

ХАРАКТЕРИСТИКА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕАСОМ И АССОЦИИРОВАННЫХ С НИМИ БЕЛКОВ МЕТОДОМ iTRAQ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© Ю. Я. Зайкова,^{1, 2} В. А. Куличкова,¹ Ю. Б. Ермолаева,¹ А. Боттрилл,³
Н. А. Барлев,^{1, 3, 4} А. С. Цимоха*,¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

² С.-Петербургский государственный политехнический университет,

³ Университет г. Лестер, Великобритания,

⁴ С.-Петербургский государственный технологический институт;

* электронный адрес: atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru

Проведен iTRAQ-масс-спектрометрический анализ внеклеточных протеасом и выявлены посттрансляционные модификации (ПТМ) субъединиц внеклеточных 26S протеасом. Выявлены новые сайты убиквитинирования и ацетилирования протеасомных субъединиц $\alpha 2$ (K196), $\alpha 4$ (K189 и K234), $\alpha 6$ (K217) и Rpn6 (A2). Обнаружено, что в составе внеклеточных протеасом присутствует стандартный набор из субъединиц 26S протеасомы, а также регулятор PA200, который, как полагали ранее, локализуется лишь в ядре клеток. Получен первичный скрининг белков, взаимодействующих с внеклеточными протеасомами. Показано, что с протеасомами ассоциированы белки, участвующие в таких основных клеточных процессах, как транскрипция, репарация ДНК, трансляция, а также белки цитоскелета и убиквитин-протеасомной системы (УПС). Методом иммуноблоттинга подтвердили взаимодействие протеасом с девятью белками, выбранными из полученного белкового скрининга случайным образом.

Ключевые слова: внеклеточные протеасомы, iTRAQ-масс-спектрометрия, посттрансляционные модификации, убиквитинирование.

Принятые сокращения: ДСН — додецилсульфат натрия, ПААГ — полиакриламидный гель, ПТМ — посттрансляционные модификации, УПС — убиквитин-протеасомная система.

Убиквитин-протеасомная система (УПС) осуществляет программированный протеолиз и процессинг различных регуляторных белков, участвующих во множестве клеточных процессов, включая регуляцию транскрипции, репарацию ДНК, продвижение клетки по клеточному циклу, иммунный ответ, апоптоз (Konstantinova et al., 2008; Моисеева и др., 2010а; Цимоха, 2010). Протеолитическим «ядром» этой системы является мультисубъединичный белковый комплекс — 26S протеасома, часто называемый просто протеасома. 26S протеасома состоит из протеолитической коровой частицы (20S протеасомы) и одного или двух 19S регуляторов. 20S протеасома представляет собой полый цилиндр, образованный четырьмя семичленными кольцами: два внутренних кольца собраны из субъединиц β -типа, два внешних — из субъединиц α -типа. Три β -субъединицы ($\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$) ответственны за протеолитическую активность протеасом; основной функцией α -кольца является регулирование доступа субстрата в протеолитическую камеру 20S протеасомы и взаимодействие с 19S регуляторными комплексами (и другими регуляторами), а также с другими белками, которые, согласно литературным данным, взаимодействуют с протеасомами в случае убиквитин-независимого протеолиза (Murakami et al., 2000; Touitou et al., 2001; Zhang et al., 2003).

Согласно нашим данным (Fedorova et al., 2011), с PSMA3 ($\alpha 7$) субъединицей 20S протеасомы связываются

in vitro белки, вовлеченные в регуляцию транскрипции, репарацию ДНК, различные аспекты метаболизма РНК, а также белки цитоскелета, убиквитин-протеасомной системы (УПС) и шапероны. Интересно, что анализ с помощью тандемной масс-спектрометрии белков, ассоциированных с протеасомами крысы, выявил свыше 25 белков, в числе которых также были шапероны и белки цитоскелета и УПС (Scanlon et al., 2009; Tai et al., 2010). Как и следовало ожидать, авторы ограничиваются предположением о модулирующем протеасомные свойства функционировании данных белков, равно как и об ассоциации белков с протеасомами с целью деградации их по убиквитин-независимому пути.

В последнее время в литературе появились данные о присутствии протеасом во внеклеточном пространстве (Lavabre-Bertrand et al., 2001; Stoeberner et al., 2005; Sixt et al., 2007, 2009; Sixt, Dahlmann, 2008; Albright et al., 2009; Henry et al., 2009; Sixt, Peters, 2010). Методом электронной микроскопии показано, что внеклеточные протеасомы имеют аналогичную клеточным частицам цилиндрическую структуру, с одного или двух концов ограниченную регуляторными комплексами (Zoeger et al., 2006). Биологические функции внеклеточных протеасом в настоящее время неясны. Ранее мы показали, что выделяемые в культуральную среду клетками линии A431 протеасомы отличаются от цитоплазматических частиц не

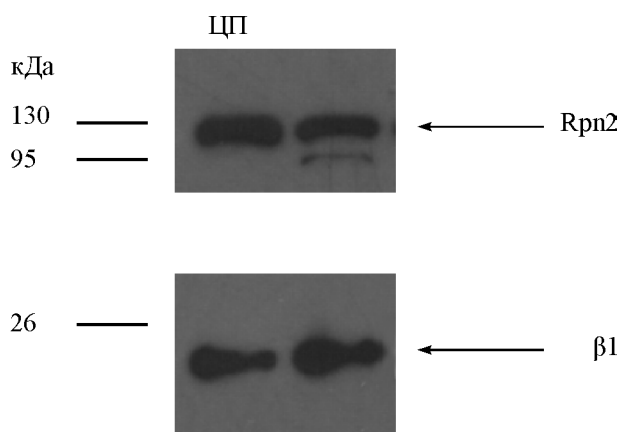


Рис. 1. Иммунохимическая окраска субъединиц 19S комплекса Rpn2 и 20S протеасомы $\beta 1$ в составе протеасом, выделенных из цитоплазмы (ЦП) клеток K562 и кондиционированной клетками K562 среды.

только по удельной эндорибонуклеазной активности, но и по ее зависимости от двухвалентных катионов (Куличкова и др., 2004). Кроме того, мы обнаружили, что внеклеточные протеасомы активнее по типу химотрипсина, а внутриклеточные — по типу трипсина (Зайкова и др., 2011). Мы выявили посттрансляционные модификации (ПТМ) субъединиц 20S протеасом методом иммуноблоттинга с помощью специфических антител к протеасомным белкам. Используя антитела к фосфоаминокислотам, мы подтвердили присутствие фосфорилирования в спектре ПТМ протеасом (Зайкова и др., 2011). Однако ацетилирование или убиквитинирование внеклеточных протеасом мы на тот момент не смогли выявить. Кроме того, нет данных в литературе о белках, взаимодействующих с внеклеточными протеасомами.

Поэтому в данной работе мы поставили перед собой задачу получить первичный скрининг белков, взаимодействующих с внеклеточными протеасомами, а также показать наличие ацетилирования и убиквитинирования субъединиц внеклеточных протеасом.

Материал и методика

Клетки проэритролейкемии человека линии K562, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН) культивировали при 37 °C в среде RPMI 1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, в присутствии 0.004 % гентамицина.

Протеасомы выделяли из цитоплазмы и кондиционированной клетками ростовой среды с помощью центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы (15—30 %) и ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 (Hough et al., 1987).

iTRAQ-масс-спектрометрический анализ протеасом проводили согласно описанному ранее методу (Gazzah et al., 2012). Образцы очищенных протеасом из кондиционированной клетками среды и клеток K562 нормировали между собой методом Вестерн-блоттинга с помощью специфических антител к белкам протеасом (рис. 1). Далее препараты вне- и внутриклеточных протеасом в количестве 75 мкг каждого подвергали трипсинолизу, полученный набор пептидов метили TMT (Tandem Mass Tags) реагентами согласно ре-

комендациям фирмы-изготовителя (Thermo Scientific, США). Анализ LC-MS/MS был сделан с помощью хроматографической системы RSLCnano HPLC system (Dionex, Великобритания) и масс-спектрометра LTQ-Orbitrap-Velos (Thermo Scientific, США). Жидкостную хроматографию (LC) проводили на обратно-фазовых колонках с Acclaim PepMap (Dionex, Великобритания) и с Symmetry C18 100 A (Waters, Великобритания). Данные, полученные с масс-спектрометра, формировали в файл с расширением raw с помощью программного обеспечения Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific, США). Анализ полученных ионных спектров проводили с помощью программы Mascot 2.2.04 (Matrix Science Ltd., США) (Perkins et al., 1999) и базы данных UniProtKB/Swissprot. Конечную обработку данных проводили с помощью программы Scaffold Q+S 3.6.0 (Proteome Software) (Searle, 2010). Данные после импорта в программу анализировали X!Tandem (The Global Proteome Machine Organization) (Craig, Beavis, 2004).

Вестерн-блоттинг белков протеасом с применением вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, выполняли, следуя рекомендациям фирмы (Sigma, США). Пероксидазу выявляли с помощью кита SuperSignal (Pierce, США). Протеасомы фракционировали на белковые субъединицы в денатурирующем 12%-ном ПААГ (Laemmli, 1970). Полученные фракции электрофоретически переносили на нитроцеллюлозные фильтры (Hybond C extra, GE Healthcare) в соответствии со стандартной методикой и блокировали центры неспецифического связывания антител 5%-ным раствором обезжиренного молока. Избыток блокирующего агента отмывали буфером PBS и мембрану инкубировали со специфическими антителами против Filamin-A, Myosin-9, Alpha-actinin-4, hnRNP L, Tubulin alpha, hnRNP F/H, Beta-actin, Tropomyosin alpha-3, Rpn7, a5.

Результаты и обсуждение

iTRAQ-масс-спектрометрия — новое крупное достижение в области протеомики. Достоверность и воспроизводимость результатов iTRAQ-масс-спектрометрии очень хорошие. Кит iTRAQ состоит из двух изобарических (одинаковой массы) amino-реактивных реагентов, которые могут маркировать пептиды в белковом дайджесте и, следовательно, позволяют точно идентифицировать и количественно определить пептиды с помощью тандемной масс-спектрометрии. Общий порядок использования iTRAQ-масс-спектрометрии заключается в следующем: белковые пробы расщепляются на пептиды, которые затем дифференциально метятся реагентами iTRAQ, после чего объединяются для сравнительного анализа и подвергаются жидкостной хроматографии с последующей тандемной масс-спектрометрией (Gazzah et al., 2012).

Препараты очищенных протеасом нормировали методом Вестерн-блоттинга при помощи специфических антител к субъединицам протеасом: Rpn2 (белок 19S регуляторного комплекса) и $\beta 1$ (субъединица 20S комплекса). Как можно заметить на рис. 1, соотношение между 19S и 20S комплексами у вне- и внутриклеточных протеасом обратное. Мы приняли решение нормировать образцы с учетом коэффициента поправки, высчитываемого при сравнении количества субъединицы $\beta 1$ в препаратах вне- и внутриклеточных протеасом. Результаты iTRAQ-масс-спектрометрического анализа препаратов внеклеточных протеасом представлены в табл. 1. В общей слож-

Т а б л и ц а 1

Выявленные с помощью iTRAQ-масс-спектрометрии белки, ассоциированные с внеклеточными протеасомами

Группа белков	Номер белка	Название белка	Название гена
Белки, ассоциированные с УПС	P62333	26S protease regulatory subunit 10B (Rpt4)	<i>PSMC6</i>
	P62191	26S protease regulatory subunit 4 (Rpt2)	<i>PSMC1</i>
	P17980	26S protease regulatory subunit 6A (Rpt5)	<i>PSMC3</i>
	P43686	26S protease regulatory subunit 6B (Rpt3)	<i>PSMC4</i>
	P35998	26S protease regulatory subunit 7 (Rpt1)	<i>PSMC2</i>
	P62195	26S protease regulatory subunit 8 (Rpt6)	<i>PSMC5</i>
	P61289	Proteasome activator complex subunit 3 (PA28 γ)	<i>PSME3</i>
	Q14997	Proteasome activator complex subunit 4 (PA200)	<i>PSME4</i>
	Q99460	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 (Rpn2)	<i>PSMD1</i>
	O75832	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10 (Gankyrin)	<i>PSMD10</i>
	O00231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 (Rpn6)	<i>PSMD11</i>
	O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 (Rpn5)	<i>PSMD12</i>
	Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 (Rpn9)	<i>PSMD13</i>
	O00487	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 (Rpn11)	<i>PSMD14</i>
	Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 (Rpn1)	<i>PSMD2</i>
	O43242	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 (Rpn3)	<i>PSMD3</i>
	P55036	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 (Rpn10 или S5A)	<i>PSMD4</i>
	Q16401	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5 (S5B)	<i>PSMD5</i>
	Q15008	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 (Rpn7)	<i>PSMD6</i>
	P51665	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 (Rpn8)	<i>PSMD7</i>
	P48556	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 (Rpn12)	<i>PSMD8</i>
	P25786	Proteasome subunit alpha type-1 (α 6)	<i>PSMA1</i>
	P25787	Proteasome subunit alpha type-2 (α 2)	<i>PSMA2</i>
	P25788	Proteasome subunit alpha type-3 (α 7)	<i>PSMA3</i>
	P25789	Proteasome subunit alpha type-4 (α 3)	<i>PSMA4</i>
	P28066	Proteasome subunit alpha type-5 (α 5)	<i>PSMA5</i>
	P60900	Proteasome subunit alpha type-6 (α 1)	<i>PSMA6</i>
	O14818	Proteasome subunit alpha type-7 (α 3)	<i>PSMA7</i>
	P20618	Proteasome subunit beta type-1 (β 6)	<i>PSMB1</i>
	P49721	Proteasome subunit beta type-2 (β 4)	<i>PSMB2</i>
	P49720	Proteasome subunit beta type-3 (β 3)	<i>PSMB3</i>
	P28070	Proteasome subunit beta type-4 (β 7)	<i>PSMB4</i>
	P28074	Proteasome subunit beta type-5 (β 5)	<i>PSMB5</i>
	P28072	Proteasome subunit beta type-6 (β 1)	<i>PSMB6</i>
	Q99436	Proteasome subunit beta type-7 (β 2)	<i>PSMB7</i>
	Q16186	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1 (Rpn13)	<i>ADRM1</i>
	P27348	14-3-3 protein theta	<i>YWHAQ</i>
	P54578	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	<i>USP14</i>
	Q93008	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	<i>USP9X</i>
	Q9Y5K5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	<i>UCHL5</i>
	P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	<i>UBA1</i>
	Q9UBE0	SUMO-activating enzyme subunit 1	<i>SAE1</i>
	Q9UBT2	SUMO-activating enzyme subunit 2	<i>UBA2</i>
	A0AVT1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6	<i>UBA6</i>
	Q9UNE7	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP	<i>STUB1</i>
	Q7Z6Z7	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	<i>HUWE1</i>
	Q5T4S7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	<i>UBR4</i>
	Q13616	Cullin-1	<i>CUL1</i>
	Q13620	Cullin-4B	<i>CUL4B</i>
	Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	<i>CAND1</i>
	Q13098	COP9 signalosome complex subunit 1	<i>GPS1</i>
	P61201	COP9 signalosome complex subunit 2	<i>COPS2</i>
	Q9UNS2	COP9 signalosome complex subunit 3	<i>COPS3</i>
Q9BT78	COP9 signalosome complex subunit 4	<i>COPS4</i>	
Q92905	COP9 signalosome complex subunit 5	<i>COPS5</i>	

Таблица 1 (продолжение)

Группа белков	Номер белка	Название белка	Название гена
Белки, ассоциированные с УПС	Q7L5N1	COP9 signalosome complex subunit 6	<i>COPS6</i>
	Q9H9Q2	COP9 signalosome complex subunit 7b	<i>COPS7B</i>
	Q99627	COP9 signalosome complex subunit 8	<i>COPS8</i>
	Q13867	Bleomycin hydrolase	<i>BLMH</i>
	O43396	Thioredoxin-like protein 1	<i>TXNL1</i>
	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	<i>EEF1A1</i>
Шапероны	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	<i>HSPD1</i>
	P09107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	<i>HSPA1A</i>
	P34932	Heat shock 70 kDa protein 4	<i>HSPA4</i>
	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	<i>HSPA8</i>
	Q92598	Heat shock protein 105	<i>HSPH1</i>
	P04792	Heat shock protein beta-1	<i>HSPB1</i>
	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	<i>HSP90AA1</i>
	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	<i>HSP90AB1</i>
	P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	<i>TCP1</i>
	P78371	T-complex protein 1 subunit beta	<i>CCT2</i>
	P50991	T-complex protein 1 subunit delta	<i>CCT4</i>
	P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon	<i>CCT5</i>
	Q99832	T-complex protein 1 subunit eta	<i>CCT7</i>
	P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	<i>CCT3</i>
	P50990	T-complex protein 1 subunit theta	<i>CCT8</i>
	P40227	T-complex protein 1 subunit zeta	<i>CCT6A</i>
	P14625	Endoplasmic reticulum chaperone	<i>HSP90B1</i>
	P11021	78 kDa glucose-regulated protein	<i>HSPA5</i>
	P30101	Protein disulfide-isomerase A3	<i>PDI A3</i>
	P13667	Protein disulfide-isomerase A4	<i>PDI A4</i>
	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	<i>PDI A6</i>
	P07237	Protein disulfide-isomerase	<i>P4HB</i>
	P27797	Calreticulin	<i>CALR</i>
Цитоскелет и миофибриллярные белки	P68363	Tubulin alpha-1B chain	<i>TUBA1B</i>
	P07437	Tubulin beta chain	<i>TUBB</i>
	P60709	Actin, cytoplasmic 1	<i>ACTB</i>
	O43707	Alpha-actinin-4	<i>ACTN4</i>
	P08670	Vimentin	<i>VIM</i>
	P52907	F-actin-capping protein subunit alpha-1	<i>CAPZA1</i>
	P47756	F-actin-capping protein subunit beta	<i>CAPZB</i>
	O60610	Protein diaphanous homolog 1	<i>DIAPH1</i>
	Q01082	Spectrin beta chain, brain 1	<i>SPTBN1</i>
	P06753	Tropomyosin alpha-3 chain	<i>TPM3</i>
	P35580	Myosin-10	<i>MYH10</i>
	P35579	Myosin-9	<i>MYH9</i>
	P26038	Moesin	<i>MSN</i>
	P21333	Filamin-A	<i>FZNA</i>
	Q9ULV4	Coronin-1C	<i>CORO1C</i>
	P61163	Alpha-centractin	<i>ACTR1A</i>
	Q70Z35	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein	<i>PREX2</i>
Белки, участвующие в репарации ДНК и в ответе на повреждение ДНК	Q08211	ATP-dependent RNA helicase	<i>DHX9</i>
	Q9Y265	RuvB-like 1	<i>RUVBL1</i>
	Q9Y230	RuvB-like 2	<i>RUVBL2</i>
	P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	<i>XRCC5</i>
	P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	<i>XRCC6</i>
	P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	<i>STIP1</i>
	Q16531	DNA damage-binding protein 1	<i>DDB1</i>
	Q8WZ42	Titin	<i>TTN</i>
	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	<i>VCP</i>

Таблица 1 (продолжение)

Группа белков	Номер белка	Название белка	Название гена
Транскрипция, репликация	Q9H2J4	Phosducin-like protein 3	<i>PDCL3</i>
	Q5VST9	Obscurin	<i>OBSCN</i>
	P06748	Nucleophosmin	<i>NPM1</i>
	P63244	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	<i>GNB2L1</i>
	P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	<i>PRKDC</i>
	Q9Y265	RuvB-like 1	<i>RUVBL1</i>
	Q9Y230	RuvB-like 2	<i>RUVBL2</i>
	Q92769	Histone deacetylase 2	<i>HDAC2</i>
	P49736	DNA replication licensing factor MCM2	<i>MCM2</i>
	P25205	DNA replication licensing factor MCM3	<i>MCM3</i>
	P33991	DNA replication licensing factor MCM4	<i>MCM4</i>
	P33992	DNA replication licensing factor MCM5	<i>MCM5</i>
	Q14566	DNA replication licensing factor MCM6	<i>MCM6</i>
	P33993	DNA replication licensing factor MCM7	<i>MCM7</i>
	Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	<i>TRIM28</i>
	Q09028	Histone-binding protein RBBP4	<i>RBBP4</i>
	P05455	Lupus La protein	<i>SSB</i>
	Q99873	Protein arginine N-methyltransferase 1	<i>PRMT1</i>
	O14744	Protein arginine N-methyltransferase 5	<i>PRMT5</i>
	Q9BXP5	Serrate RNA effector molecule homolog	<i>SRRT</i>
	Q15020	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	<i>SART3</i>
	Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	<i>SND1</i>
	Q15631	Translin	<i>TSN</i>
	Q99598	Translin-associated protein X	<i>TSNAX</i>
	P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	<i>LRPPRC</i>
	Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2	<i>ILF2</i>
	Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3	<i>ILF3</i>
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	<i>RAN</i>	
P68400	Casein kinase II subunit alpha	<i>CSNK2A1</i>	
P46321	Nuclear autoantigenic sperm protein	<i>NASP</i>	
Q3V6T2	Girdin	<i>CCDC88A</i>	
Сплайсинг и про- цессинг РНК	Q15029	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	<i>EFTUD2</i>
	Q13838	Spliceosome RNA helicase BAT1	<i>BAT1</i>
	Q15459	Splicing factor 3A subunit 1	<i>SF3A1</i>
	O75533	Splicing factor 3B subunit 1	<i>SF3B1</i>
	P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	<i>HNRNPF</i>
	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	<i>HNRNPH1</i>
	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	<i>HNRNPK</i>
	P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	<i>HNRNPL</i>
	O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	<i>SYNCRIP</i>
	Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	<i>HNRNPU</i>
	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	<i>HNRNPA2B1</i>
	P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	<i>SNRPD1</i>
	P62316	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	<i>SNRPD2</i>
	P62318	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	<i>SNRPD3</i>
	P14678	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'	<i>SNRPB</i>
	P08621	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	<i>SNRNP70</i>
	P09012	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	<i>SNRPA</i>
	O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	<i>SNRNP200</i>
	Q15020	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	<i>SART3</i>
	Q92973	Transportin-1	<i>TNPO1</i>
	Q9Y5L0	Transportin-3	<i>TNPO3</i>
	P11940	Polyadenylate-binding protein 1	<i>PABPC1</i>
	P19338	Nucleolin	<i>NCL</i>
	Q9BQA1	Methylosome protein 50	<i>WDR77</i>

Таблица 1 (продолжение)

Группа белков	Номер белка	Название белка	Название гена
Сплайсинг и процессинг РНК	Q8TEQ6	Gem-associated protein 5	<i>GEMIN5</i>
	P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	<i>PPP2R1A</i>
Трансляция	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	<i>EEF1A1</i>
	P24534	Elongation factor 1-beta	<i>EEF1B2</i>
	P29692	Elongation factor 1-delta	<i>EEF1D</i>
	P26641	Elongation factor 1-gamma	<i>EEF1G</i>
	P13639	Elongation factor 2	<i>EEF2</i>
	P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial	<i>TUFM</i>
	P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	<i>EIF4A1</i>
	P62495	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	<i>ETF1</i>
	P55884	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	<i>EIF3B</i>
	Q99613	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	<i>EIF3C</i>
	Q13347	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	<i>EIF3I</i>
	O75822	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	<i>EIF3J</i>
	Q9Y262	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	<i>EIF3L</i>
	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	<i>EIF5A</i>
	P12081	Histidyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	<i>HARS</i>
	P07814	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	<i>EPRS</i>
	P26639	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	<i>TARS</i>
	Q9P2J5	Leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	<i>LARS</i>
	Q15046	Lysyl-tRNA synthetase	<i>KARS</i>
	P49588	Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	<i>AARS</i>
	Q13155	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	<i>AIMP2</i>
	O43776	Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	<i>NARS</i>
	P14868	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	<i>DARS</i>
	P41250	Glycyl-tRNA synthetase	<i>GARS</i>
	Q9NXH9	N(2),N(2)-dimethylguanosine tRNA methyltransferase	<i>TRMT1</i>
	P23381	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	<i>WARS</i>
	P54577	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	<i>YARS</i>
	P26640	Valyl-tRNA synthetase	<i>VARS</i>
	P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	<i>RPS27A</i>
	P08865	40S ribosomal protein SA	<i>RPSA</i>
	P05388	60S acidic ribosomal protein P0	<i>RPLP0</i>
	P05387	60S acidic ribosomal protein P2	<i>RPLP2</i>
	P62913	60S ribosomal protein L11	<i>RPL11</i>
	P18621	60S ribosomal protein L7	<i>RPL17</i>
	P62829	60S ribosomal protein L23	<i>RPL23</i>
	P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	<i>SRP14</i>
	P06748	Nucleophosmin	<i>NPM1</i>
Метаболизм	P11021	78 kDa glucose-regulated protein	<i>HSPA5</i>
	Q06210	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	<i>GFPT1</i>
	P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	<i>G6PD</i>
	P14314	Glucosidase 2 subunit beta	<i>PRKCSH</i>
	Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB	<i>GANAB</i>
	Q9NYU2	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	<i>UGGT1</i>
	P36776	Lon protease homolog, mitochondrial	<i>LONP1</i>
	O15067	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	<i>PFAS</i>
	P31153	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	<i>MAT2A</i>
	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	<i>ATP5A1</i>
	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	<i>ATP5B</i>
	P53396	ATP-citrate synthase	<i>ACLY</i>
	P35520	Cystathionine beta-synthase	<i>CBS</i>
	P49327	Fatty acid synthase	<i>FASN</i>
	Q9NPH2	Inositol-3-phosphate synthase 1	<i>ISYNA1</i>
P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	<i>PDHA1</i>	

Таблица 1 (продолжение)

Группа белков	Номер белка	Название белка	Название гена
Метаболизм	P00367	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	<i>GLUD1</i>
	P49448	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	<i>GLUD2</i>
	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>
	P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	<i>IMPDH2</i>
	P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	<i>LDHA</i>
	P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	<i>LDHB</i>
	P11310	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	<i>ACADM</i>
	P12277	Creatine kinase B-type	<i>CKB</i>
	P36776	Lon protease homolog, mitochondrial	<i>LONP1</i>
	P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	<i>PKM2</i>
	P60891	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	<i>PRPS1</i>
	Q02952-R	A-kinase anchor protein 12	<i>AKAP12</i>
	P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	<i>NME1</i>
	Q15274	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	<i>QPRT</i>
	Q06203	Amidophosphoribosyltransferase	<i>PPAT</i>
	Q9UKK9	ADP-sugar perophosphatase	<i>NUDT5</i>
	Q9H773	dCTP pyrophosphatase 1	<i>DCTPP1</i>
	Q70Z35	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein	<i>PREX2</i>
	P36959	GMP reductase 1	<i>GMPR</i>
	Q9P2T1	GMP reductase 2	<i>GMPR2</i>
	P38606	V-type proton ATPase catalytic subunit A	<i>ATP6V1A</i>
	P21281	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	<i>ATP6V1B2</i>
	P36543	V-type proton ATPase subunit E1	<i>ATP6V1E1</i>
	Q9UI12	V-type proton ATPase subunit H	<i>ATP6V1H</i>
	Q13085	Acetyl-CoA carboxylase 1	<i>ACACA</i>
	P30566	Adenylosuccinate lyase	<i>ADSL</i>
	P13798	Acylamino-acid-releasing enzyme	<i>APEH</i>
	P23526	Adenosylhomocysteinase	<i>AHCY</i>
	Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	<i>TXNDC5</i>
	P10599	Thioredoxin	<i>TXN</i>
	O43396	Thioredoxin-like protein 1	<i>TXNL1</i>
	P40939	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	<i>HADHA</i>
	P55084	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	<i>HADHB</i>
P22234	Multifunctional protein ADE2	<i>PAICS</i>	
Q9BS26	Endoplasmic reticulum resident protein 44	<i>ERP44</i>	
Передача сигнала и транспорт	P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	<i>RANBP1</i>
	Q96QK1	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	<i>VPS35</i>
	P13796	Plastin-2	<i>LCP1</i>
	P06748	Nucleophosmin	<i>NPM1</i>
	P52292	Importin subunit alpha-2	<i>KPNA2</i>
	O00629	Importin subunit alpha-4	<i>KPNA4</i>
	Q14974	Importin subunit beta-1	<i>KPNB1</i>
	O00410	Importin-5	<i>IPO5</i>
	O95373	Importin-7	<i>IPO7</i>
	P02794	Ferritin heavy chain	<i>FTH1</i>
	O14980	Exportin-1	<i>XPO1</i>
	P55060	Exportin-2	<i>CSE1L</i>
	Q14203	Dynactin subunit 1	<i>DCTN1</i>
	Q13561	Dynactin subunit 2	<i>DCTN2</i>
	O75935	Dynactin subunit 3	<i>DCTN3</i>
	Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	<i>DYNC1H1</i>
	P53618	Coatomer subunit beta	<i>COPB1</i>
	Q9Y678	Coatomer subunit gamma	<i>COPG</i>
Q00610	Clathrin heavy chain 1	<i>CLTC</i>	
O00299	Chloride intracellular channel protein 1	<i>CLIC1</i>	

Таблица 1 (продолжение)

Группа белков	Номер белка	Название белка	Название гена
Передача сигнала и транспорт	Q10567	AP-1 complex subunit beta-1	<i>APIB1</i>
	P61163	Alpha-centractin	<i>ACTR1A</i>
	Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1	<i>CAP1</i>
	P31946	14-3-3 protein beta/alpha	<i>YWHAB</i>
	P62258	14-3-3 protein epsilon	<i>YWHAЕ</i>
	P63104	14-3-3 protein zeta/delta	<i>YWHAZ</i>
	P61981	14-3-3 protein gamma	<i>YWHAG</i>
	Q70Z35	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein	<i>PREX2</i>
Другие	Q92545	Transmembrane protein 131	<i>TMEM131</i>
	Q14166	Tubulin-tyrosine ligase-like protein 12	<i>TTL12</i>

Таблица 2

Пропорции протеасомных субъединиц в цитоплазме и среде по данным iTRAQ-масс-спектрометрии

Название белка	Субкомплекс протеасомы	Соотношение между количеством белка в протеасомах из цитоплазмы и среды ^а
26S protease regulatory subunit 10B (Rpt4)		0.4
26S protease regulatory subunit 4 (Rpt2)		0.5
26S protease regulatory subunit 6A (Rpt5)		0.6
26S protease regulatory subunit 6B (Rpt3)		0.4
26S protease regulatory subunit 7 (Rpt1)		0.5
26S protease regulatory subunit 8 (Rpt6)		0.4
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 (Rpn2)		0.6
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10 (Gankyrin)		2.0
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 (Rpn6)		0.4
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 (Rpn5)	19S (PA700)	0.7
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 (Rpn9)	регуляторный комплекс	0.3
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 (Rpn11)		0.3
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 (Rpn1)		0.8
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 (Rpn3)		0.7
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 (Rpn10 или S5A)		1.1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5 (S5B)		0.4
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 (Rpn7)		0.4
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 (Rpn8)		1.1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 (Rpn12)		0.0
Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1 (Rpn13)		0.9
Proteasome activator complex subunit 3 (PA28 γ)	11S (PA28) регуляторный комплекс	-0.3
Proteasome activator complex subunit 4 (PA200)	PA200 регуляторный комплекс	-1.7
Proteasome subunit alpha type-1 (α 6)	20S протеасома	-1.0
Proteasome subunit alpha type-2 (α 2)		-1.0
Proteasome subunit alpha type-3 (α 7)		-1.7
Proteasome subunit alpha type-4 (α 3)		-1.0
Proteasome subunit alpha type-5 (α 5)		-0.7
Proteasome subunit alpha type-6 (α 1)		-1.3
Proteasome subunit alpha type-7 (α 3)		-1.7
Proteasome subunit beta type-1 (β 6)		-1.0
Proteasome subunit beta type-2 (β 4)		-0.7
Proteasome subunit beta type-3 (β 3)		-1.3
Proteasome subunit beta type-4 (β 7)		-1.0
Proteasome subunit beta type-5 (β 5)		-1.0
Proteasome subunit beta type-6 (β 1)		-1.7
Proteasome subunit beta type-7 (β 2)		-0.7

^а Логарифм (при основании 2) отношения количества белка в препарате цитоплазматических протеасом к количеству белка в протеасомах из среды, нормированное относительно количества белка в препаратах протеасом из кондиционированной клетками среды.

Таблица 3

**Посттрансляционные модификации (ПТМ) протеасомных белков,
выявленные с помощью iTRAQ-масс-спектрометрии**

Номер белка	Название белка	Альтернативное название	Название гена	Аминокислотный остаток	ПТМ	Последовательность пептидов
Q99460	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	Rpn2	<i>PSMD1</i>	K869 ^a	Ub	KKEPEPNFQLLDNPAR
O00231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	Rpn6	<i>PSMD1</i>	A2	Ac	AAAAVVEFQR
P25786	Proteasome subunit alpha type-1	$\alpha 6$	<i>PSMA1</i>	K208 ^{b-г} K217	Ub Ub	ETLPAEQDLTTK VSIGIVGK
P25787	Proteasome subunit alpha type-2	$\alpha 2$	<i>PSMA2</i>	K39 K50 ^a K196	Ub Ub Ub	LVQIEYALLAAVAGGAPSVGK AANGVVLATEK YNEDLELEDAIHTAILTK
P25789	Proteasome subunit alpha type-4	$\alpha 3$	<i>PSMA4</i>	K238 ^a	Ub	EVEQLIK
P28066	Proteasome subunit alpha type-5	$\alpha 5$	<i>PSMA5</i>	K187 ^a	Ub	AIGSADEGAQSSSLQEVYHK
P60900	Proteasome subunit alpha type-6	$\alpha 1$	<i>PSMA6</i>	K30 K164 ^a	Ub Ub	LYQVEYAFK CDPAGYYCGFK
O14818	Proteasome subunit alpha type-7	$\alpha 4$	<i>PSMA7</i>	K189 K204 ^a K234	Ub Ub Ub	NYTDEAIETDDTLTK ALLEVVQSGGK YVAEIEK
P20618	Proteasome subunit beta type-1	$\beta 6$	<i>PSMB1</i>	K228 ^{a, б}	Ub	ICIVTK
P49721	Proteasome subunit beta type-2	$\beta 4$	<i>PSMB2</i>	K29 ^{a, б}	Ub	VAASNIVQMK
P49720	Proteasome subunit beta type-3	$\beta 3$	<i>PSMB3</i>	K41 ^a	Ub	FGIQAQMVTTDFQK
P28072	Proteasome subunit beta type-6	$\beta 1$	<i>PSMB6</i>	K230 ^a	Ub	QVLLGDQIPK
Q99436	Proteasome subunit beta type-7	$\beta 2$	<i>PSMB7</i>	K72 ^a	Ub	ATEGMVVADK

Примечание. Подчеркиванием выделены впервые обнаруженные сайты модифицирования белков, жирным шрифтом указано положение аминокислотного остатка, несущего выявленную модификацию. Ub — убиквитинирование, Ac — ацетилирование. Клетки линий, в которых обнаружены данные сайты убиквитинирования: ^a HEK293T и HCT116 (Kim et al., 2011), ^б HEK293T (Wagner et al., 2011), ^в HELA (Meierhofer et al., 2008) и ^г K562 (Моисеева и др., 2010б).

ности определены 284 белка, из них 35 — протеасомные белки.

Как уже упоминалось, iTRAQ-масс-спектрометрия — количественный анализ белка, поэтому мы можем определить соотношение между количеством белка в разных препаратах. Данные такого сравнительного анализа протеасомных белков в препаратах протеасом, очищенных из цитоплазмы и кондиционированной клетками среды, представлены в табл. 2. Интересно, что количество субъединиц 20S протеасомы в среде в 2 раза выше, чем в цитоплазме, однако белков 19S регулятора, напротив, почти в 1.5 раза меньше. Это означает, что в среде популяция протеасом обогащена 20S протеасомами и (или) 19S комплекс заменен на другой протеасомный регулятор, например 11S или PA200 комплексы, что также подтверждается повышенным содержанием этих регуляторов в среде (табл. 2).

Результаты масс-спектрометрического исследования показали, что некоторые субъединицы внеклеточных протеасом подвергаются ацетилированию и убиквитинированию (табл. 3). Мы впервые идентифицировали несколько сайтов убиквитинирования на субъединицах $\alpha 2$, $\alpha 4$ и $\alpha 6$. Нам также удалось обнаружить новый сайт ацетилирования на субъединице Rpn6. Мы не обнаружили ранее опубликованного убиквитинирования субъединиц $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ и $\beta 1$ в клетках K562 (Моисеева и др., 2010б), что, скорее всего, свидетельствует о разнице в физиологическом состоянии клеток, а также зависит от способа очистки протеасом и метода детекции этой ПТМ.

Мы сгруппировали белки, взаимодействующие с внеклеточными протеасомами, в соответствии с их функциями в клетке согласно базе данных UniProt, и оказалось, что помимо ассоциированных с УПС белков мы наблюдаем белки, участвующие в регуляции транскрипции и репликации, в репарации ДНК и в ответе на повреждение ДНК, в сплайсинге и процессинге РНК, в трансляции, передаче сигнала и транспорте (табл. 1; рис. 2). Кроме того, часть ассоциированных с протеасомами белков — это шапероны, белки цитоскелета и миофибриллярные белки, а также белки, участвующие в клеточном метаболизме. Основные сформированные нами группы взаимодействующих белков состоят из белков, участвующих в метаболизме (21 %), трансляции (15 %), транскрипции и репликации (11 %), сплайсинге и процессинге РНК (11 %), а также в передаче сигнала и транспорте (11 %).

Для нас не стал сюрпризом тот факт, что в числе взаимодействующих с протеасомами белков присутствует большое количество белков, участвующих в клеточном метаболизме, поскольку, согласно нашим ранним данным по связыванию *in vitro* белков с протеасомной субъединицей PSMA3 ($\alpha 7$), эта группа белков также была внушительной (Fedorova et al., 2011). Кроме того, при изучении белков, взаимодействующих с протеасомами дрожжей (Guerrero et al., 2006) и крыс (Besche et al., 2009), также были обнаружены белки этой функциональной группы. Однако в силу недостатка данных мы не можем ответить на вопрос о том, являются эти белки регу-

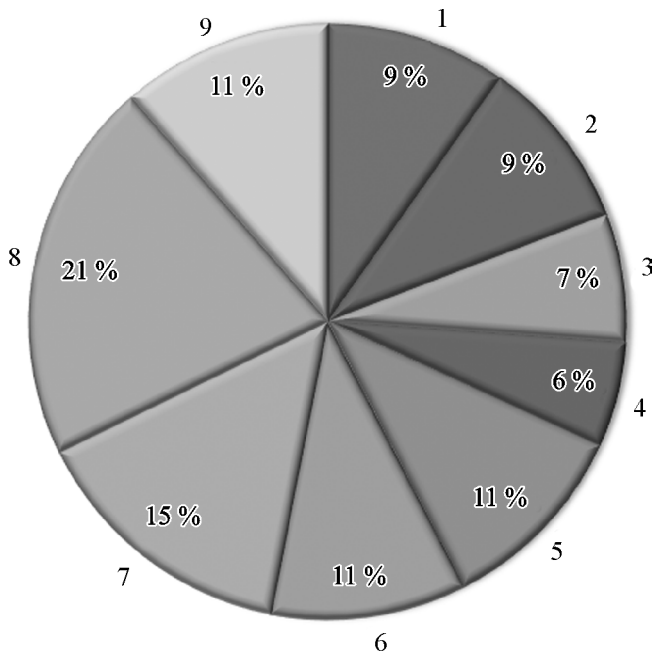


Рис. 2. Диаграмма распределения по функциональным группам белков, ассоциированных с внеклеточными протеасомами.

1 — белки, ассоциированные с УПС (9 % от общего количества ассоциированных с протеасомами белков), 2 — шапероны (9 %), 3 — цитоскелет и миофибрилярные белки (7 %), 4 — белки, участвующие в репарации ДНК и в ответе на повреждения ДНК (4 %), 5 — белки, участвующие в транскрипции и репликации (11 %), 6 — белки, осуществляющие сплайсинг и процессинг РНК (11 %), 7 — вовлеченные в трансляцию белки (15 %), 8 — белки-участники клеточного метаболизма (21 %), 9 — белки, осуществляющие передачу сигнала и транспорт (11 %).

ляторами или они предназначены для деградации протеасомами.

Факт идентификации в числе белков, ассоциированных с протеасомами, шаперонов и белков цитоскелета также не противоречит литературным данным (Goldberg, 2003; Besche et al., 2009; Scanlon et al., 2009; Tai et al., 2010; Fedorova et al., 2011). Однако это можно также объяснить контаминацией в процессе выделения и очистки наших протеасом с белками цитоскелета и миофибрилярными белками в силу повышенного содержания их в клетке. Шапероны, как полагают, обеспечивают правильную сборку самих протеасом (Цимоха, 2010) и облегчают взаимодействие белков-мишеней с протеасомами (Goldberg, 2003).

Интересен тот факт, что мы видим в числе наших групп белки, участвующие в сплайсинге и процессинге РНК (рис. 2). В нашем раннем исследовании белков, связывающихся *in vitro* с протеасомной субъединицей PSMA3 ($\alpha 7$), мы также обнаружили белки этой группы (Fedorova et al., 2011). Более того, мы показали участие протеасом в альтернативном сплайсинге *in vitro* (Fedorova et al., 2011).

В литературе также встречаются данные о взаимодействии с протеасомами белков, участвующих в транскрипции, трансляции или репарации ДНК (Besche et al., 2010; Tai et al., 2010). Авторы предполагают регуляторное значение данных белков, однако не отрицают вероятность того, что ассоциация этих белков с протеасомами объясняется их последующей деградацией протеасомами.

Несмотря на высокую достоверность используемого нами метода iTRAQ-масс-спектрометрии, мы подтвердили результаты масс-спектрометрии Вестерн-блотингом с использованием специфических антител к выбранным

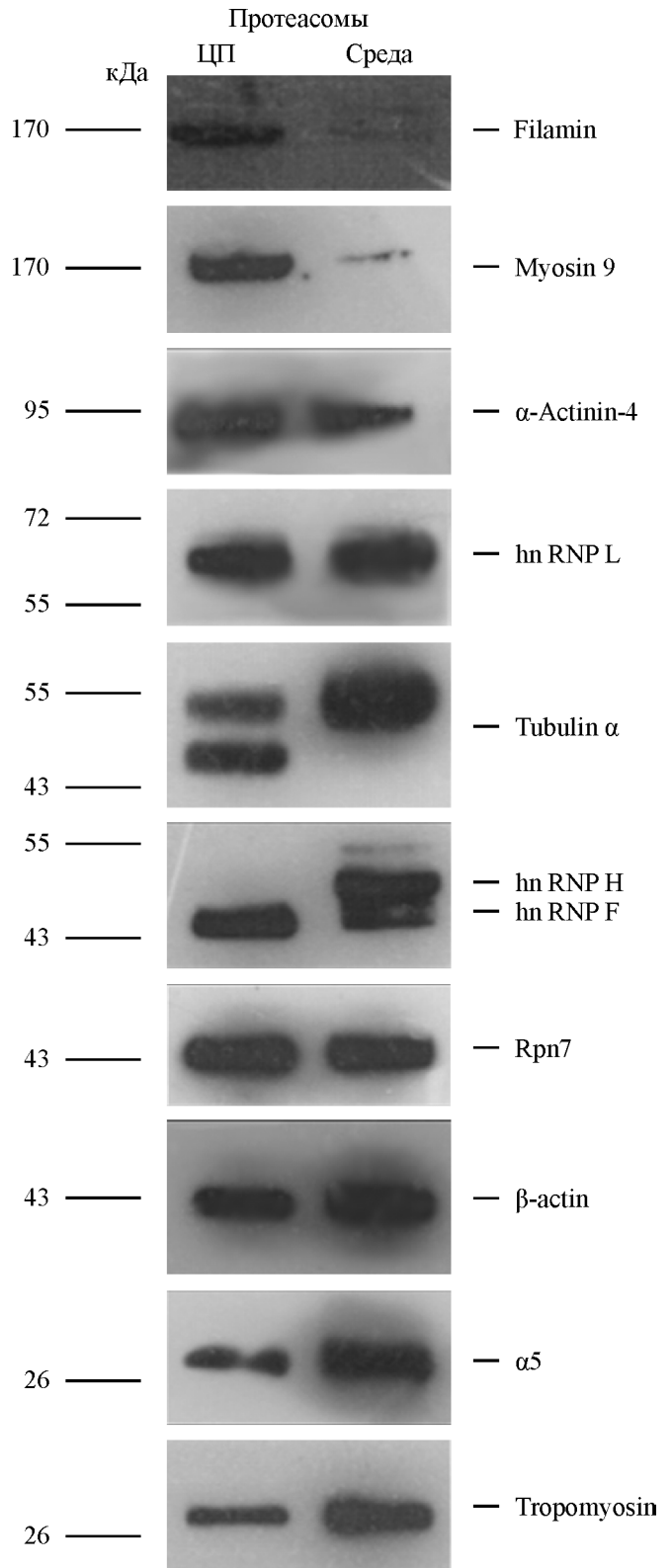


Рис. 3. Вестерн-блот белков, ассоциированных с цитоплазматическими (ЦП) и внеклеточными (Среда) протеасомами.

нами случайным образом белкам (рис. 3). Мы использовали антитела к белкам цитоскелета Filamin-A, Myosin-9, Alpha-actinin-4, Beta-actin, Tubulin alpha, Tropomyosin alpha-3, протеасомным белкам Rpn7, $\alpha 5$ и белкам hnRNP L, hnRNP F/H, которые участвуют в сплайсинге. Мы срав-

нивали белки, ассоциированные с протеасомами, очищенными из среды и цитоплазмы. Как оказалось, все белки, которые мы анализировали Вестерн-блоттингом, взаимодействуют с протеасомами. Интересен тот факт, что с протеасомами из среды ассоциируются больше такие белки, как Tubulin alpha, hnRNP H и Тропомыозин alpha-3, в то время как в цитоплазме с протеасомами взаимодействуют Filamin-A и Myosin-9. Мы обратили внимание на тот факт, что Tubulin alpha в цитоплазме представлен двумя изоформами (рис. 3), что может быть обусловлено протеолизом белка протеасомами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-01234 и 12-04-01397), федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (№ 16.740.11.0366, 8280 и 8787) и правительства Санкт-Петербурга.

Список литературы

- 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., Миттенберг А. Г., Ермолаева Ю. Б., Цимоха А. С., Волкова И. В., Евтеева И. Н., Кожухарова И. В., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2004. Специфичность популяции протеасом, экскретируемых из клеток в культуральную среду. Докл. РАН. 399 (5) : 503—506.
- Моисеева Т. Н., Миттенберг А. Г., Барлев Н. А. 2010а. Протеасомы и их роль в регуляции транскрипции. Цитология. 52 (3) : 195—203.
- Моисеева Т. Н., Фёдорова О. А., Цимоха А. С., Миттенберг А. Г., Барлев Н. А. 2010б. Влияние убиквитинилирования на пептидазные активности протеасом при генотоксическом стрессе. Докл. РАН. 435 (2) : 267—271.
- Цимоха А. С. 2010. Протеасомы: участие в клеточных процессах. Цитология. 52 (4) : 277—300.
- Albright J. M., Romero J., Saini V., Sixt S. U., Bird M. D., Kovacs E. J., Gamelli R. L., Peters J., Majetschak M. 2009. Proteasomes in human bronchoalveolar lavage fluid after burn and inhalation injury. J. Burn. Care Res. 30 : 948—956.
- Besche H. C., Haas W., Gygi S. P., Goldberg A. L. 2009. Isolation of mammalian 26S proteasomes and p97/VCP complexes using the ubiquitin-like domain from HHR23B reveals novel proteasome-associated proteins. Biochemistry. 48 : 2538—2549.
- Craig R., Beavis R. C. 2004. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. Bioinformatics. 20 : 1466—1467.
- Fedorova O. A., Moiseeva T. N., Nikiforov A. A., Tsimokha A. S., Livinskaya V. A., Hodson M., Bottrill A., Evteeva I. N., Ermolayeva J. B., Kuznetzova 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—65.
- Gazzah A. C., Camoin L., Abid S., Bacha H., Ladjimi M. 2012. iTRAQ: a method to elucidate cellular responses to mycotoxin zearalenone. J. Appl. Toxicol. doi: 10.1002/jat.1766.
- Goldberg A. L. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. Nature. 426 : 895—899.
- Guerrero C., Tagwerker C., Kaiser P., Huang L. 2006. An integrated mass spectrometry-based proteomic approach: Quantitative analysis of tandem affinity-purified *in vivo* cross-linked protein complexes (qtax) to decipher the 26 S proteasome-interacting network. Mol. Cell. Proteomics. 5 : 366—378.
- Henry L., Lavabre-Bertrand T., Vercambre L., Ramos J., Carillo S., Guiraud I., Poudroux P., Bismuth M., Valats J. C., Demattei C., Duny Y., Chaze I., Funakoshi N., Bureau J. P., Dures J. P., Blanc P. 2009. Plasma proteasome level is a reliable early marker of malignant transformation of liver cirrhosis. Gut. 58 : 833—838.
- Hough R., Pratt G., Rechsteiner M. 1987. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysates. J. Biol. Chem. 262 : 8303—8313.
- Kim W., Bennett E. J., Huttlin E. L., Guo A., Li J., Possemato A., Sowa M. E., Rad R., Rush J., Comb M. J., Harper J. W., Gygi S. P. 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. Mol. Cell. 44 : 325—340.
- Konstantinova I. M., Tsimokha A. S., Mittenberg A. G. 2008. Role of proteasomes in cellular regulation. Int. Rev. Cell. Mol. Biol. 267 : 59—124.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Lavabre-Bertrand T., Henry L., Carillo S., Guiraud I., Ouali A., Dutaud D., Aubry L., Rossi J. F., Bureau J. P. 2001. Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies. Cancer. 92 : 2493—2500.
- Meierhofer D., Wang X., Huang L., Kaiser P. 2008. Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry. J. Proteome Res. 7 : 4566—4576.
- Murakami Y., Matsufuji S., Hayashi S., Tanahashi N., Tanaka K. 2000. Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. Biochem. Biophys. Res. Commun. 267 : 1—6.
- Perkins D. N., Pappin D. J. C., Creasy D. M., Cottrell J. S. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis. 20 : 3551—3567.
- Scanlon T. C., Gottlieb B., Durcan T. M., Fon E. A., Beitel L. K., Trifiro M. A. 2009. Isolation of human proteasomes and putative proteasome-interacting proteins using a novel affinity chromatography method. Exp. Cell Res. 315 : 176—189.
- Searle B. C. 2010. Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. Proteomics. 10 : 1265—1269.
- Sixt S. U., Adamzik M., Spyrcak D., Saul B., Hakenbeck J., Wohlschlaeger J., Costabel U., Kloss A., Giesebrecht J., Dahlmann B., Peters J. 2009. Alveolar extracellular 20S proteasome in patients with acute respiratory distress syndrome. Amer. J. Respir. Crit. Care Med. 179 : 1098—1106.
- Sixt S. U., Beiderlinden M., Jennissen H. P., Peters J. 2007. Extracellular proteasome in the human alveolar space: a new housekeeping enzyme? Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 292 : 1280—1288.
- Sixt S. U., Dahlmann B. 2008. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin — incidence and relevance. Biochim. biophys. acta. 1782 : 817—823.
- Sixt S. U., Peters J. 2010. Extracellular alveolar proteasome: possible role in lung injury and repair. Proc. Amer. Thorac. Soc. 7 : 91—96.
- Stoebner P. E., Lavabre-Bertrand T., Henry L., Guiraud I., Carillo S., Dandurand M., Joujoux J. M., Bureau J. P., Meunier L. 2005. High plasma proteasome levels are detected in patients with metastatic malignant melanoma. Br. J. Dermatol. 152 : 948—953.
- Tai H. C., Besche H., Goldberg A. L., Schuman E. M. 2010. Characterization of the brain 26S proteasome and its interacting proteins. Front. Mol. Neurosci. 3 : 12.
- Toutou R., Richardson J., Bose S., Nakanishi M., Rivett J., Allday M. J. 2001. A degradation signal located in the C-terminus of p21^{WAF1/CIP1} is a binding site for the C8 alphasubunit of the 20S proteasome. EMBO J. 20 : 2367—2375.
- Wagner S. A., Beli P., Weinert B. T., Nielsen M. L., Cox J., Mann M., Choudhary C. 2011. A proteome-wide, quantitative survey of *in vivo* ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. Mol. Cell. Proteomics. 10 : M111.013284.
- Zhang M., Pickart C. M., Coffino P. 2003. Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. EMBO J. 22 : 1488—1496.
- Zoeger A., Blau M., Egerer K., Feist E., Dahlmann B. 2006. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. Clin. Chem. 52 : 2079—2086.

CHARACTERIZATION OF THE EXTRACELLULAR PROTEASOMES
AND ITS INTERACTING PROTEINS BY iTRAQ MASS SPECTROMETRY

Yu. Ya. Zaykova,^{1,2} V. A. Kulichkova,¹ Yu. B. Ermolaeva,¹ A. Bottrill,³ N. A. Barlev,^{1,3,4} A. S. Tsimokha,¹*

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, ² St. Petersburg State Polytechnical University,

³ University of Leicester, Leicester, UK, and ⁴ St. Petersburg State Institute of Technology;

* e-mail: atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru

The analysis of the extracellular proteasomes by isobaric tagging for relative and absolute quantifications (iTRAQ) mass spectrometry has been carried out. Here we show a standard set of 26S proteasomal subunits in the composition of the extracellular proteasomes. Moreover, extracellular proteasomes have a number of PA200 activators, which, as previously thought, are localized in the cell nucleus. Posttranslational modifications (PTMs) of subunits of the extracellular proteasomes were revealed by iTRAQ mass spectrometry. For the first time we have identified several ubiquitination and acetylation sites on subunits $\alpha 2$ (K196), $\alpha 4$ (K189 and K234), $\alpha 6$ (K217), and Rpn6 (A2). We have revealed a large number of proteasome-interacting proteins that are involved in various cell processes, such as transcription, DNA repair, translation, cytoskeletal proteins and the proteins of the ubiquitin-proteasome system (UPS). Immunoblot analysis has confirmed the interactions between purified extracellular proteasomes and nine proteins which were randomly selected from the set of interacting proteins.

Key words: extracellular proteasomes, iTRAQ mass spectrometry, posttranslational modifications, ubiquitination.
