

УДК 577.123

# Анализ фрагментации основного белка миелина под действием протеасомы

А. В. Бачева<sup>1#</sup>, А. А. Белогуров<sup>2</sup>, Н. А. Пономаренко<sup>2</sup>, В. Д. Кнорре<sup>2</sup>, В. М. Говорун<sup>2</sup>,  
М. В. Серебрякова<sup>3</sup>, А. Г. Габиров<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Химический факультет Московского Государственного Университета имени М. В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>3</sup> Протеомный центр РАМН, НИИ Физико-химической медицины Росздрава РФ

# e-mail: anbach@libro.genebee.msu.ru

**РЕФЕРАТ** Протеасома – это высокомолекулярный белковый комплекс, служащий для направленной деградации белков в эукариотических клетках. Одной из функций протеасом является генерация пептидов, которые затем экспонируются на клеточной мембране с помощью молекул комплексов гистосовместимости как первого, так и второго класса. Есть все основания полагать, что протеасома принимает непосредственное участие в процессе специфической деградации основного белка миелина (ОБМ), составляющего около 30 % всех белков миелиновой оболочки аксонов нейронов. Детали этого механизма остаются невыясненными. В представленной работе изучены особенности специфической деградации ОБМ протеасомой.

Нами было продемонстрировано, что основной белок миелина (не подвергавшийся убиквитинилированию) является хорошим субстратом как для 20S, так и для 26S протеасомы. Впервые были определены сайты протеолиза ОБМ протеасомой из мозга мышей линий Balb/C и SJL и показаны значительные различия в паттерне деградации данного нейроантигена, что может свидетельствовать о лучшей презентации фрагментов основного белка миелина на комплексах гистосовместимости в случае мышей, предрасположенных к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита.

## ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – хроническое нейродегенеративное заболевание аутоиммунной природы – представляет собой острую медико-социальную проблему, поскольку, как правило, поражает лиц молодого и среднего возраста. Проблема лечения РС остается далекой от разрешения, на сегодняшний день существуют лекарственные препараты, способные в некоторой степени замедлить течение РС, но не излечивать от этой патологии. Деградация нервных волокон, происходящая при рассеянном склерозе, протекает вследствие разрушения миелиновой оболочки нейронов. Одной из биохимических характеристик, которая отличает миелин от других биологических мембран, является высокое соотношение липид/белок. Белки составляют от 25 до 30 % массы сухого вещества миелиновой оболочки. Около 30 % всех белков миелина составляют три изоформы т. н. основного белка миелина (ОБМ). ОБМ является одним из основных аутоантигенов при РС. Ранее нами и другими исследователями было показано, что в деградации ОБМ могут принимать участие каталитические антитела [1-5], а также некоторые проте-

азы [6-9]. Известно, что в любой эукариотической клетке существует специализированная органелла для направленной деградации белков – протеасома, представляющая собой высокомолекулярный белковый комплекс. Одной из функций протеасом является генерация пептидов, которые затем экспонируются на клеточной мембране с помощью молекул комплексов гистосовместимости (МНС) как первого, так и второго класса [10]. Есть все основания полагать, что протеасома принимает непосредственное участие в процессе специфической деградации ОБМ. Детали этого механизма остаются невыясненными. В представленной работе нами были изучены особенности специфической деградации ОБМ протеасомой.

Известно, что 20S протеасома (мультикатализический протеиназный комплекс) – это олигомерная высокомолекулярная (700 кДа) протеиназа, которая может быть выделена индивидуально. Данный комплекс также является каталитическим ядром 26S протеасомы, в составе которой присутствуют одна или две регуляторных 19S субъединицы. Было показано, что и 20S и 26S протеасомы способны деградировать ОБМ [11, 12]. Вопрос о сайт-специфичности

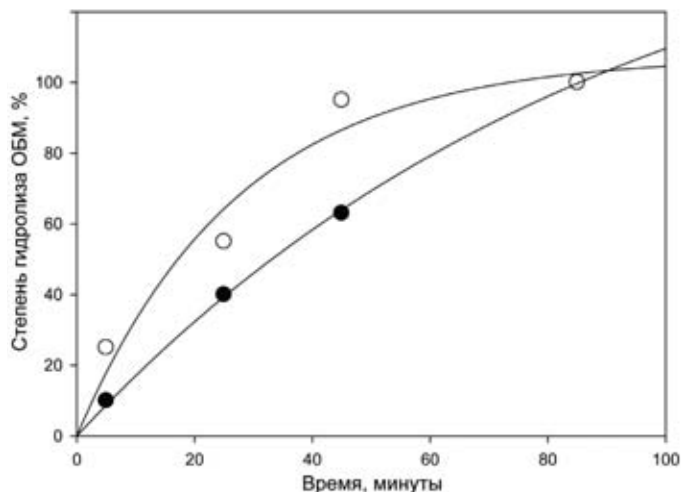


Рис. 1. Зависимость степени гидролиза ОБМ протеасомой от времени. Обозначения: ○ – 20S протеосома, ● – 26S протеосома, выделенные из печени аутобредных мышей

деградации ОБМ протеасомой оставался открытым. Кроме того, известно, что при многих воспалительных патологических процессах протеазный комплекс (конститутивная протеосома) переходит в форму иммунопротеасомы, обладающей альтернативной специфичностью и каталитической эффективностью по отношению к процессингу внутриклеточных белков. Скорее всего, это «переключение» имеет непосредственное отношение к различной презентации антигенов в норме и патологии. Паттерн деградации ОБМ иммунопротеасомой до настоящего времени изучен не был.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Протеосома была выделена и очищена по методу, описанному в [13]. Сначала была исследована деградация ОБМ (изоформа с молекулярной массой 18.5 кДа из мозга быка) полным 26S комплексом и каталитической 20S субъединицей, выделенными из печени аутобредных мышей. Как показано на рис. 1, инкубация ОБМ как с 20S, так и с 26S протеасомой приводила к постепенной деградации ОБМ. Уже через 45 мин 20S протеосома полностью гидролизовала основной белок миелина, в то время как 26S протеасоме на это требовалось 85 мин. Такое различие в скоростях можно отнести к разному количеству протеасомы: в случае 20S протеасомы соотношение фермент/субстрат составило 2.7/1 (по белку, мкг/мкг) или 1/14.5 (моль/моль), а в случае 26S соотношение фермент/субстрат составило 1/1 (по белку, мкг/мкг) или 1/110 (моль/моль). Количество протеасомы оценивали по методу Лоури, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Гидролизаты ОБМ, полученные под действием 20S и 26S комплексов из печени аутобредных мышей, были разделены на фракции методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке C4 (Waters, DeltaPak, 300 Å). Наблюдаются некоторые отличия в профилях элюции, в частности, в некоторых пиках, совпадающих для 20S и 26S протеасом, содержится разное количество вещества, кроме того, при гидролизе 26S протеасомой появляются новые фракции. Таким образом,

паттерн деградации ОБМ 26S протеасомой несколько изменен по сравнению с таковым для 20S протеасомы. Отмеченные различия можно объяснить разной доступностью для протеолиза участков ОБМ, находящихся на поверхности белковой глобулы и в глубине молекулы, а также имеющей выраженную вторичную структуру. Для 26S протеасомы доступность разных участков ОБМ не имеет большого значения, поскольку в составе 19S субчастицы есть субъединицы, отвечающие за денатурацию молекул белка, которые будут подвергнуты деградации.

Пул протеасом неоднороден и состоит из макромолекулярных комплексов нескольких типов, причем каталитические субъединицы могут относиться к т. н. конститутивным ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$ ) или иммунным ( $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  и  $\beta 5i$ ) (рис. 2). Шесть каталитических субъединиц протеасомы обладают тремя типами активности, а именно: химотрипсиноподобной (гидролиз после гидрофобных и ароматических аминокислот Leu, Tyr, Phe), трипсиноподобной (гидролиз после положительно заряженных Lys и Arg) и каспазоподобной (гидролиз после отрицательно заряженных Asp и Glu) [14].

Соотношение конститутивная протеосома/иммунопротеосома имеет ярко выраженную тканеспецифичность и в значительной степени зависит от иммунного статуса организма. Так, например, в головном мозге в норме более 90 % протеасом – конститутивные, а в селезенке около 90-95 % протеасом являются иммунопротеасомами. Кроме того, в любых тканях под действием гамма-интерферона интенсивно нарабатываются иммуносубъединицы, которые встраиваются во вновь собранные мультикаталитические комплексы [15]. Ранее было показано, что замены каталитических субъединиц на иммунные приводят к изменению специфичности гидролиза и увеличению его скорости. Иммунопротеосома практически теряет способность

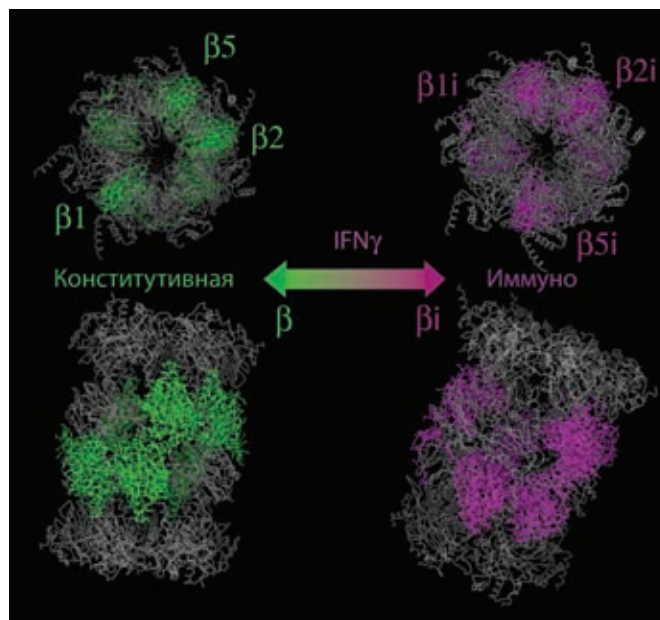
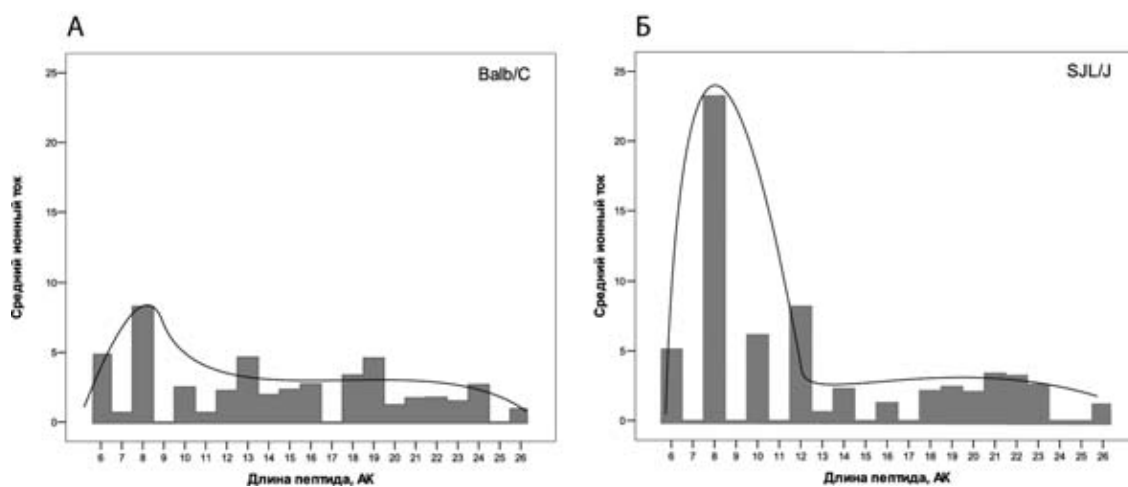


Рис. 2. Равновесие протеосома – иммунопротеосома. Иммунные каталитические субъединицы нарабатываются под действием гамма-интерферона



Рис. 3. Аминокислотная последовательность ОБМ. Стрелками указаны протеолитические пептиды, определенные с помощью хромато-масс-спектрометрии в гидролизатах ОБМ протеасомой из мозга мышей линии SJL/J (верхняя часть рисунка) и Balb/C (нижняя часть рисунка). Толщина стрелок обозначает частоту встречаемости соответствующего пептида. Цветными прямоугольниками выделены иммунодоминантные районы ОБМ

Рис. 4. Распределение по длинам пептидов, обнаруженных в гидролизатах ОБМ пулами протеасом из мозга мышей линии а) Balb/C б) SJL/J. Столбиками на диаграмме представлены экспериментальные значения ионного тока для пептидов данной длины, полученные методом LC-MS масс-спектрометрии



гидролизовать пептидные связи после остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот (каспазоподобная активность), зато значительно чаще происходит гидролиз после гидрофобных и особенно разветвленных гидрофобных аминокислотных остатков. Таким образом, под действием иммунопротеасомы получается большее количество пептидов, несущих гидрофобные аминокислоты на С-конце. Поскольку С-концевые гидрофобные аминокислоты являются важными якорными фрагментами для связывания с молекулами I класса главного комплекса гистосовместимости, следовательно, изменение в специфичности гидролиза приводит к увеличению выработки пептидов, образующих комплексы с молекулами МНС. Фрагменты, связанные с молекулами МНС, презентуются на внешней мембране клеткам иммунной системы. Таким образом, клетки, содержащие иммунопротеасому, будут более эффективно презентировать свои антигены.

Кроме того, известно, что альфа-субъединицы каталитической 20S субчастицы протеасомы действуют как ворота, формируя аксиальный канал, регулирующий вход и выход белков и продуктов их деградации. Закрытие канала может, таким образом, способствовать более полной деградации субстратов, поскольку препятствует выходу

частично гидролизованных полипептидов [16]. Было также продемонстрировано [17], что открывание канала сильно влияет на кинетику протеолиза и распределение по длине гидролитических фрагментов, полученных *in vitro*. Если канал открыт, то скорость гидролиза увеличивается, но при этом средняя длина получающихся фрагментов также увеличивается на 40%. Таким образом, более высокая скорость работы иммунопротеасомы должна приводить к более длинным пептидам – продуктам деградации, которые будут лучше связываться с молекулами МНС и, следовательно, более эффективно представляться на поверхности клетки.

Известно, что мыши линии SJL генетически предрасположены к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита. Данная патология является животной моделью рассеянного склероза. С помощью иммуноблоттинга мы изучили состав пула протеасом в головном мозге мышей этой линии и показали, что содержание иммунопротеасом повышено по сравнению с мышами линии Balb/C (данные не приведены). Поэтому на следующем этапе из мозга мышей линии Balb/C и линии SJL была выделена 26S протеасома и изучен протеолиз ОБМ этими образцами протеасом.

Гидролизаты ОБМ, полученные под действием протеасом,

выделенных из мозга мышей этих двух линий, были исследованы методом LC-MS (высокоэффективная жидкостная хроматография с детекцией методом масс-спектрометрии). На рис. 3 приведена последовательность основного белка миелина с указанием мажорных фрагментов, продуцируемых пулами протеасом из разных источников. Толщина соответствующих стрелок демонстрирует относительное количество пептида в гидролизате при анализе.

В аминокислотной последовательности ОБМ выделяют следующие области, соответствующие иммунодоминантным районам белка: 12-31, 82-98, 110-128 и 144-169, причем фрагмент 85-98 представляет собой т.н. энцефалитогенный эпитоп.

Необходимо отметить, что деградация ОБМ протеасомой из печени аутобредных мышей, как полным комплексом, так и каталитической частью, не приводила к выщеплению иммуногенных пептидов, все они подвергались дальнейшей фрагментации внутри каталитической камеры протеасомы.

В гидролизате ОБМ протеасомой из мозга мышей обеих линий практически единственным сайтом гидролиза, где протеасома проявляла свою каспазоподобную активность, была связь между аминокислотными остатками Asp81-Glu82, близкая к началу энцефалитогенного пептида.

Характер гидролиза ОБМ протеасомами, выделенными из головного мозга мышей линии SJL и Balb/C, был различен. У мышей аутоиммунной линии генерируемые эпитопы существенно лучше колокализуются с иммунодоминантными фрагментами белка. При действии данного пула на ОБМ содержание фрагмента энцефалитогенного пептида составляет до четверти всех получаемых фрагментов гидролиза. У мышей стандартной линии Balb/C – в два раза меньше. Кроме того, полученные фрагменты существенно хуже соотносятся с областями узнавания комплексов гистосовместимости второго класса.

На рис. 4 представлено распределение по длинам пептидов в соответствующих гидролизатах. По оси ординат представлены экспериментальные значения ионного тока для пептидов данной длины, полученные методом LC-MS. Из рисунка видно, что максимум распределения приходится на пептиды длиной 8 аминокислот в случае протеасом из головного мозга мышей как линии SJL, так и Balb/C. Однако относительное значение среднего ионного тока в мак-

симуме сильно различается, что свидетельствует о существенно большем количестве фрагментов данной длины в случае мышей аутоиммунной линии. В гидролизатах преобладают пептиды с четным числом аминокислотных остатков, ни в одном из них не было обнаружено пептидов короче четырех аминокислотных остатков. Эти данные согласуются с описанными в литературе [18], а также с тем, что одной из главных ролей протеасомы в клетке является генерация пептидов для последующей презентации на молекулах МНС I класса, на которые могут загружаться пептиды длиной до 10 аминокислотных остатков. Присутствующие в гидролизатах более длинные пептиды могут затем расщепляться до фрагментов меньшей длины и представляться на молекулах МНС I класса, а также участвовать в презентации на молекулах МНС II класса [10].

## ВЫВОДЫ

Таким образом, в настоящей работе показано, что 20S и 26S протеасомы способны гидролизовать основной белок миелина, при этом молярное соотношение протеасома/ОБМ составило 1/14.5 для 20S и 1/110 для 26S, время полного гидролиза 45 мин и 85 мин соответственно. После разделения гидролизатов методом LC-MS массы фрагментов были определены методом MALDI-масс-спектрометрии, и, после анализа аминокислотной последовательности ОБМ, идентифицированы сайты протеолиза.

Нами было продемонстрировано, что основной белок миелина (не подвергавшийся убиквитинилированию) является хорошим субстратом как для 20S, так и для 26S протеасомы. Впервые были определены сайты протеолиза ОБМ протеасомой из мозга мышей линий Balb/C и SJL и показаны значительные различия в паттерне деградации данного нейроантигена, что может свидетельствовать о лучшей презентации фрагментов основного белка миелина на комплексах гистосовместимости в случае мышей, предрасположенных к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита. ●

*Работа была поддержана грантами РФФИ 07-04-12100-офи, 09-04-01546-а, 07-04-92168-НЦНИ а, NATO SFPP 982833 и программой президиума РАН фундаментальные науки – медицине 2008 г.*

## Список литературы

1. Ponomarenko, N.A., Durova, O.M., Vorobiev, I.I., Aleksandrova, E.A., Telegin, G.B., Chamborant, O.A., Sidorik, L.L., Suchkov, S.V., Alekberova, Z.S., Gnuchev, N.V., Gabibov, A.G. // J. Immunol. Methods, 2002. V. 269, P. 197–211.
2. Ponomarenko, N. A., Durova, O. M., Vorobiev, I. I., Belogurov, A. A., Telegin, G. B., Suchkov, S. V., Kiselev, S. L., Lagarkova, M. A., Govorun, V. M., Serebryakova, M. V., Gabibov, A. G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006. V. 103, P. 281–286.
3. Belogurov, A.A. Jr., Kurkova, I.N., Friboulet, A., Thomas, D., Misikov, V.K., Zakharova, M.Y., Suchkov, S.V., Kotov, S.V., Alehin, A.I., Avalle, B., Souslova, E.A., Morse, H.C. 3rd., Gabibov, A.G., Ponomarenko, N.A. // J. Immunol., 2008. V. 180, P. 1258–1267.
4. Polosukhina, D. I., Kanyshkova, T. G., Doronin, B. M., Tyshkevich, O. B., Buneva, V. N., Boiko, A. N., Gusev E. I., Nevinsky, G. A., Favorova, O. O. // Immunol Lett., 2006. V. 103, P. 75–81.
5. Белогуров, А. А., Куркова, И. Н., Мисиков, В. К., Сучков, С. В., Телегин, Г. Б., Алехин, А. И., Гончаров, Н. Г., Кнорре, В. Д., Габибов, А. Г., Пономаренко, Н. А. // Доклады Академии Наук, 2007. Т. 413, С. 408–411.
6. Pritzker, L. B., Joshi, S., Gowan, J. J., Harauz, G., Moscarello, M. A. // Biochemistry, 2000. V. 39, P. 5374–5381.
7. Schaecher, K. E., Shields, D. C., Banik, N. L. // Neurochemical Research, 2001. V. 26, P. 731–737.

8. Medveczky, P., Antal, J., Patthy, A., Kékesi, K., Juhász, G., Szilágyi, L., Gráf, L. // FEBS Lett. 2006. V. 580, P. 545–552.
9. D'Souza, C. A., Moscarello, M. A. // Neurochem Res, 2006. V. 31, P. 1045–1054.
10. Tewari, M. K., Sinnthamby, G., Rajagopal, D., Eisenlohr L. C., // Nature Imm, 2005. V. 6, N. 3, P. 287–294.
11. Lucas, J., Lobo, D., Terry, E., Hogan, E. L., Banik N. L. // Neurochem. Res., 1992. V. 17, P. 1261–1266.
12. Akaishi, T., Shiomi, T., Sawada, H., Yokosawa, H. // Brain Research, 1996. V. 722, P. 139–144.
13. Абрамова, Е. Б., Астахова, Т. М., Ерохов, П. А., Шарова, Н. П. // Известия РАН, серия биологическая, 2004. Т. 2, С. 150–156.
14. Orłowski, M., Cardozo, C., Michaud, C. // Biochemistry, 1993. V. 32, P. 1563–1572.
15. Namiki, S., Nakamura, T., Oshima, S., Yamazaki, M., Sekine, Y., Tsuchiya, K., Okamoto, R., Kanai, T., Watanabe, M. // FEBS Lett, 2005. V. 579, P. 2781–2787.
16. Kisselev, A. F., Kaganovich, D., Goldberg, A. L. // J. Biol. Chem., 2002. V. 277, P. 22260–22270.
17. Kohler, A., Cascio, P., Leggett, D. S., Woo, K. M., Goldberg, A. L., Finley, D. // Mol. Cell., 2001. V. 7, P. 1143–1152.
18. Mishto, M., Luciani, F., Holzhütter, H.G., Bellavista, E., Santoro, A., Textoris-Taube, K., Franceschi, C., Kloetzel, P.M., Zaikin, A. // J. Biol. Chem., 2008. V. 377, P. 1607–1617.