

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОЧИСТКИ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ 26S ПРОТЕАСОМ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС

© И. Н. Евтеева,^{1,*} Т. Ю. Старкова,¹ А. В. Артемов,¹
Ю. Я. Зайкова,¹ Н. А. Барлев^{1—3,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ² С.-Петербургский технологический университет
и ³ Университет Лейстера, Великобритания;
* электронный адрес: evtin@mail.cytspb.rssi.ru, nick.a.barlev@gmail.com

Протеасома является мультисубъединичным белковым комплексом, состоящим из каталитической (20S) и регуляторной (19S) частиц. Наиболее изученной функцией протеасом является специфический протеолиз белков. Известные в настоящее время способы выделения протеасом весьма разнообразны. Важным этапом выделения протеасом является концентрирование материала для последующего изучения его биохимических функций. В настоящей работе мы показываем, что субъединичный состав 26S протеасом, сконцентрированных различными способами на последнем этапе их выделения, является фактически одинаковым. Однако способ концентрирования по-разному влияет на функциональную активность этих высокомолекулярных комплексов.

Ключевые слова: протеасома, протеасомные субъединицы, 2D-электрофорез, пептидазная активность, микроконцентрирование, полиэтиленгликоль.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ДТТ — дитиотрейтол, ПААГ — полиакриламидный гель, ПЭГ — полиэтиленгликоль, FLAG — дополнительный эпипот (последовательность октапептида, который вводят в рекомбинантный белок с применением ДНК-технологии), GST — глутатион-S-трансфераза, ТЕМЕД — N,N,N,N — тетраметилэтилендиамин.

Протеасомы 26S и 20S являются большими мультисубъединичными белковыми комплексами, осуществляющими специфическую деградацию белков. Протеолиз белков с участием протеасом проходит по убиквитинизированному и независимому механизмам. Ингибиция протеасом или их дисфункция является причиной серьезных нарушений в клетке. Как ключевой энзим внутриклеточного белкового метаболизма 26S протеасома принимает участие в таких процессах, как процеслинг и презентация антигенов, контроль количества вновь синтезированных белков, деградация развернутых гликопротеинов в эндоплазматическом ретикулуме, контроль за процессами клеточного цикла и апоптоза.

Протеасома 26S состоит из 20S коровой частицы и 19S-регулятора. 20S протеасома представляет собой структуру цилиндрической формы, состоящую из 4 гептамерных колец в стэкинг-ориентации. Внешние кольца образованы субъединицами α -типа, внутренние — субъединицами β -типа. Протеолитические центры расположены на внутренней поверхности этой структуры. 20S протеасома имеет 3 различные протеолитические активности по отношению к пептидным связям — химотрипсиноподобную, трипсиноподобную и каспазоподобную. Эти ферментативные центры локализованы на субъединицах β -5, β -2 и β -1 соответственно.

Наличие такого ансамбля протеолитических активностей у протеасом несет определенный физиологический смысл, ибо, действуя все вместе (сочетанно), они способ-

ны гидролизовать практически любой белок, доставленный в протеолитическую камеру.

В доступе субстрата во внутреннюю часть 20S протеасомы принимают участие субъединицы α -типа, которые также ответственны за присоединение регуляторных комплексов (Tanaka, Tsurumi, 1997; Qiu et al., 2006).

Помимо протеолитической у 20S протеасомы была обнаружена РНКазная и геликазная активности (Petit et al., 1997; Моисеева и др., 2010; Kulichkova et al., 2010).

Как было показано (Petit et al., 1997a, 1997b), центры РНКазной активности локализованы на субъединицах α -типа, α -5(zeta) и α -1(jota). Наличие дополнительных ферментативных активностей у протеасом может свидетельствовать о том, что спектр их функциональных возможностей не ограничивается только протеолизом, а представлен гораздо шире.

По современным представлениям, 26S и 20S протеасомы присутствуют во всех типах клеток и тканей (Абрамова и др., 2002, 2003). Они встречаются в ядре и цитоплазме; показана их связь с актиновыми структурами цитоскелета (Галкин и др., 1998), мембранными эндоплазматического ретикулума (Bardag-Gorce et al., 2011), с компонентами крупного белкового комплекса — трансласомами (Sha et al., 2009).

Протеасомы присутствуют и во внеклеточном пространстве — в альвеолярной и фолликулярной жидкостях — и, кроме того, как было показано в нашей лаборатории, выделяются в среду при культивировании некото-

рых клеточных линий (Куличкова и др., 2008; Зайкова и др., 2011). Способы получения и очистки 26S и 20S протеасом из тканей и клеток весьма разнообразны и часто продиктованы задачами, которые стоят перед исследователем.

В работах, выполненных в 1990-е годы, для выделения протеасом из постмитохондриальной фракции использовали такие носители, как биогель A-15, сепароза 6B, использовали и ионообменную хроматографию (Petit et al., 1997a, 1997b; Галкин и др., 1998; Абрамова и др., 2004). С течением времени в процедуре выделения протеасом произошли некоторые изменения. Использование хроматографии высокого давления (FPLC), колоночной хроматографии на Mono Q и сепарозе 6 позволило выделить 20S протеасому с сохранением ее функциональных свойств и структурной целостности (Ballut et al., 2003).

Одна из недавних работ японских авторов посвящена поиску новых белковых ингибиторов естественного (природного) происхождения для блокады 20S протеасомы. Для решения своих задач авторы описали сложный и многостадийный процесс получения 20S протеасомы из печени свиньи (Yabe, Koide, 2009). Сочетание методов скоростного центрифугирования, диализа и некоторых видов хроматографии (с использованием DEAE-сепарозы, SP-сепарозы, колонки Poross-H3 и др.) позволило получить 20S протеасомы с высокой степенью чистоты и в достаточном количестве.

В другой работе по изучению взаимодействия дельта-аминолевулиновой дегидратазы с 20S протеасомой процедура выделения последней была выполнена с серией этапов хроматографической очистки через сепарозу Q (Fast Flow), Mono Q-HR5/5 и гель-фильтрации через сепарозу 6. Протеасомы 26S выделяли из цитоплазматической фракции, осаждая белки и проводя длительное ультрацентрифугирование в градиенте концентрации глицерина (Bardag-Gorce et al., 2011).

Использование традиционных методов хроматографической очистки в сочетании с современными методами протеомного анализа и масс-спектрометрии (в частности, с ICAT-технологией, в основе которой лежат изотопно меченные аффинные мишени) позволило группе авторов детально изучить белковые профили 20S протеасом из печени крыс, а также различные субтипы этих комплексов (Schmid et al., 2006). Параллельно исследованиям по изучению структурного разнообразия субъединиц протеасом, обусловленного посттрансляционными модификациями, в последние годы появился интерес к изучению белков, ассоциированных с протеасомами и вносящих вклад в работу убиквитин-протеасомной системы (Mittenberg et al., 2008; Fedorova et al., 2011). Так, было показано (Bardag-Gorce et al., 2011), что дельта-аминолевулиновая дегидратаза соочищается с 20S протеасомой в процессе хроматографической очистки. Авторы показали, что этот фермент, принимающий участие в биосинтезе гема, взаимодействует с 20S протеасомой и оказывает влияние на пептидазную активность в условиях *in vitro* дозозависимым образом. Существуют и другие белки, которые взаимодействуют с протеасомами либо менее сильно, либо временно (транзиторно) (Qiu et al., 2006).

Развитие более мягких и специфичных методов выделения этих высокомолекулярных комплексов для выявления таких белков, к числу которых относятся важные кофакторы, регуляторы белковой деградации и даже новые субъединицы протеасом, актуально в настоящее время.

Одним из таких методов является аффинная хроматография, сочетающаяся с генноинженерными подходами (Wang et al., 2007). В основе аффинной хроматографии лежит взаимодействие между молекулами, закрепленными на матрице (в неподвижной фазе), и комплементарными к ним молекулами, подлежащими очистке или фракционированию. Биоспецифичность взаимодействия отличается избирательностью и высокой степенью сродства между партнерами (Остерман, 1985).

Применительно к очистке 26S протеасом этот принцип используется следующим образом. С помощью генно-инженерных конструкций (экспрессионных векторов, несущих последовательности отдельных протеасомных субъединиц, слитых либо с последовательностью протеина A, либо с FLAG- последовательностью, либо с последовательностью белка GST) проводят трансфекцию соответствующей клеточной линии. Далее аффинно-меченные протеасомы можно очистить с помощью иммуноглобулинов (IgG), закрепленных на бусинках, либо с помощью иммобилизованных на бусинках антител к протеину A или к продукту FLAG-последовательности. Так как в экспрессионный вектор между двумя белками дополнительно вводится сайт для Tev-протеазы, это позволяет отделить очищенные аффинным способом 26S протеасомы от твердой фазы (бусинок) простой инкубацией последних в буфере с Tev-протеазой. Выделенные таким образом протеасомы можно анализировать нативным электрофорезом, электрофорезом по Лэммли (Laemmli, 1970), а также изучать их пептидазную активность.

Как показано в ряде работ (Qiu et al., 2006; Wang et al., 2007; Fedorova et al., 2011; Livinskaya et al., 2012), метод аффинной хроматографии подчас не уступает традиционной процедуре выделения протеасом, а иногда обладает и некоторыми преимуществами. Резюмируя, подчеркнем, что выбор условий и метода выделения протеасом должен быть нацелен на сохранность этих макромолекулярных комплексов в интактном состоянии.

В нашей лаборатории для выделения 26S протеасом из клеток и тканей уже несколько лет используют метод, сочетающий в себе ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы и ионообменную хроматографию на DE—52 целлюлозе. Метод подробно описан в работе Галкина с сотрудниками (1998). Методом одномерного гель-электрофореза авторы отчетливо показали характерный профиль белков 26S протеасомы, который элюировали с колонки. Заметим, что в собранных таким образом фракциях 26S протеасома находится в крайне низкой концентрации (приблизительно 50—60 нг/мкл), которая не отвечает требованиям аналитических процедур в последующих исследованиях.

Задача настоящей работы заключалась в том, чтобы сконцентрировать полученные 26S протеасомы тремя независимыми способами, оценить их субъединичный состав, функциональное состояние и сравнить полученные результаты. В первом случае мы использовали этанол как традиционный преципитирующий агент, широко применяемый при осаждении белков (Березов и др., 1976), во втором — сконцентрировали 26S протеасомы с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) с мол. массой 6000 Да. Это вещество широко применяется при осаждении вирусов, и мы предположили, что оно окажется способным преципитировать и другие макромолекулярные комплексы, включая 26S протеасомы (Мейхи, 1988). В третьем случае мы использовали для концентрирования 26S про-

теасом центрифужные ультрафильтры (Amicon Ultra < 10 kDa, Millipore), которые технологически позволяют отфильтровать крупные белковые частицы.

Сравнительный анализ сконцентрированных этими способами 26S протеасом проводили с помощью 1D- и 2D-электрофореза с использованием аппарата Dual Gel Module. Функциональное состояние комплексов оценивали по их пептидазной активности по химотрипсину, трипсину и каспазоподобному типам по отношению к флуорогенным пептидам (Barret, 1980).

Материал и методика

Для работы использовали следующие реактивы: акриламид, бисакриламид, мочевина, Тритон X-100, амфолины с диапазоном pH 3.5—10.0, персульфат аммония, ТЕМЕД, Трис, глицин, додецил-сульфат натрия, β-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий, NaOH, уксусная кислота, глицерин, ДТТ, коктейль ингибиторов протеаз. Реактивы были от фирмы ICN (США) или отечественного производства квалификации х. ч.

26S протеасомный комплекс получали из ткани печени крыс-самцов линии Wistar массой до 150 г по описанному методу (Галкин и др., 1998), за исключением того, что на этапе приготовления гомогената в реакционную смесь дополнительно вводили ингибиторы протеаз согласно инструкции (Complete ULTRA Tablets, Roche).

Концентрирование 26S протеасом. Протеасомы выделяли из цитоплазматической фракции. Концентрирование пульта 26S протеасом после ионообменной хроматографии на DE-52 целлюлозе проводили тремя способами, используя этианол, ПЭГ 6000 и центрифужные ультрафильтры (Amicon Ultra < 10 kDa). При концентрировании этанолом фракции белка, элюированные с колонки и содержащие 26S протеасому, объединяли, разделяли на аликвоты и концентрировали белки добавлением 6 объемов охлажденного спирта. Пробы хранили при -20 °C. При концентрировании с помощью ПЭГ 6000 к объединенным фракциям (пульту) 26S протеасом добавляли сухой измельченный ПЭГ 6000 до концентрации 7% и NaCl до конечной концентрации 0.5 М. Пробу осторожно перемешивали на холода до полного растворения ПЭГ 6000 в течение 40—50 мин и оставляли на ночь при температуре 4 °C для формирования осадка. При концентрировании с использованием центрифужных ультрафильтров фракции, содержащие 26S протеасомы, объединяли, измеряли начальный объем и проводили последовательное центрифугирование, добавляя материал небольшими аликвотами по 300—400 мкл. Режим центрифугирования был следующим: 4 °C, 12 мин, 12 000 об/мин. Сконцентрированный в 7—8 раз раствор 26S протеасом разделяли на небольшие аликвоты, замораживали и хранили при -70 °C.

Одномерный электрофорез. Одномерный гель-электрофорез проводили в 12%-ном ПААГ в стандартной системе Лэммли (Laemmli, 1970).

Двухмерный (2D) электрофорез проводили по описанному методу (O'Farrell, 1975) с использованием оборудования Dual Gel Module. Первое направление (изофокусирование) проводили с использованием амфолинов с диапазоном pH 3.5—10.0. Разделение белков во втором направлении проводили в 12%-ном ПААГ по стандартному протоколу Лэммли (Laemmli, 1970).

Визуализация (окрашивание) гелей. После разделения белков по окончании гель-электрофореза гели фиксировали в 40%-ном (по объему) растворе этанола и 10%-ной (по объему) уксусной кислоте в течение ночи, окрашивали раствором Кумасси G-250 и отмывали 7%-ной уксусной кислотой.

Пептидазную активность 26S протеасом определяли по гидролизу флуорогенного пептида Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Ac-Arg-Leu-Arg-AMC или Z-Leu-Leu-Glu-AMC (Enzo LS, США) для химотрипсиноподобной, трипсиноподобной или каспазоподобной активности соответственно. Реакционная смесь содержала 10 нмоль пептида на 1 мкг 26S протеасом. Реакционный буферный раствор для выявления химотрипсино- и трипсиноподобной активности содержал 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 5 мМ MgCl₂, 40 мМ KCl, 1 мМ ДТТ и 0.5 мМ АТФ. Для выявления каспазоподобной активности использовали тот же раствор, но содержащий буфер НЕ-PES, pH 7.5. Реакцию проводили при 37 °C в течение 45 мин, останавливали добавлением равного объема буфера, содержащего 70 мМ уксусной кислоты, 100 мМ хлорацетата натрия и 30 мМ ацетата натрия. Концентрацию полученного продукта 7-амино-4-метил-кумарина определяли на флуориметре при длинах волн возбуждения и регистрации 365 и 440 нм соответственно (Barget, 1980).

Результаты

В настоящей работе мы сосредоточили наше внимание на способах концентрирования 26S протеасом, элюированных с колонки DE-52, и на оценке их функционального состояния. Последовательность основных этапов выделения, очистки и концентрирования 26S протеасом схематически представлена на рис. 1.

Этап концентрирования в процессе выделения 26S протеасом является принципиальным. Во-первых, он позволяет сохранять выделенные препараты в течение длительного времени. Во-вторых, для проведения аналитических работ по изучению структурных особенностей белков обычно требуются образцы с более высокой концентрацией белка. В-третьих, желательно иметь такой способ концентрирования 26S протеасом, чтобы они сохранили не только структурное разнообразие субъединичного состава, но и функциональные свойства интактных комплексов.

Пул 26S протеасом концентрировали с помощью этианола, ПЭГ 6000 и центрифужных ультрафильтров Amicon Ultra < 10 kDa. Анализ сконцентрированных 26S протеасом проводили с помощью одномерного и двухмерного электрофореза (Laemmli, 1970; O'Farrell, 1975). На рис. 2 представлены результаты одномерного электрофореза выделенных и сконцентрированных разными способами 26S протеасом из печени крыс. Видно, что все три способа концентрирования 26S протеасом дают одинаковый результат. В области 20S протеасомы (мол. масса 20—30 кДа) наблюдается характерная картина из 8 полос. Эти данные могут свидетельствовать о том, что все три способа концентрирования 26S протеасом при их выделении являются адекватными.

На рис. 3, а—в представлены электрофорограммы 2D-электрофореза 26S протеасом, выделенных и сконцентрированных таким же образом. Сравнение этих трех экспериментов может свидетельствовать о том, что про-

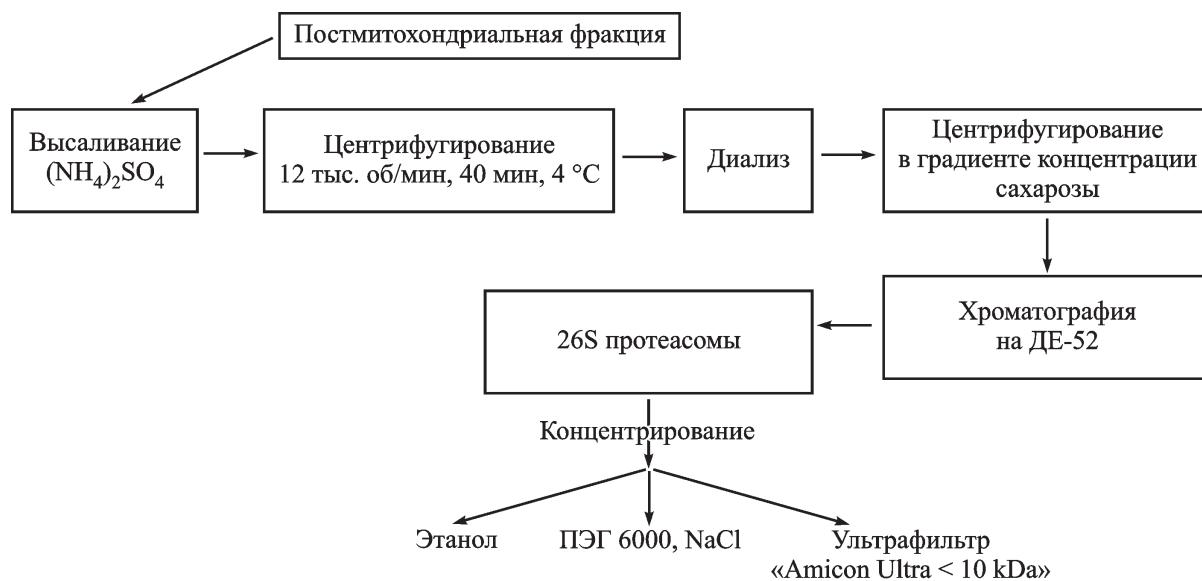


Рис. 1. Основные этапы очистки и концентрирования протеасом.

фили белковых субъединиц 26S протеасом, сконцентрированных разными способами, практически совпадают (по многим позициям). Это особенно справедливо для области 20S протеасом, которая характеризуется меньшей представленностью белковых субъединиц по сравнению с областью 19S.

Как и в случае с 1D-электрофорезом, эти данные дают дополнительное основание утверждать, что все три способа концентрирования 26S протеасом являются при-

емлемыми для изучения структурного разнообразия популяции 26S протеасом.

Для характеристики функционального состояния 26S протеасом определяли их пептидазные активности по отношению к трем флуорогенным пептидам. Анализировали 26S протеасомы, сконцентрированные с помощью этанола и центрифужных ультрафильтров, а также пул 26S протеасом, элюированных с DE-52 колонки и замороженных при (20 °C). Протеасомы, сконцентрированные с помощью ПЭГ 6000, не исследовали, в силу того что этот способ концентрирования белковых комплексов требует незамедлительного проведения аналитической процедуры. В силу ряда объективных причин выполнить это условие было нельзя.

На рис. 4 представлены результаты исследования протеолитических активностей по трем типам 26S протеасом, сконцентрированных с помощью центрифужного ультрафильтра Amicon Ultra < 10 kDa и этанола (*столбцы II* и *III* соответственно), а также 26S протеасом, элюированных с колонки DE-52 (*столбец I*). В качестве первого контроля (*столбец K1*) использовали буферный раствор, содержащий только соответствующий флуорогенный пептид. В качестве второго (дополнительного) контроля (*столбец K2*) — буферный раствор, содержащий еще и бычий сывороточный альбумин (БСА) в количестве 2.5 мкг на пробу. Мы сочли возможным использовать этот препарат как неспецифический белковый контроль по аналогии с описанными исследованиями (Bardag-Gorce et al., 2011).

Как видно на рис. 4, все три типа пептидазной активности в основном достигают своих максимальных значений у препаратов 26S протеасом, элюированных непосредственно с колонки DE-52. Особенно наглядно это проявляется для химотрипсиноподобной и каспазоподобной активностей (*столбец I*). При концентрировании 26S протеасом с помощью центрифужного ультрафильтра значения их пептидазных активностей занимают промежуточное положение (*столбец II*). Значения трипсиноподобной активности 26S протеасом, элюированных с колонки DE-52 и сконцентрированных с помощью центрифужного ультрафильтра (*столбцы I* и *II*), приблизительно

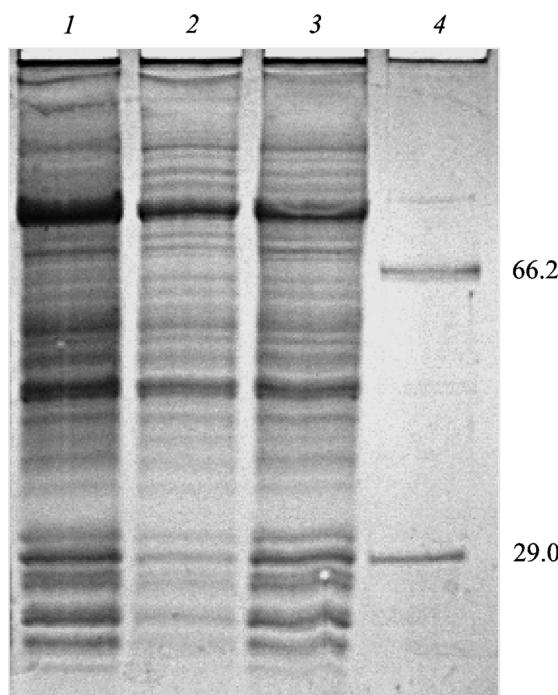


Рис. 2. Электрофорограммы одномерного электрофореза 26S протеасом, сконцентрированных с помощью этанола (дорожка 1), ПЭГ 6000 (дорожка 2) и центрифужного ультрафильтра Amicon Ultra (дорожка 3). Дорожка 4 — маркеры молекулярной массы (БСА и карбоангидраза); на дорожки 1, 3 нанесено по 15 мкг белка, на дорожку 2 — 8 мкг.

Дорожка 4 — маркеры молекулярной массы (БСА и карбоангидраза); на дорожки 1, 3 нанесено по 15 мкг белка, на дорожку 2 — 8 мкг.

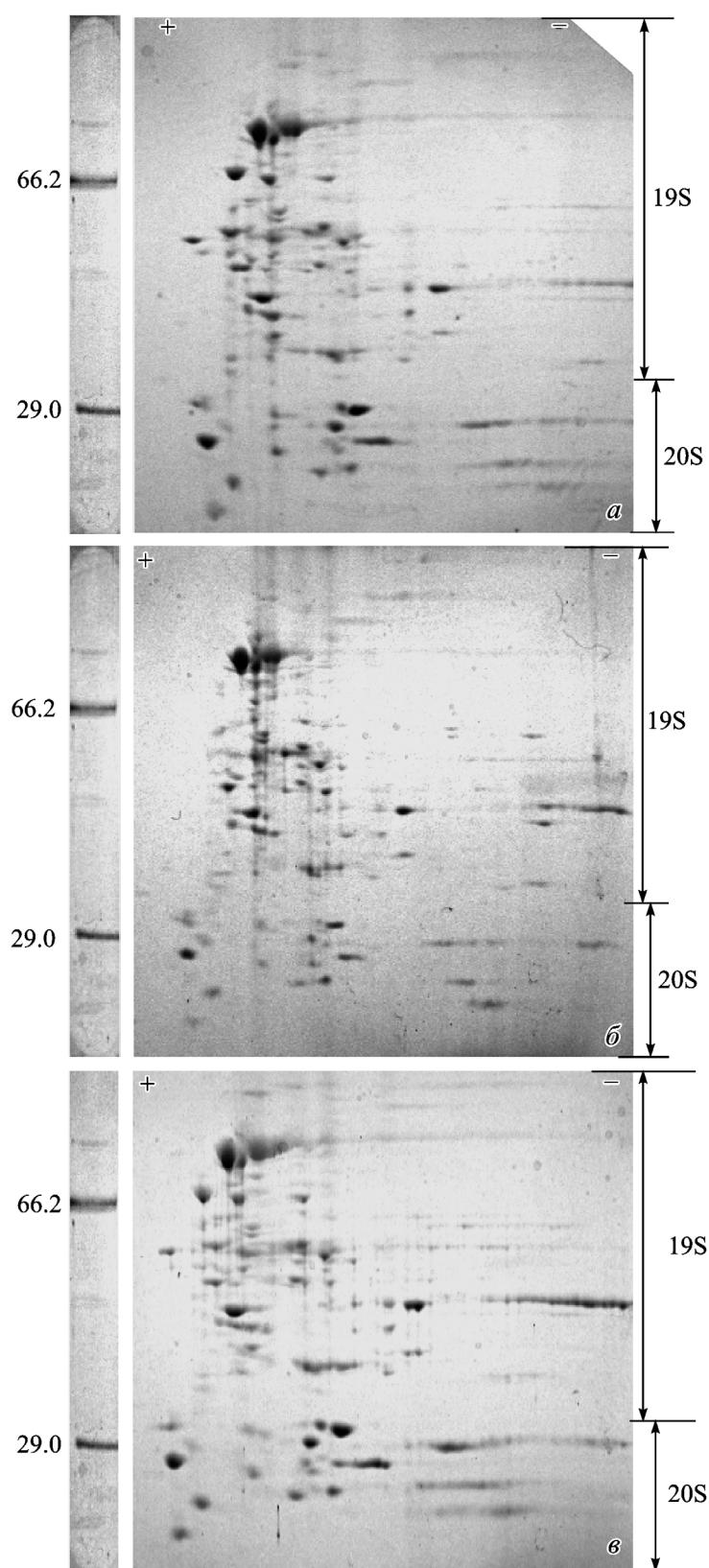


Рис. 3. Результаты двухмерного электрофореза 26S протеасом из печени крыс, сконцентрированных с помощью этанола (а), ПЭГ 6000 (б) и центрифужного ультрафильтра Amicon Ultra (в).

Числа по вертикали — молекулярная масса белка. Нанесено 40 (а, в) и 35 (б) мкг белка.

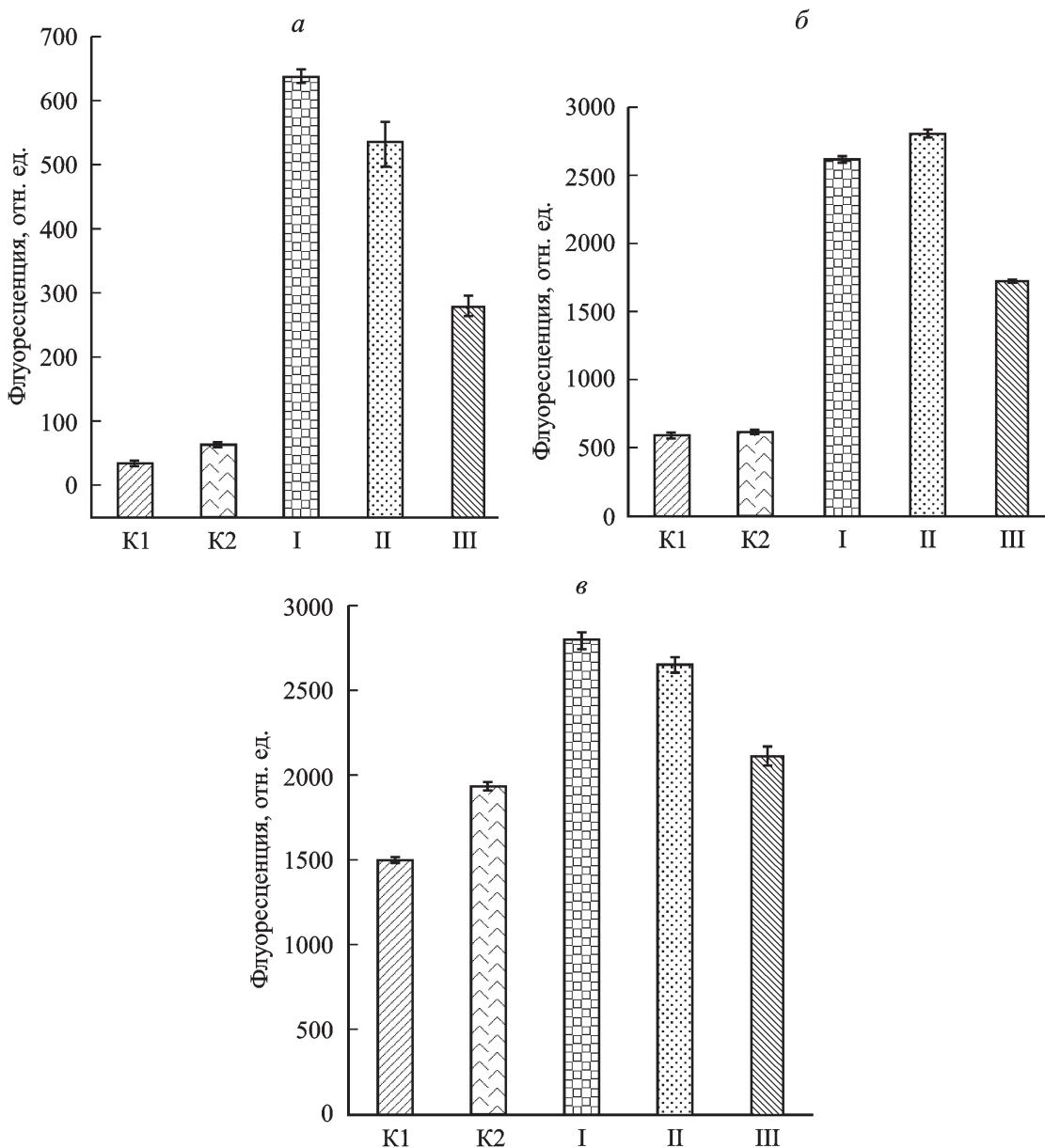


Рис. 4. Химотрипсиноподобная (а), трипсиноподобная (б) и каспазоподобная (в) активность 26S протеасом из цитоплазмы печени крыс, сконцентрированных разными способами.

По вертикали — флуоресценция, отн. ед. Столбцы: K1 и K2 — контроли, I—III — 26S протеасомы, элюированные с колонки DE-52, сконцентрированные с помощью центрифужного ультрафильтра Amicon Ultra или с помощью этанола соответственно. Активность определяли по гидролизу соответствующего флуорогенного пептида; столбцы I—III отражают средние значения и стандартные отклонения интенсивности флуоресценции освобожденного продукта реакции (7-амино-4-метил-кумарина) из двух независимых экспериментов.

одинаковы (наблюдаемая разница лежит в пределах ошибки). При концентрировании 26S протеасом с помощью этанола значения пептидазной активности каждого типа были самыми низкими. Отметим, что количество 26S протеасом, внесенных в экспериментальные образцы, было везде строго одинаково (по 0.625—0.650 мкг протеасом); количество флуорогенного пептида в каждой пробе, включая контроли, составляло 6.25 нмоль.

Таким образом, полученные предварительные данные по определению пептидазной активности трех типов у 26S протеасом позволили проследить определенную закономерность, которая проявляется на этапе концентрирования этих высокомолекулярных комплексов, а именно: наибольшей функциональной активностью обладает пул 26S протеасом, непосредственно элюированных с ко-

лонки DE-52. Введение дополнительных процедур с целью концентрирования высокомолекулярных комплексов приводит к определенному снижению их функционального статуса. Как следует из данных эксперимента, чем более жестким является способ концентрирования 26S протеасом, тем больше это сказывается на их ферментативных свойствах (рис. 4, столбец III).

Обсуждение

26S и 20S протеасомы являются мультисубъединичными белковыми комплексами, ответственными за ubiquitin-зависимый протеолиз определенных белков и обладающими рядом других ферментативных активностей

(Jarrousse et al., 1999; Gautier-Bert et al., 2003; Моисеева и др., 2010). При этом протеасомы могут осуществлять убиквитин-независимый протеолиз белков, например членов семейства онкосупрессоров p53 (Asher et al., 2005; Barlev et al., 2010).

По мнению Маталина с коллегами (2012), многие клеточные процессы требуют согласованного действия нескольких ферментов. Нередко эти ферменты объединены в крупные белковые комплексы, что делает их работу более эффективной, согласованной и увеличивает специфичность и скорость реакций (Шаталкин, 2004; Маталин и др., 2012). Однако изучение крупных белковых комплексов сопряжено с определенными трудностями. В первую очередь это касается поиска адекватных способов выделения этих мультимолекулярных ансамблей. Цель такого поиска — максимально сохранить физико-химические особенности нативной структуры и ее функциональноактивное состояние.

В настоящей работе мы поставили перед собой задачу выделить 26S протеасомы из печени крыс, провести сравнительный анализ их концентрирования с помощью различных приемов и оценить функциональное состояние этих комплексов по их пептидазной активности. Концентрирование белков вообще и высокомолекулярных комплексов в частности преследует обычно две цели — повысить концентрацию белка приблизительно на порядок и одновременно избавиться от нежелательных контаминирующих субстанций (солей, ионных детергентов, остатков нукleinовых кислот, полисахаридов, липидов и пр.) (Dignam, 1990; Rabilloud, 1996). Для концентрирования 26S протеасом мы использовали два вещества — этанол и ПЭГ 6000 — и центрифужный ультрафильтр Amicon Ultra < 10 kDa. Результаты в целом свидетельствуют о пригодности данных подходов для концентрирования 26S протеасом (электрофореграммы на рис. 3). Но есть некоторые особенности, на которые мы хотели бы обратить внимание.

Преципитация 26S протеасом этанолом и ПЭГ 6000 привлекает своей доступностью и простотой. Однократное осаждение 26S протеасом этими веществами вполне годится для последующего анализа белковых комплексов в системе Лэммли. Об этом говорят наши эксперименты, представленные на рис. 2, и данные из литературы, демонстрирующие спектр протеасомных субъединиц, меченных радиоактивным метионином-S³⁵ и осажденных спиртом (Horsch et al., 1990). При анализе 26S протеасом, сконцентрированных этанолом и ПЭГ 6000 с помощью 2D-электрофореза, следует указать на нежелательное присутствие в пробе остатков солей (Rabilloud, 1996). Остаточные соли могут мешать процессу растворения белка и давать, таким образом, искаженные и (или) не воспроизводимые результаты. Положительным фактом при использовании этанола и ПЭГ 6000 для концентрирования является то, что они преципитируют 26S комплексы практически полностью, без потерь.

Применение центрифужных ультрафильтров для концентрирования 26S протеасом решает проблему контаминации препарата солями. Микроконцентраторы использовали для обессоливания при выделении 26S и 20S протеасом уже и раньше, и, наверное, трудно найти эквивалентную замену этому технологическому устройству (Галкин и др., 1998; Yabe et al., 2009). Тем не менее мы столкнулись с проблемой: при концентрировании исходно равного количества 26S протеасом тремя способами количественный выход 26S комплексов при использо-

вании микроконцентратора Amicon Ultra < 10 kDa был заметно ниже, чем в двух других случаях (этанол и ПЭГ 6000). И этот результат воспроизвелся. Сейчас мы не можем исчерпывающе объяснить почему. Возможно, имеет место неспецифическая сорбция белка. Но мы не исключаем и другой механизм.

Приведенные выше 2D-электрофореграммы 26S протеасом, сконцентрированных тремя различными способами, показали почти идентичную (особенно в области 20S) картину распределения белковых субъединиц. Можно было предположить, что такое структурное сходство станет предпосылкой для выявления сходства и функциональных характеристик 26S протеасом. Однако, как показали наши эксперименты, мы не обнаружили такого подтверждения. Напротив, функциональные характеристики 26S протеасом, а именно их пептидазные активности, прямо зависели от способа выделения и концентрирования комплексов. Чем более щадящим был способ выделения и концентрирования, тем лучше сохранялись интактная структура и функциональная активность 26S протеасом. Полученные данные являются предварительными и нуждаются в дополнительном экспериментальном развитии. Но, подводя итог, хотелось бы сказать, что вряд ли существует универсальный способ выделения 26S протеасом, удовлетворяющий всем требованиям сразу. Выбор условий и метода выделения субклеточных структур определяется каждый раз конкретной задачей исследователя.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009—2013 гг.» (№ 8787 и 8280) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-01024).

Список литературы

- Абрамова Е. Б., Астахова Т. М., Ерохов П. А., Шарова Н. П. 2004. Множественность форм протеасом и некоторые подходы к их разделению. Изв. АН. Сер. биол. 2 : 150—156.
- Абрамова Е. Б., Шарова Н. П., Карпов В. Л. 2002. Протеасома: разрушать, чтобы жить. Молекул. биол. 36 (5) : 761—776.
- Абрамова К. Б., Карпов В. Л. 2003. Протеасома: разрушение во имя созидания. Природа. 7 : 36—45.
- Березов Т. Т., Буробина С. С., Волкова Л. В., Евграфов В. Г., Познанская А. А., Яровая Г. А. 1976. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. М.: Медицина. 150 с.
- Галкин В. Э., Туроверова Л. В., Константинова И. М., Пиняев Г. П. 1998. 26S-рибонуклеопротеиновый комплекс (26S-протеасома) непосредственно взаимодействует с фибриллярным актином. Цитология. 40 (7) : 618—626.
- Зайкова Ю. Я., Куличкова В. А., Ермолаева Ю. Б., Гаузе Л. Н., Цимоха А. С. 2011. Сравнительный анализ вне- и внутриклеточных протеасом клеток человека линии K562. Цитология. 53 (6) : 459—465.
- Куличкова В. А., Ватажок Ю. Я., Цимоха А. С., Кожухарова И. В., Ермолаева Ю. Б., Евтеева И. Н., Миттенберг А. Г., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2008. Экзогенные 26S протеасомы могут входить в живые клетки и влиять на экспрессию генов в клетках -реципиентах. Докл. РАН. 423 (6) : 832—836.
- Маталин Д. А., Азаркевич М. И., Попова Л. Г., Балнокин Ю. В. 2012. Белковые комплексы, обладающие АТФазной активностью, в плазматической мембране морской микроводоросли *Tetraselmis viridis*. Докл. РАН. 447 (5) : 571—574.
- Мейхи Б. 1988. Вирусология. Методы. М.: Мир. 320 с.

- Моисеева Т. Н., Миттенберг А. Г., Барлев Н. А. 2010. Роль протеасом в регуляции транскрипции. Цитология. 52 (3) : 195—203.*
- Моисеева Т. Н., Федорова О. А., Цимоха А. С., Миттенберг А. Г., Барлев Н. А. 2010. Влияние убиквитинилирования на пептидазные активности протеасом при генотоксическом стрессе. Докл. РАН 435 (2) : 267—271.*
- Остерман Л. А. 1985. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука. 190 с.*
- Шаталкин А. И. 2004. Высший уровень деления в классификации организмов. 2. Архебактерии, эубактерии и эукариоты. Журн. общей биол. 65 (2) : 99—115.*
- Asher G., Tsvelkov P., Kahana C., Shaul Y. 2005. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and 73. Genes Develop. 19 : 316—321.*
- Ballut L., Petit F., Mouzeyar S., Gall O. L., Candresse T., Schmid P., Nicolas P., Badaoui S. 2003. Biochemical identification of proteasome-associated endonuclease activity in sunflower. Biochim. biophys. acta. 1645 : 30—39.*
- Bardag-Gorce F., French Samuel W. 2011. Delta-aminolevulinic dehydratase is a proteasome interacting protein. Exp. Mol. Pathol. 91 : 485—489.*
- Barlev N. A., Sayan B. S., Candi E., Okorokov A. L. 2010. The micro RNA and P53 families join forces against cancer. Cell Death Different. 17 : 373—375.*
- Barret A. J. 1980. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. Biochem J. 187 : 909—912.*
- Dignam J.D. 1990. Preparation of extracts from higher eukaryotes. Meth. Enzymol. 182 : 194—203.*
- Fedorova O. A., Moiseeva T. N., Nikiforov A. A., Tsimokha A. S., Livinskaya V. A., Hodson M., Bottrill A., Evteeva I. N., Ermolaeva J. B., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Eperon I., Barlev N. A. 2011. Proteomic analysis of the 20S proteasome (PSMA3)-interacting proteins reveals a functional link between the proteasome and mRNA metabolism. Biochem. Biophys. Res. Commun. 416 : 258—265.*
- Gautier-Bert K., Murol B., Jarrousse A.-S., Ballut L., Badaoui S., Petit F., Schmid H.-P. 2003. Substrate affinity and substrate specificity of proteasomes with RNase activity. Mol. Biol. Rep. 30 : 1—7.*
- Horsch A., Kohler K., Ellwart-Tschurz M., Schmid H.-P. 1990. Selection of prosomes and prosomal RNA by immobilized viral RNA. FEBS Lett. 269 : 336—340.*
- Jarrousse A.-S., Petit F., Kreutzer-Schmid C., Gaedigk R., Schmid H.-P. 1999. Possible involvement of proteasomes (prosomes) in AUUUA-mediated mRNA decay. J. Biol. Chem. 274 : 5925—5930.*
- Kulichkova V. A., Tsimokha A. S., Fedorova O. A., Moiseeva T. N., Bottrill A., Lezina L., Gauze L. N., Konstantinova I. M.,*
- Mittenberg A. G., Barlev N. A. 2010. 26S proteasome exhibits endoribonuclease activity controlled by extracellular stimuli. Cell Cycle. 9 : 840—849.*
- Laemmly U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.*
- Livinskaya V. A., Ivanov V. A., Fedorova O. A., Vorontsova D. N., Barlev N. A., Nikiforov A. A. 2012. Polyclonal antibodies against human proteasome subunits PSMA3, PSMA5 and PSMB5. Hybridoma. 31 : 272—278.*
- Mittenberg A. G., Moiseeva T. N., Barlev N. A. 2008. Role of proteasomes in transcription and their regulation by covalent modifications. Front. Biosci. 13 : 7184—7192.*
- O'Farrell P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250 : 4007—4021.*
- Petit F., Jarrousse A.-S., Boissonnet G., Dadet M.-H., Buri J., Briand Y., Schmid H.-P. 1997a. Proteasome (prosome) associated endonuclease activity. Mol. Biol. Rep. 24 : 113—117.*
- Petit F., Jarrousse A.-S., Dahlmann B., Sobek A., Hendil K.B., Buri J., Briand Y., Schmid H.-P. 1997b. Involvement of proteasome subunits zeta and iota in RNA degradation. Biochem. J. 326 : 93—98.*
- Qiu X.-B., Ouyang S.-Y., Li C.-J., Miao S., Wang L., Goldberg A. L. 2006. hRpn13\ADRM1\GP110 is a novel proteasome subunit that binds the deubiquitinating enzyme, UCH37. EMBO J. 25 : 5742—5753.*
- Rabilloud T. 1996. Solubilization of proteins for electrophoretic analysis. Electrophoresis. 17 : 813—829.*
- Schmid F., Dahlmann B., Janek K., Kloss A., Waker M., Ackermann R., Thiede B., Jungblut P. R. 2006. Comprehensive quantitative proteome analysis of 20S proteasome subtypes from rat liver by isotope coded affinity tag and 2-D gel-based approaches. Proteomics. 6 : 4622—4632.*
- Sha Z., Brill L. M., Cabrera R., Kleifeld O., Scheliga J. S., Glickman M. H., Chang E. C., Wolf D. A. 2009. The eIF3 interactome reveals the translasome, a supercomplex linking protein synthesis and degradation machineries. Mol. Cell. 36 : 141—152.*
- Tanaka K., Tsurumi C. 1997. The 26S proteasome: subunits and functions. Mol. Biol. Rep. 24 : 3—11.*
- Wang X., Chen C.-F., Baker P. R., Chen P.-I., Kaiser P., Hung L. 2007. Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex. Biochemistry. 46 : 3553—3565.*
- Yabe K., Koide T. 2009. Inhibition of the 20S proteasome by a protein proteinase inhibitor: evidence that a natural serine proteinase inhibitor can inhibit a threonine proteinase. Biochem. J. 415 : 217—227.*

Поступила 5 VIII 2013

COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS FOR PURIFICATION AND CONCENTRATION OF 26S PROTEASOMES ISOLATED FROM RAT LIVER

*I. N. Evteeva,¹ * T. Yu. Starkova,¹ A. V. Artemov,¹ Yu. Ya. Zaikova,¹ N. A. Barlev^{1—3}, **

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, ² St. Petersburg Technological University

and ³ University of Leicester, Leicester LE1 9HN, UK;

* e-mail: evtin@mail.cytspb.rssi.ru, nick.a.barlev@gmail.com

The 26S proteasome is a multi-subunit protein complex that consists of the catalytic 20S and regulatory 19S sub-complexes. The most well studied function of proteasomes is specific degradation of proteins. There are several purification schemes for obtaining the preparations of 26S proteasomes. An important step in purification of 26S proteasomes is concentration of the purified material for subsequent analysis of its biochemical functions. In this report we showed that the subunits composition of 26S proteasomes that have been concentrated by the different modes at the latest stage of their preparation is identical. However, the concentrating mode differently affects the functional activity of these complexes.

Key words: proteasome, proteasome subunits, 2D-electrophoresis, peptidase activity, polyethylene glycol.