификации минорных белков в общей протеасомной популяции.

В недавних протеомных исследованиях обнаружены некоторые эндогенные белки, которые связываются с 26S протеасомами и, как авторы полагают, влияют на их функцию [22, 29, 30]. Показано, что с протеасомами из клеток дрожжей,

мышы, человека ассоциированы такие белки, как компоненты убиквитин-протеасомной системы, шапероны, белки цитоскелета и участники клеточного метаболизма [22, 29–33]. Важно подчеркнуть, что присутствие соли в процессе очистки протеасом мешает идентификации белков, ассоциированных с аффинно-очищенными протеасомами [32]. В настоящей работе используемый нами подход снятия материала с аффинного носителя с помощью специфического отщепления TEV-протеазой, с одной стороны, снижал вероятность присутствия в элюате неспецифически связавшихся с носителем и других биотинилированных белков. С другой стороны, использование минимального количества соли предотвращало потерю ассоциированных с протеасомами белков за счет белок-белковых взаимодействий, что позволяло повысить вероятность идентификации большего числа ассоциированных с протеасомами белков.

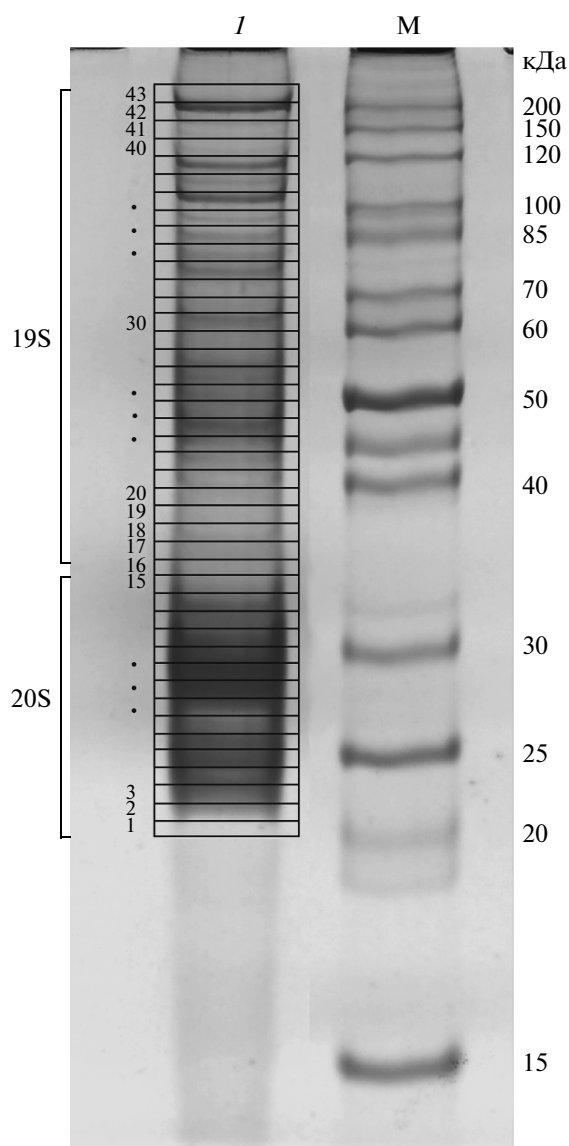
Как и в упомянутых выше работах, мы обнаружили, согласно данным MALDI-ICR-масс-спектрометрии, что с протеасомами, аффинно-очищенными из клеток K562/β7–НТВН, ассоциированы белки-компоненты убиквитин-протеасомной системы, шапероны, белки цитоскелета и участники метаболизма (табл. 2). Во фракции аффинно-очищенных протеасом оказались такие вовлеченные в убиквитин-протеасомную систему белки, как убиквитин, деубиквитирующий фермент UCH37 и убиквитин-лигаза E3A. Присутствие шаперонов в списке ассоциированных с протеа-

сомами белков подтверждают все из упомянутых выше протеомных исследований протеасом, и объясняется это тем, что шапероны обеспечивают правильную сборку самих протеасом [2] и облегчают взаимодействие белков-мишеней с протеасомами [31]. Факт идентификации в этом списке белков цитоскелета и участников метаболизма можно объяснить контаминацией в процессе выделения и очистки протеасом в силу повышенного содержания этих белков в клетке. Эти белки или некоторые из них могут также являться субстратами протеасом, предназначенными для деградации как по убиквитин-зависимому, так и по убиквитин-независимому пути, и взаимодействуют с протеасомами через полиубиквитин или за счет субъединицы  $\alpha 7$ , которая связывает протеасомные субстраты при убиквитин-независимом протеолизе [34, 35].

Интересно, что есть ряд ранних работ, которые утверждают, что протеасомы могут быть связаны в клетке с фибриллярным актином [36, 37], причем фибриллярный актин может способствовать сборке предварительно диссоциированной 20S протеасомы [38]. Чтобы однозначно ответить на вопрос о причинах присутствия в списке ассоциированных с протеасомами белков цитоскелета и участников метаболизма и определить функциональное значение наблюдаемого взаимодействия протеасом с этими белками, в дальнейших исследованиях, возможно, потребуется применение комплексного подхода при использовании ингибиторов протеасом для увеличения клеточного пула убиквитинилированных белков, фракционирование клеточных компартментов, иммуно-анализ с использованием специфических антител и др.

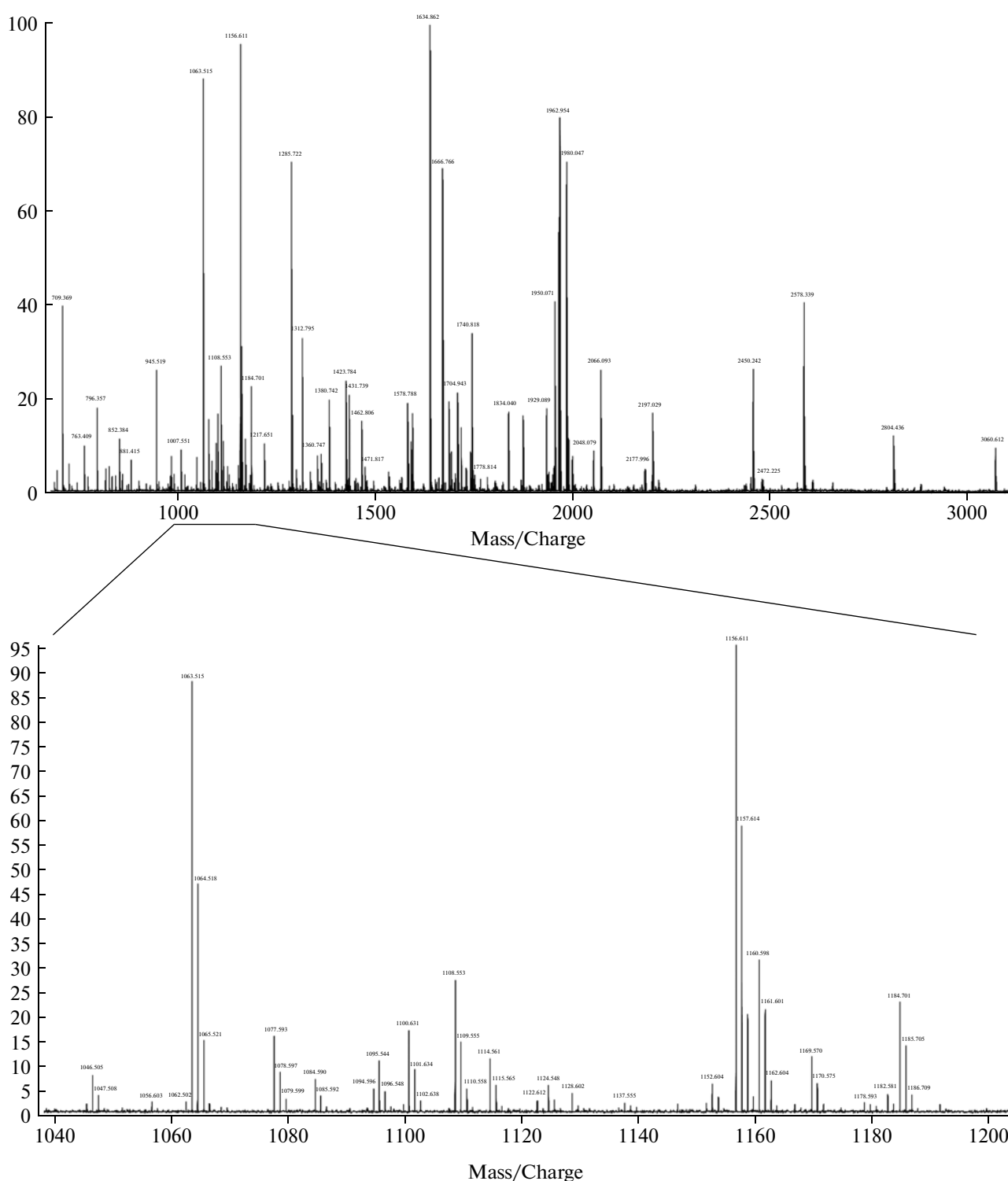
Известно, что ряд субъединиц протеасом в клетках могут нести модификацию на *N*-конце [21, 39–41]. Однако данных об этих модификациях для субъединиц протеасом в клетках человека различной тканеспецифичности недостаточно. Мы показали, что из 12 субъединиц протеасом, имеющих модификацию на *N*-конце (табл. 3), только четыре субъединицы ( $\alpha 5$ ,  $\beta 4$ , Rpt3 и Rpt5) ацетилированы по *N*-концевому остатку метионина. Восемь субъединиц ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 6$ , Rpt4, Rpt6 и Rpn6) ацетилированы по второй аминокислоте после удаления *N*-концевого остатка метионина.

Интересно отметить, что АТФ-азная субъединица регулятора 19S протеасом Rpt2 миристилирована на *N*-конце (табл. 3), что согласуется с литературными данными [21, 39, 40]. Функциональное значение миристилирования субъединицы Rpt2 неясно, но в силу постоянства данной модификации для протеасом — от дрожжей до человека, предполагается участие ее во взаимодействии 26S протеасомы с мембранными белками.



**Рис. 3.** Электрофоретическое разделение белков протеасом, аффинно-очищенных из клеток K562/ $\beta 7$ -НТВН. Описание аналогично описанию рис 1в. Показано деление дорожки геля, содержащей визуализированные белки протеасом, на 43 полоски, которые были вырезаны для дальнейшего масс-спектрометрического анализа.

Убиквитинилирование субъединиц протеасом мало изучено, существует всего несколько работ, которые показали наличие у протеасом этой посттрансляционной модификации [24, 33, 42]. Кроме того, в результате глобального скрининга убиквитинилированных эндогенных белков были обнаружены убиквитинилированные протеасомные белки [43, 44]. Однако биологическое значение этой протеасомной модификации совершенно не исследовано. Предполагают, что убиквитинилирование служит не только сигналом к расщеплению белка по убиквитин-зависимому механизму [45],



**Рис. 4.** Масс-спектры белков, выделенных из полоски геля под номером 8 на рис. 3. По горизонтали – значения масса/заряд, по вертикали – интенсивность, отн. ед.

но и может регулировать каталитические активности белков [24, 46], внутриклеточную локализацию белков [47] и белок-белковые взаимодействия [48].

Мы обнаружили в общей сложности 49 сайтов убиквитинилирования на 23 субъединицах протеасом, и 17 из этих сайтов ранее не были описаны (табл. 3).

Таблица 1. Белки протеасом, детектированные с помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии

Номер пробы	Номер белка в Uniprot (SwissProt)	Название белка		Название гена	Масса белка, кДа	Число пептидов	Доля покрытия белка, %	Точность измерения масс, ppm
		полное	альтернативное					
20S протеасома								
8	P60900 (PSA6_HUMAN)	Proteasome subunit alpha type-6	α1	PSMA6	25.4	17	56	2.24
5	P25787 (PSA2_HUMAN)	Proteasome subunit alpha type-2	α2	PSMA2	25.8	16	62	1.9
10	P25789 (PSA4_HUMAN)	Proteasome subunit alpha type-4	α3	PSMA4	29.5	10	32	1.47
8	O14818 (PSA7_HUMAN)	Proteasome subunit alpha type-7	α4	PSMA7	27.9	24	77	1.43
8	P28066 (PSA5_HUMAN)	Proteasome subunit alpha type-5	α5	PSMA5	26.5	8	29	1.49
12	P25786 (PSA1_HUMAN)	Proteasome subunit alpha type-1	α6	PSMA1	29.6	18	72	1.98
10	P25788 (PSA3_HUMAN)	Proteasome subunit alpha type-3	α7	PSMA3	28.3	14	47	1.87
3	P28072 (PSB6_HUMAN)	Proteasome subunit beta type-6	β1	PSMB6	23.3	5	21	1.63
8	Q99436 (PSB7_HUMAN)	Proteasome subunit beta type-7	β2	PSMB7	30	8	20	1.08
4	P49720 (PSB3_HUMAN)	Proteasome subunit beta type-3	β3	PSMB3	22.9	9	41	2.17
2	P49721 (PSB2_HUMAN)	Proteasome subunit beta type-2	β4	PSMB2	22.8	8	36	0.97
1	P28074 (PSB5_HUMAN)	Proteasome subunit beta type-5	β5	PSMB5	22.5	18	52	2.3
4	P20618 (PSB1_HUMAN)	Proteasome subunit beta type-1	β6	PSMB1	26.5	11	52	2.3
6	P28070 (PSB4_HUMAN)	Proteasome subunit beta type-4	β7	PSMB4	24.4	13	57	2.31
Регулятор протеасом 19S								
25	P35998 (PRS7_HUMAN)	26S protease regulatory subunit 7	Rpt1	PSMC2	48.6	26	56	2.25
29	P62191 (PRS4_HUMAN)	26S protease regulatory subunit 4	Rpt2	PSMC1	49.2	20	51	2.23
26	P43686 (PRS6B_HUMAN)	26S protease regulatory subunit 6B	Rpt3	PSMC4	47.4	20	58	2.48
22	P62333 (PRS10_HUMAN)	26S protease regulatory subunit 10B	Rpt4	PSMC6	44.2	15	46	2.08
25	P17980 (PRS6A_HUMAN)	26S protease regulatory subunit 6A	Rpt5	PSMC3	49.2	23	58	2.48



Таблица 1. Окончание

Номер группы	Номер белка в UniProt (SwissProt)	Название белка		Назва- ние гена	Масса белка, кДа	Число пептидов	Доля покрытия белка, %	Точность измерения масс, ррпм
		полное	альтерна- тивное					
23	P62195 (PRS8_HUMAN)	26S protease regulatory subunit 8	Rpt6	<i>PSMC5</i>	45.6	19	54	2.21
36	Q13200 (PSMD2_HUMAN)	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	Rpn1	<i>PSMD2</i>	100.2	42	50	2.01
38	Q99460 (PSMD1_HUMAN)	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	Rpn2	<i>PSMD1</i>	105.8	40	40	2.45
31	O43242 (PSMD3_HUMAN)	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	Rpn3	<i>PSMD3</i>	61	41	59	2.49
27	O00232 (PSD12_HUMAN)	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	Rpn5	<i>PSMD12</i>	52.9	17	36	2.19
24	O00231 (PSD11_HUMAN)	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	Rpn6	<i>PSMD11</i>	47.5	14	37	2.14
22	Q15008 (PSMD6_HUMAN)	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	Rpn7	<i>PSMD6</i>	45.5	22	50	2.27
19	P51665 (PSMD7_HUMAN)	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	Rpn8	<i>PSMD7</i>	37	13	46	2.31
21	Q9UNM6 (PSD13_HUMAN)	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	Rpn9	<i>PSMD13</i>	43	14	43	1.74
27	P55036 (PSMD4_HUMAN)	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	Rpn10/SSA	<i>PSMD4</i>	40.7	11	30	2.44
16	O00487 (PSDE_HUMAN)	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	Rpn11	<i>PSMD14</i>	34.6	8	35	1.31
25	P48556 (PSMD8_HUMAN)	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	Rpn12	<i>PSMD8</i>	39.6	3	11	1.14
23	Q16186 (ADRM1_HUMAN)	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	Rpn13	<i>ADRM1</i>	42.2	4	15	5.21
3	O75832 (PSD10_HUMAN)	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10	Gankyrin	<i>PSMD10</i>	24.4	2	17	7.12
Другие белки протеасом								
14	Q8TAA3 (PSA7L_HUMAN)	Proteasome subunit alpha type-7-like	$\alpha 4s$	<i>PSMA8</i>	28.5	5	22	1.86
20	A5LHX3 (PSB11_HUMAN)	Proteasome subunit beta type-11	$\beta 5t$	<i>PSMB11</i>	32.5	2	12	5.63
31	Q06323 (PSME1_HUMAN)	Proteasome activator complex subunit 1	PA28 $\alpha$	<i>PSME1</i>	28.7	9	27	2.44
13	P61289 (PSME3_HUMAN)	Proteasome activator complex subunit 3	PA28 $\gamma$	<i>PSME3</i>	29.5	3	17	3.11
42	Q14997 (PSME4_HUMAN)	Proteasome activator complex subunit 4	PA200	<i>PSME4</i>	211.3	39	21	2.07

Таблица 2. Ассоциированные с протеасомами белки, детектированные с помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии

Номер пробы	Номер белка в Uniprot (SwissProt)	Название белка	Название гена	Масса белка, кДа	Число пептидов	Доля покрытия белка, %	Точность измерения масс, рртп
Белки убиквитин-протеасомной системы							
43	P62979 (RS27A_HUMAN)	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	<i>RPS27A</i>	17.9	5	27	1.03
43	P62987 (RL40_HUMAN)	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	<i>UBA52</i>	14.7	4	36	1.87
17	Q9Y5K5 (UCHL5_HUMAN)	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5/UCH37	<i>UCHL5</i>	37.6	3	15	1.09
34	Q05086 (UBE3A_HUMAN)	Ubiquitin-protein ligase E3A	<i>UBE3A</i>	100.7	4	5	2.72
Шапероны							
30	P10809 (CH60_HUMAN)	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	<i>HSPD1</i>	61.1	8	18	2.5
32	P11142 (HSP7C_HUMAN)	Heat shock cognate 71 kDa protein	<i>HSPA8</i>	70.9	18	31	1.89
33	P11021 (GRP78_HUMAN)	78 kDa glucose-regulated protein	<i>HSPA5</i>	72.3	17	36	2.05
37	P08238 (HS90B_HUMAN)	Heat shock protein HSP 90-beta	<i>HSP90AB1</i>	83.3	14	23	2.43
32	P08107 (HSP71_HUMAN)	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	<i>HSPA1A</i>	70.1	10	17	1.8
32	P38646 (GRP75_HUMAN)	Stress-70 protein, mitochondrial	<i>HSPA9</i>	73.7	8	16	1.95
Белки цитоскелета							
22	P60709 (ACTB_HUMAN)	Actin, cytoplasmic 1	<i>ACTB</i>	41.7	14	45	2.27
28	Q9BQE3 (TUBA1C_HUMAN)	Tubulin alpha-1C chain	<i>TUBA1C</i>	49.9	7	26	1.63
28	P07437 (TUBB5_HUMAN)	Tubulin beta chain	<i>TUBB</i>	49.7	8	26	2.17
42	O43707 (ACTN4_HUMAN)	Alpha-actinin-4	<i>ACTN4</i>	104.9	39	21	2.07
Белки-участники метаболизма							
25	P07864 (LDHC_HUMAN)	L-Lactate dehydrogenase C chain	<i>LDHC</i>	36.3	3	9	2.22
29	Q9HCC0 (MCCB_HUMAN)	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	<i>MCCB2</i>	61.3	12	27	1.23

**Таблица 3.** Выявленные с помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии посттрансляционные модификации протеасомных белков\*

Название белка	Название гена	А. к.	Последовательность пептида
<i>N</i> -Концевое ацетилирование			
$\alpha 2$	<i>PSMA2</i>	A2	acetyl-AERGYSFSLTTFSPSGK
$\alpha 4$	<i>PSMA7</i>	S2	acetyl-SYDR
$\alpha 5$	<i>PSMA5</i>	M1	acetyl-MFLTR
$\alpha 7$	<i>PSMA3</i>	S2	acetyl-SSIGTGVDLSASTFSPDGR
$\beta 3$	<i>PSMB3</i>	S2	acetyl-SIMSYNGGAVMAMK
$\beta 4$	<i>PSMB2</i>	M1	acetyl-MEYLIGIQGPDYVLVASDR
$\beta 6$	<i>PSMB1</i>	L2	acetyl-LSSTAMYSAPGR
Rpt3	<i>PSMC4</i>	M1	acetyl-MEEIGILVEK
Rpt4	<i>PSMC6</i>	A2	acetyl-ADPRDKALQDYR
Rpt5	<i>PSMC3</i>	M1	acetyl-MNLLPNIESPVTR
Rpt6	<i>PSMC5</i>	A2	acetyl-ALDGPEQMELEEGKAGSGLR
Rpn6	<i>PSMD11</i>	A2	acetyl-AAAVVEFQR
<i>N</i> -Концевое миристилирование			
Rpt2	<i>PSMC1</i>		Myr-GQSQSGGHGPGGGK
Убиквитинилирование			
$\alpha 1$	<i>PSMA6</i>	K45, <u>K54</u> , K55 K181, K182, <u>K184</u>	GKDCAVIVTQKK QTESTSFLEKKVK
$\alpha 2$	<i>PSMA2</i>	K70	VEPITKHIGLVYSGMGPDYR
$\alpha 3$	<i>PSMA4</i>	K238	EVEQLIKK
$\alpha 4$	<i>PSMA7</i>	<u>K27</u> , K28 <u>K166</u> , K174	AITVFSPDGHLFQVEYAQEA <b>VKK</b> GAKSVREFLEK
$\alpha 7$	<i>PSMA3</i>	<u>K58</u> , K65	LVL <b>SK</b> LYEEGSNK
$\beta 3$	<i>PSMB3</i>	K15, K17	SIMSYNGGAVMAMK <b>KGK</b>
$\beta 5$	<i>PSMB5</i>	<u>K130</u> , <u>K140</u>	NKERISVAA <b>ASK</b>
$\beta 6$	<i>PSMB1</i>	K164 <u>K240</u>	DS <b>FK</b> EGIREETVSLRK
$\beta 7$	<i>PSMB4</i>	K240	DARSYNRFQIATVTEK
Rpt1	<i>PSMC2</i>	K222 K415, K418	GVLLFGPPGTG <b>KTLCAR</b> DFLEAVN <b>KVIK</b>
Rpt2	<i>PSMC1</i>	K237	TLLAKAVANQTSATFLR
Rpt3	<i>PSMC4</i>	K255	DV <b>FRLAK</b>
Rpt4	<i>PSMC6</i>	K314, K322 K383, <u>K387</u>	LDILKIHAG <b>PITK</b> LESKLDY <b>KPV</b>
Rpt5	<i>PSMC3</i>	K125	CA <b>VIK</b>
Rpt6	<i>PSMC5</i>	K156	VPDSTYEMIGGL <b>DK</b>
Rpn1	<i>PSMD2</i>	K39, K41, K50 K350 K754	DAGDKDKEQEL <b>SEEDK</b> VPDDIYK <b>THLENNR</b> LAAML <b>RQLAQYHAK</b>
Rpn2	<i>PSMD1</i>	K413	FTATASLG <b>VIHK</b>
Rpn3	<i>PSMD3</i>	<u>K209</u>	ALDLVA <b>AKCYYYHAR</b>
Rpn5	<i>PSMD12</i>	K52	LQEV <b>ETLLSLEKQTR</b>
Rpn6	<i>PSMD11</i>	K59 <u>K205</u>	EQSILELG <b>SLLAK</b> AALTSARTTANAI <b>YCPPK</b>

Таблица 3. Окончание

Название белка	Название гена	А. к.	Последовательность пептида
Rpn7	<i>PSMD6</i>	<u>K126</u> , K130	KTYDKTVALGHR
PA28α	<i>PSME1</i>	<u>K232</u> , <u>K236</u>	NAYAVLYDIILKNFEK
PA200	<i>PSME4</i>	<u>K89</u> , <u>K92</u> <u>K1579</u>	KFSK TILKWLMASAGR
Фосфорилирование			
α1	<i>PSMA6</i>	<u>T52</u>	DCAVIVTQKKVPDK
α2	<i>PSMA2</i>	<u>T48</u>	AANGVVLATEKKQK
α6	<i>PSMA1</i>	S54	RAQSELAHQKK
α7	<i>PSMA3</i>	<u>S87</u>	SLADIAR
Rpt1	<i>PSMC2</i>	<u>T220</u> , <u>T223</u>	GVLLFGPPGTGKTLCAR
Rpt2	<i>PSMC1</i>	<u>S422</u> T53, <u>T56</u>	SKENVLYKK LPLVTPHTQCRLKLLK
Rpt4	<i>PSMC6</i>	<u>T321</u> <u>S382</u> , Y386	LDILKIHAGPITK KLESKLDYKPV
Rpt5	<i>PSMC3</i>	<u>S281</u> , <u>T293</u>	EKAPSIIFIDELDAIGTK
Rpt6	<i>PSMC5</i>	<u>S39</u>	IEELQLIVNDKSNLR
Rpn1	<i>PSMD2</i>	<u>Y751</u>	LAAMLRQLAQYNAK
Rpn7	<i>PSMD6</i>	<u>S27</u>	FLLSLPEHR

\* А. к. – аминокислотный остаток в составе белка. Подчеркиванием выделены впервые обнаруженные нами сайты модификации белков. Жирным шрифтом указано положение аминокислотного остатка, несущего выявленную модификацию.

Фосфорилирование субъединиц протеасом наиболее хорошо изучено [19, 21, 49] и играет важную роль в сборке 26S протеасомных комплексов, в их стабильности, регулирует каталитические функции протеасом и участвует в регуляции внутриклеточной локализации [50, 51]. В настоящей работе определены 17 сайтов фосфорилирования на 11 субъединицах протеасом, причем 14 из этих сайтов выявлены нами впервые (табл. 3).

Несмотря на то, что биологические функции сайтов фосфорилирования и убиквитинилирования, идентифицированные нами в протеасоме, еще предстоит определить, результаты работы будут полезны для будущих функциональных исследований, направленных на выяснение роли этих посттрансляционных модификаций в функции протеасом и механизмах ее регуляции.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Клетки** почки эмбриона человека линии HEK293 и миелогенной лейкемии человека линии K562, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН), культивировали при 37°C в средах DMEM и RPMI 1640, соответственно, содержащих 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), в присутствии пенициллина и стрептомицина или гентамицина.

**Экспрессионную конструкцию** получили на основе вектора pQCXIP (Clontech, США), в который по сайтам NotI и EcoRI вставлена последовательность hPSMD14-НТВН (любезно предоставлен д-ром Л. Хуангом (Dr. L. Huang)). Вместо последовательности hPSMD14 по сайтам рестрикции NotI и PacI мы вставили последовательность hPSMB4 (β7), которую амплифицировали с кДНК клеток HEK293 с помощью праймеров (5'–3'): TTACGGCCGAGAC-CATGGAAGCGTTTTTGGGG и CCCTTAAT-TAATTCAAAGCCACTGATCATGTG, включающих в себя сайты рестрикции для EagI и PacI (подчеркнуты). Наличие и точность вставки в векторе определяли с помощью рестрикции и итоговым секвенированием.

**Трансфекцию** клеток линии HEK293 проводили с помощью реагента TurboFect (MBI Fermentas, Литва), согласно рекомендациям фирмы-изготовителя, одновременно вводя плазмиды, необходимые для сборки вирусной частицы (любезно предоставлены д-ром Н.А. Барлевым), и ретровирусную плазмиду pQCXIP, кодирующую β7-НТВН. Через 24 ч после постановки трансфекции производили замену трансфекционной среды на новую. Супернатант, содержащий вирусные частицы, собирали в течение последующих 2 сут.

**Инфекцию** клеток линии K562 проводили ретровирусами, содержащими β7-НТВН, согласно протоколу фирмы-изготовителя (Clontech Labora-

tores, США). Через 16 ч после инфицирования производили замену трансдукционной среды на новую, содержащую антибиотик пуромидин (Invitrogen, США). Селекцию клеток проводили в течение 7 сут.

**Клеточный экстракт** готовили из клеток K562, контрольных и экспрессирующих меченый белок  $\beta 7$ -НТВН (K562/ $\beta 7$ -НТВН). Клетки промывали холодным PBS и лизировали в буфере А (50 mM Na-фосфат, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% глицерин, 5 mM ATP, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Nonidet P-40, ингибиторы протеаз) в течение 30 мин при 4°C. Клеточные фрагменты удаляли центрифугированием при 13 тыс. об/мин в течение 30 мин при 4°C.

**Вестерн-блоттинг** белков проводили по стандартной методике. Белки фракционировали в денатурирующем 13% ПААГ [52]. Полученные фракции электрофоретически переносили на PVDF-фильтры (Bio-Rad Laboratories, США) в буфере, содержащем 25 mM Трис-HCl, 190 mM глицин, 0.05% SDS, 10% метанола, pH 7.3. Мембрану отмывали в буфере PBS и блокировали центры неспецифического связывания антител 2.5% раствором бычьего сывороточного альбумина (ICN, США) или 5% обезжиренным молоком в этом же буфере. Избыток блокирующего агента отмывали буфером PBS, и мембрану инкубировали с конъюгированными с пероксидазой хрена антителами против биотина (Cell Signaling, США) и (или) со специфическими антителами против соответствующих субъединиц 26S протеасомы Rpn7,  $\alpha 5$  и  $\beta 7$  (Enzo Life Sciences, США). Использовали вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США), пероксидазу выявляли с помощью кита SuperSignal (Thermo Scientific, США).

**Протеасомы** выделяли в соответствии с методикой, описанной ранее [21]. К клеточному экстракту клеток K562/ $\beta 7$ -НТВН добавляли стрептавидин-агарозу (Thermo Scientific, США) и инкубировали в течение ночи при 4°C при постоянном перемешивании. Далее белки в комплексе со стрептавидин-агарозой осаждали центрифугированием и промывали последовательно 20 объемами лизирующего буфера, 10 объемами буфера ТЕВ (50 mM Трис-HCl, pH 7.5, 10% глицерин). Далее протеасомы элюировали, со стрептавидин-агарозы двумя объемами буфера ТЕВ в присутствии 0.1% ТЕВ-протеазы (Sigma-Aldrich, США) в течение 2 ч при температуре 30°C и концентрировали с применением центрифужных фильтров Amicon Ultra-0.5 (Millipore, США).

**Пептидазную активность** протеасом химотрипсин-, трипсин- и каспаза-подобных типов определяли по гидролизу флуорогенных пептидов Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-амино-4-метилкумарин (АМС), Ac-Arg-Leu-Arg-АМС и Z-Leu-Leu-Glu-АМС (Enzo Life Sciences, США), соответственно. Для

этого 4 нмоль субстрата инкубировали с 1 мкг протеасом в течение 45 мин при температуре 37°C в буферном растворе, содержащем 50 mM Трис-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 5 mM ATP. Реакцию останавливали, добавляя к реакционному раствору равный объем смеси 70 mM уксусной кислоты, 100 mM хлорацетата натрия и 30 mM ацетата натрия. Концентрацию продукта гидролиза АМС определяли на флуориметре VersaFluor (Bio-Rad Laboratories, США), измеряя экстинкцию и эмиссию при длинах волн 365 и 440 нм соответственно [53].

**Приготовление проб для масс-спектрометрического анализа.** После электрофоретического разделения протеасомных белков и окрашивания Кумасси G250 полоски геля, соответствующие белковым полосам (рис. 3), вырезали и промывали для удаления красителя в 40% растворе ацетонитрила в 100 mM водном бикарбонате аммония в течение 15 мин при 37°C. После удаления раствора, кусочки геля обезвоживали инкубацией в течение 10 мин в ацетонитриле, затем, удалив ацетонитрил, пробы высушивали. К высушенным образцам добавляли раствор модифицированного трипсина (Promega, США) в 50 mM растворе бикарбоната аммония с концентрацией 15 мкг/мл и инкубировали сначала в течение 30 мин на льду, затем в течение 4 ч при 37°C. Трипсинолиз останавливали добавлением к раствору 0.5% TFA в 10% растворе водного ацетонитрила (в соотношении 2 : 1 к раствору трипсина). Надгелевый раствор использовали для получения масс-спектров.

Для приготовления образцов для масс-спектрометрии непосредственно на мишени смешивали 0.7 мкл раствора белкового образца и 0.35 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 20 мг/мл в 30% водном ацетонитриле в присутствии 0.1% TFA, полученную смесь высушивали на воздухе.

**Масс-спектры** были получены на ионно-циклотронном масс-спектрометре ионно-циклотронного резонанса с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией Varian 902-MS (Varian, США) со сверхпроводящим магнитом 9.4 Тесла, в режиме положительных ионов. Для облучения образца использовалась третья гармоника Nd:YAG-лазера (355 нм). Точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина (842.5094 Да) и кератина (2383.9525 Да) составляла менее 2.5 ppm. Спектры получали в диапазоне масс 500–4500 *m/z* (масса/заряд), выбирая мощность лазера, оптимальную для достижения наилучшего разрешения.

**Идентификацию** белков осуществляли при помощи программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FTDocViewer (Varian, США) и созданы пик-листы в txt-формате. При помощи

программы Mascot методом “пептидного фингер-принта” проводили поиск в базе данных SwissProt среди белков Homo sapiens с указанной выше точностью. Полученные результаты приведены в табл. 1 и 2.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим д-ра Л. Хуанг (Калифорнийский университет, США) – Dr. L. Huang (University of California, USA) за генетическую конструкцию pQCXIP-hRpn11-НТВН, д-ра Н.А. Барлева (Университет Лестера, Великобритания) – Dr. N. Barlev (University of Leicester, UK) за смесь плазмид для сборки ретровирусной частицы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект 14-14-00718) и с использованием оборудования ЦКП “Аналитический центр нано- и биотехнологий ГОУ СПбГПУ” на базе ФГБОУ ВПО “СПбГПУ” при финансовой поддержке Минобрнауки России.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ciechanover A., Schwartz A. L. // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1695. P. 3–17.
2. Цимоха А. С. // Цитология. 2010. Т. 52. С. 271–300.
3. Touitou R., Richardson J., Bose S., Nakanishi M., Rivett J., Allday M. J. // EMBO J. 2001. V. 20. P. 2367–2375.
4. Zhang M., Pickart C. M., Coffino P. // EMBO J. 2003. V. 22. P. 1488–1496.
5. Konstantinova I. M., Tsimokha A. S., Mittenberg A. G. // Int. Rev. Cell Mol. Biol. 2008. V. 267. P. 59–124.
6. Kloetzel P. M. // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1695. P. 225–233.
7. Murata S., Sasaki K., Kishimoto T., Niwa S., Hayashi H., Takahama Y., Tanaka K. // Science. 2007. V. 316. P. 1349–1353.
8. Mittenberg A. G., Moiseeva T. N., Barlev N. A. // Front. Biosci. 2008. V. 13. P. 7184–7192.
9. Qiu X. B., Ouyang S. Y., Li C. J., Miao S., Wang L., Goldberg A. L. // EMBO J. 2006. V. 25. P. 5742–5753.
10. Sone T., Saeki Y., Toh-e A., Yokosawa H. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 28807–28816.
11. Tanahashi N., Murakami Y., Minami Y., Shimbara N., Hendil K. B., Tanaka K. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 14336–14345.
12. Gao X., Li J., Pratt G., Wilk S., Rechsteiner M. // Arch. Biochem. Biophys. 2004. V. 425. P. 158–164.
13. Ustrell V., Pratt G., Gorbea C., Rechsteiner M. // Methods Enzymol. 2005. V. 398. P. 321–329.
14. Schmidt M., Haas W., Crosas B., Santamaria P.G., Gygi S.P., Walz T., Finley D. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2005. V. 12. P. 294–303.
15. Schmidt M., Finley D. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843. P. 13–25.
16. Teicher B.A., Ara G., Herbst R., Palombella V.J., Adams J. // Clin. Cancer. Res. 1999. V. 5. P. 2638–2645.
17. Naujokat C., Hoffmann S. // Lab. Invest. 2002. V. 82. P. 965–980.
18. Schmidt F., Dahlmann B., Janek K., Kloss A., Wacker M., Ackermann R., Thiede B., Jungblut P.R. // Proteomics. 2006. V. 6. P. 4622–4632.
19. Claverol S., Burlet-Schiltz O., Girbal-Neuhausser E., Gairin J.E., Monsarrat B. // Mol. Cell. Proteomics. 2002. V. 1. P. 567–578.
20. Huang L., Jacob R.J., Pegg S.C., Baldwin M.A., Wang C.C., Burlingame A.L., Babbitt P.C. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 28327–28339.
21. Wang X., Chen C.F., Baker P.R., Chen P.L., Kaiser P., Huang L. // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 3553–3565.
22. Guerrero C., Tagwerker C., Kaiser P., Huang L. // Mol. Cell. Proteomics. 2006. V. 5. P. 366–378.
23. Archer G.S., Maitland J., Dawson S., Sheppard P., Mayer R.J. // FEBS Lett. 2004. V. 569. P. 211–216.
24. Moiseeva T.N., Bottrill A., Melino G., Barlev N.A. // Oncotarget. 2013. V. 4. P. 1338–1348.
25. Livinskaya V.A., Barlev N.A., Nikiforov A.A. // Protein Expr. Purif. 2014. V. 97C. P. 37–43.
26. Hayter J.R., Doherty M.K., Whitehead C., McCormack H., Gaskell S.J., Beynon R.J. // Mol. Cell. Proteomics. 2005. V. 4. P. 1370–1381.
27. Tomaru U., Ishizu A., Murata S., Miyatake Y., Suzuki S., Takahashi S., Kazamaki T., Ohara J., Baba T., Iwasaki S., Fugo K., Otsuka N., Tanaka K., Kasahara M. // Blood. 2009. V. 113. P. 5186–5191.
28. Миттенберг А.Г., Моисеева Т.Н., Кузык В.О., Подольская Е.П., Евтеева И.Н., Барлев Н.А. // Цитология. 2014. Т. 56. С. 300–315.
29. Scanlon T.C., Gottlieb B., Durcan T.M., Fon E.A., Beitel L.K., Trifiro M.A. // Exp. Cell Res. 2009. V. 315. P. 176–189.
30. Tai H.C., Besche H., Goldberg A.L., Schuman E.M. // Front. Mol. Neurosci. 2010. V. 3.
31. Goldberg A.L. // Nature. 2003. V. 426. P. 895–899.
32. Besche H.C., Haas W., Gygi S.P., Goldberg A.L. // Biochemistry. 2009. V. 48. P. 2538–2549.
33. Зайкова Ю.Я., Куличкова В.А., Ермолаева Ю.Б., Боттрилл А., Барлев Н.А., Цимоха А.С. // Цитология. 2013. Т. 55. С. 111–122.
34. Sdek P., Ying H., Chang D.L., Qiu W., Zheng H., Touitou R., Allday M.J., Xiao Z.X. // Mol. Cell. 2005. V. 20. P. 699–708.
35. Yi P., Feng Q., Amazit L., Lonard D.M., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W. // Mol. Cell. 2008. V. 29. P. 465–476.
36. Галкин В.Э., Туроверова Л.В., Константинова И.М., Пинаев Г. П. // Цитология. 1998. Т. 40. С. 161–166.
37. Галкин В.Э., Туроверова Л.В., Константинова И.М., Пинаев Г. П. // Цитология. 1998. Т. 40. С. 618–626.
38. Галкин В.Э., Бабаков В.Н., Туроверова Л.В., Константинова И.М. // Цитология. 2000. Т. 42. С. 875–883.
39. Kimura Y., Takaoka M., Tanaka S., Sassa H., Tanaka K., Polevoda B., Sherman F., Hirano H. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 4635–4639.
40. Gomes A.V., Zong C., Edmondson R.D., Li X., Stefani E., Zhang J., Jones R.C., Thyparambil S., Wang G.W., Qiao X,

- Bardag-Gorce F., Ping P.* // *Circ. Res.* 2006. V. 99. P. 362–371.
41. *Kimura Y., Saeki Y., Yokosawa H., Polevoda B., Sherman F., Hirano H.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. V. 409. P. 341–348.
42. *Мусеева Т.Н., Фёдорова О.А., Цимоха А.С., Мунтенберг А.Г., Барлев Н.А.* // Доклады Академии Наук. 2010. Т. 435. С. 267–271.
43. *Denis N.J., Vasilescu J., Lambert J.P., Smith J.C., Figeys D.* // *Proteomics.* 2007. V. 7. P. 868–874.
44. *Meierhofer D., Wang X., Huang L., Kaiser P.* // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7. P. 4566–4576.
45. *Glickman M.H., Ciechanover A.* // *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. P. 373–428.
46. *Bienko M., Green C.M., Sabbioneda S., Crosetto N., Matic I., Hibbert R.G., Begovic T., Niimi A., Mann M., Lehmann A.R., Dikic I.* // *Mol. Cell.* 2010. V. 37. P. 396–407.
47. *Chen B.B., Mallampalli R.K.* // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. P. 3062–3075.
48. *Mosesson Y., Yarden Y.* // *Isr. Med. Assoc. J.* 2006. V. 8. P. 233–237.
49. *Iwafune Y., Kawasaki H., Hirano H.* // *Electrophoresis.* 2002. V. 23. P. 329–338.
50. *Rivett A.J., Bose S., Brooks P., Broadfoot K.I.* // *Biochimie.* 2001. V. 83. P. 363–366.
51. *Bose S., Stratford F.L., Broadfoot K.I., Mason G.G., Rivett A.J.* // *Biochem. J.* 2004. V. 378. P. 177–184.
52. *Laemmli U.K.* // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
53. *Barrett A.J.* // *Biochem. J.* 1980. V. 187. P. 909–912.

## Mass Spectrometric Analysis of Proteasomes Affinity Purified from the Human Myelogenous Leukemia Cells K562

T. O. Artamonova\*, M. A. Khodorkovskii\*, A. S. Tsimokha\*\*

\*Phone: +7 (812) 297-37-40, fax: +7(812) 297-03-41; e-mail: atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru

\*St. Petersburg State Polytechnical University

\*\*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

Proteasomes carry out regulated proteolysis of most proteins and thereby play a crucial role in the regulation of different cellular processes. Dissecting subunit composition and post-translational modifications of proteasome is one of the important milestones in understanding their functions and mechanisms of regulation in the cell. To this end a strategy we followed a strategy for affinity purification of proteasomes from human myeloid leukemia cells with subsequent mass spectrometric analysis. Proteasomes were purified from the stable cell line K562 expressing HTBH tag-labeled 20S proteasome subunit  $\beta 7$  (PSMB4) by non-covalent affinity purification on biotin-avidin beads, followed by elution with TEV protease. We identified all known subunits of the 26S proteasome, as well as PA200 and regulators PA28 $\gamma$  amongst the eluted proteins, using MALDI-ICR mass spectrometry. We have shown that the proteasomes are associated with heat shock proteins, components of the ubiquitin-proteasome system of some cytoskeleton proteins. A number of novel phosphorylation, ubiquitination and N-terminal modification of proteasome subunits were found for 16 proteasome subunits. Our results might be useful for further proteomic studies of proteasomes.

*Keywords: affinity purification, human myelogenous leukemia cell, mass spectrometry, phosphorylation, proteasome, ubiquitin-proteasome system, ubiquitination*