

## СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕАСОМ И ОЦЕНКА ИХ ПЕПТИДАЗНЫХ АКТИВНОСТЕЙ

© Ю. Я. Зайкова,<sup>1</sup> В. А. Куличкова,<sup>1</sup> К. А. Митенкова,<sup>2</sup> А. С. Цимоха<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и

<sup>2</sup>С.-Петербургский государственный политехнический университет;

\* электронный адрес: [atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru)

В настоящей работе проведен сравнительный анализ аффинного связывания и биохимических способов выделения и очистки протеасом из среды культивирования человеческих эритролейкемических лимфобластных клеток линии K562. Полученные результаты позволили нам выделить и очистить протеасомы из образцов кондиционированной клетками культуральной среды и оценить качество получаемых препаратов протеасом на всех этапах их выделения. Внеклеточные протеасомы, очищенные с помощью различных подходов, обладают всеми тремя типами пептидазных активностей, присущими внутриклеточным частицам.

Ключевые слова: внеклеточные протеасомы, пептидазные активности, регулируемый протеолиз, убиквитин-протеасомная система.

Принятые сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель, ПЦР — полимеразная цепная реакция, TEV — вирус табачной мозаики, НТВН — сложный полипептид, состоящий из двух последовательностей из шести гистидинов (Н), специфического сайта расщепления TEV протеазой (Т) и сигнальной последовательности для биотинилирования *in vivo* (В).

Убиквитин-протеасомная система осуществляет протеолиз и процессинг различных регуляторных белков, принимающих участие в многочисленных клеточных процессах (регуляция транскрипции, репарация ДНК, продвижение клетки по клеточному циклу, иммунный ответ, апоптоз) (Konstantinova et al., 2008; Моисеева и др., 2010; Цимоха, 2010). Протеолитическим «ядром» системы является мультисубъединичный белковый комплекс 26S протеасома, который часто называют просто протеасомой. 26S протеасома имеет вид симметричной гантелеобразной структуры, состоящей из 20S протеасомы, корового цилиндрического ядра и одного или двух 19S регуляторных комплексов. 20S протеасома представляет собой полый цилиндр, образованный четырьмя семичленными кольцами: два внутренних кольца собраны из субъединиц  $\beta$ -типа, два внешних — из субъединиц  $\alpha$ -типа. Три  $\beta$ -субъединицы ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$ ) ответственны за протеолитическую активность протеасом (активности по типам трипсина, химотрипсина и каспаза-подобная); основными функциями  $\alpha$ -кольца являются регулирование доступа субстрата в протеолитическую камеру 20S протеасомы и взаимодействие с 19S регуляторными комплексами (и другими регуляторами) (Цимоха, 2010).

В последнее время в литературе появляется все больше данных о присутствии протеасом во внеклеточном пространстве (Sixt, Dahlmann, 2008; Sixt, Peters, 2010; Зайкова и др., 2013а). С помощью метода электронной микроскопии показано, что внеклеточные протеасомы имеют аналогичную клеточным частицам цилиндриче-

скую структуру, с одного или двух концов ограниченную регуляторными комплексами (Zoeger et al., 2006). Выявлены различия в количестве протеасом, экспортируемых из клеток крови в плазму крови, например при опухолевой трансформации (Lavabre-Bertrand et al., 2001; Stoebner et al., 2005; Henry et al., 2009), и в альвеолярное пространство при дыхательной недостаточности и во время воспалительных процессов в легких (Sixt et al., 2007; Albright et al., 2009; Sixt et al., 2009).

Биологические функции внеклеточных протеасом в настоящее время неясны (Зайкова и др., 2013а). Предполагается, что накопление этих структур в межклеточном пространстве связано прежде всего с необходимостью удаления накапливающихся во внеклеточном пространстве белков, активации секретируемых клеткой белков-предшественников, а также процессинга антигенов (Sixt, Dahlmann, 2008).

В исследованиях, упомянутых выше, авторы проводили только оценку количества внеклеточных протеасом и удельной протеолитической активности внеклеточных фракций образцов, взятых из разных тканей и органов. Анализа непосредственно внеклеточных протеасом до сих пор не проводили в силу методических проблем, которые характерны для такого рода исследований и связаны с крайне малым количеством получаемых препаратов протеасом, а также с риском загрязнения исследуемого материала сывороточными белками (Зайкова и др., 2011). Можно ожидать, что использование новых методических подходов для получения и очистки внеклеточных протеасом позволит получить новую информацию как о меха-

низмах секреции протеасом клетками, так и о функциональном значении этого процесса.

В данной работе мы поставили перед собой задачу разработать методы очистки протеасом, секретируемых трансформированными клетками человека в системе *in vitro*. Особое внимание уделяли определению пептидазных активностей внеклеточных протеасом в сравнении с активностями внутриклеточных частиц.

### Материал и методика

Эритролейкемические лимфобластные клетки человека линии K562 и клетки почки эмбриона человека линии HEK293, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН), культивировали при 37 °С в средах RPMI 1640 и DMEM соответственно, содержащих 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, в присутствии гентамицина или пенициллин-стрептомицина.

Экспрессионную конструкцию получили на основе вектора pQCXIP (Clontech, США), в который по сайтам NotI и EcoRI вставлена последовательность hPSMD14-НТВН (любезно предоставлен д-ром Л. Хуангом).

Трансфекцию клеток линии HEK293 проводили с помощью реагента TurboFect (MBI Fermentas, Литва) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя, одновременно вводя плазмиды, необходимые для сборки вирусной частицы, и ретровирусную плазмиду pQCXIP, кодирующую hPSMD14-НТВН. Через 24 ч после постановки трансфекции производили замену трансфекционной среды на новую. Супернатант, содержащий вирусные частицы, собирали в течение последующих 2 сут.

Инфекцию клеток линии K562 проводили ретровирусами, несущими hPSMD14-НТВН. Через 16 ч после инфицирования производили замену трансфекционной среды на новую, содержащую антибиотик пурамицин (Invitrogen, США). Селекцию клеток проводили в течение 9 сут.

Протеасомы выделяли из цитоплазмы и кондиционированной клетками ростовой среды с помощью двух подходов: центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы (15—30 %) с последующей ионообменной хроматографией на целлюлозе DE-52 (Hough et al., 1987) и аффинного связывания в соответствии с методикой, описанной ранее (Wang et al., 2007).

Для приготовления клеточного экстракта клетки промывали холодным PBS и лизировали в буфере А (50 mM Na-фосфат, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10%-ный глицерин, 5 mM АТФ, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % NP-40, ингибиторы протеаз) в течение 30 мин при 4 °С. Клеточные фрагменты удаляли центрифугированием при 13 тыс. об/мин в течение 30 мин при 4 °С.

Вестерн-блоттинг белков с применением вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, выполняли, следуя рекомендациям фирмы-производителя (Sigma, США). Пероксидазу выявляли с помощью кита SuperSignal (Pierce, США). Белки фракционировали в денатурирующем 13%-ном ПААГ (Laemmli, 1970). Полученные фракции электрофоретически переносили на фильтры PVDF (BioRad, США) в буфере, содержащем 25 mM Трис-HCl, 190 mM глицина, 0.05 % додецилсульфата натрия и 20 % метанола, pH 7.3. Мембрану отмывали в буфере TBS (10 mM Трис-HCl, pH 7.5, и 150 mM

NaCl) и блокировали центры неспецифического связывания антител 2.5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина или 5%-ным обезжиренным молоком в этом же буфере. Избыток блокирующего агента отмывали PBS и мембрану инкубировали с конъюгированными с пероксидазой хрена антителами против биотина (Cell Signaling, США), с моноклональными антителами против GAPDH (Millipore, США) или со специфическими антителами против соответствующих субъединиц 26S протеасомы (Enzo, США).

Пептидазную активность протеасом химо-трипсин-подобного типа определяли по гидролизу флуорогенного пептида Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Enzo, США). Для этого 0.4 mM субстрат инкубировали с 1 мкг протеасом в течение 45 мин при 37 °С в буферном растворе, содержащем 50 mM Трис-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM DTT и 5 mM АТФ. Реакцию останавливали, добавляя равный объем смеси 70 mM уксусной кислоты, 100 mM хлорацетата натрия и 30 mM ацетата натрия. Концентрацию продукта гидролиза AMC (7-амино-4-метилкумарина) определяли на флуориметре VersaFluor (BioRad, США), измеряя экстинкцию и эмиссию при длинах волн 365 и 440 нм соответственно (Bargrett, 1980).

Использованные реактивы. В работе использовали среды RPMI 1640 и DMEM, глутамин, сыворотку плодов коров, пенициллин-стрептомицин, гентамицин, трипсин и PBS (Биолот, Россия); пурамицин (Invitrogen, США); Opti-MEM (Gibco, США); кумасси G-250 (Serva, Германия); Na-хлорацетат, метанол, этанол, уксусную кислоту, соляную кислоту, глицерин, KCl и NaOH (Россия); акриламид, дитиотреитол, трис-гидроксиметиламинометан, глицин, MgCl<sub>2</sub>, АТФ, додецилсульфат натрия, β-меркаптоэтанол, персульфат аммония и NaCl (Amresco, США); метилен-бис-акриламид, ЭДТА, фенилметилсульфонилфторид, ТЕМЕД, tween-20, ацетат натрия, бычий сывороточный альбумин, конъюгированные с пероксидазой хрена козы антитела против иммуноглобулинов мыши и козы антитела против иммуноглобулинов кролика и TEV-протеаза (Sigma, США); NaCl и ацетат натрия (Merck, Германия); TurboFect и кит для выделения ДНК (MBI Fermentas, Литва); флуорогенные пептиды Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Ac-Arg-Leu-Arg-AMC и Z-Leu-Leu-Glu-AMC, антитела против субъединиц 26S протеасомы Rpn7 и α5 (Enzo, США); конъюгированные с пероксидазой хрена антитела против биотина (Cell Signaling, США); кит SuperSignal (Pierce, США).

### Результаты и обсуждение

В литературе описаны разнообразные способы выделения и очистки внутриклеточных протеасом (Leggett et al., 2005). Все они имеют в своей основе один из двух подходов: биохимический способ очистки протеасом, который основывается на фракционировании белков с помощью ступенчатого высаливания, ультрацентрифугирования и хроматографических методик, и очистка путем аффинного связывания на сорбенте. Каждый из подходов имеет свои преимущества и свои недостатки. Главное преимущество аффинного способа очистки состоит в скорости получения очищенных протеасом: требуется несколько часов вместо нескольких дней.

Аффинная очистка белка была основана на маркировке протеасомной субъединицы Rpn11 полипептидной по-

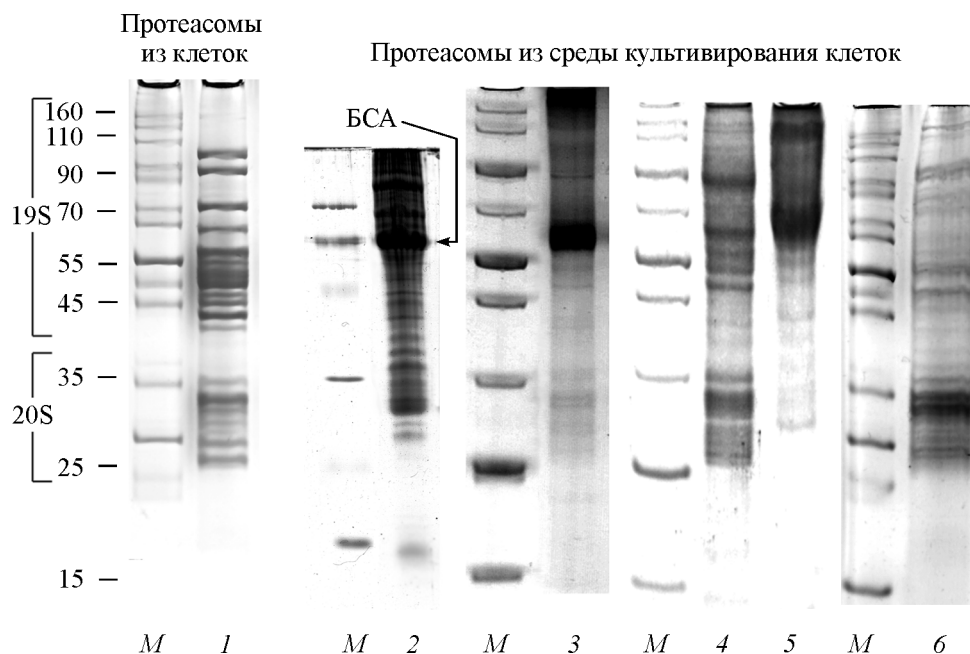


Рис. 1. Картина распределения протеасомных белков в системе электрофореза в присутствии SDS.

Протеасомы выделены из клеток K562 (1) и кондиционированной клетками K562 среды (2–6); M — маркеры молекулярных масс. Клетки культивировали в течение ночи в стандартных условиях в присутствии 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (2, 3, 5), в минимальной среде (4) и в среде Orti-MEM (6). Протеасомы выделяли с помощью биохимического подхода (2–4) и за счет аффинного связывания (1, 5, 6). В одном из вариантов эксперимента клетки дополнительно инкубировали в присутствии 2.5 мМ дитиотрейтола перед хроматографическим этапом биохимической очистки протеасом (3).

следовательностью НТВН, которая несет в себе две последовательности из шести гистидинов (Н), сайт для расщепления TEV-протеазой (Т) и биотин-подобную последовательность (В). Белок прочно связывается с авидином, что позволяет выделять протеасомы на авидиновом носителе с последующей элюцией с носителя с помощью расщепления TEV-протеазой (Wang et al., 2007).

Клетки линии K562 считаются трудно трансфицируемыми, поэтому для доставки генной конструкции использовали ретровирусный вектор rQCXIP, который используется в инфекционной доставке конструкций в клетки. На начальном этапе генетическая конструкция rQCXIP-PSMD14-НТВН трансфицировалась в клетки НЕК293 липофильным методом. Среда культивирования клеток НЕК293, содержащую вирусные частицы, собирали через 2 сут после трансфекции и добавляли к клеткам K562. Через 1 сут после инфекции начинали селекцию клеток K562 при концентрации пуромицина 5 мкг/мл, которая длилась 9 сут. Анализ экспрессии рекомбинантного белка в прошедших селекцию клетках K562, экспрессирующих белок PSMD14-НТВН, анализировали с помощью вестерн-блоттинга с антителами против биотина (результат не представлен). Картина распределения в системе электрофореза в присутствии SDS очищенных протеасом из клеток K562, экспрессирующих белок PSMD14-НТВН, показана на рис. 1 (дорожка 1) и аналогична представленной ранее (Wang et al., 2007).

Контроль за качеством выделения и очистки внеклеточных протеасом велся по трем направлениям: картина распределения протеасомных белков в системе электрофореза в присутствии SDS в сравнении с картиной распределения аффинно-очищенных внутриклеточных протеасом (рис. 1, дорожка 1), демонстрация протеасомных антигенов и наличие характерных для протеасом пептидазных активностей.

Внеклеточные протеасомы выделяли из среды культивирования клеток с помощью ступенчатого высаливания, ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахарозы (15–30 %) и анионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 или с помощью аффинной очистки белка.

Основная проблема при выделении протеасом из среды культивирования клеток — загрязнение материала сывороточными белками, в частности бычьим сывороточным альбумином (BCA) (рис. 1, дорожки 2, 3 и 5). Для решения данной проблемы мы ввели после этапа ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы дополнительную инкубацию материала в буферном растворе в присутствии 2.5 мМ дитиотрейтола. Мы добились некоторого уменьшения загрязнения (рис. 1, дорожка 3), но степень очистки материала все равно оставалась недостаточной (рис. 1, дорожки 1 и 3). Кроме того, как было показано позже, в случае дополнительной инкубации в присутствии 2.5 мМ дитиотрейтола большая часть протеасом диссоциировала на 19S регуляторы и 20S комплексы (результаты не представлены). Еще один вариант решения проблемы присутствия сывороточных белков в протеасомах состоит в удалении из среды культивирования сыворотки, необходимой для активного роста любой клеточной культуры (рис. 1, дорожка 4). Для этого клетки выращивали при стандартных условиях до достижения максимальной плотности клеток на единицу объема среды. Далее клетки промывали PBS, чтобы удалить компоненты сыворотки, и инкубировали в течение ночи в минимальной среде (без сыворотки) в стандартных условиях. Однако длительное культивирование в минимальной среде приводило к массовой гибели клеток, что выражалось присутствием клеточных белков (например, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы — GAPDH) в среде культивирования (рис. 2, дорожка 4), и, следовательно, к

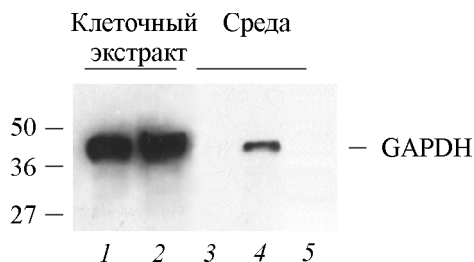


Рис. 2. Иммунохимическое выявление клеточного белка GAPDH в клетках K562 (1) и в кондиционированной клетками K562 среде (2—5).

Клетки культивировали в течение ночи в стандартных условиях в присутствии 10 % FBS (1, 3), в минимальной среде (2, 4) и в среде Opti-MEM (5).

появлению во внеклеточной протеасомной популяции примеси клеточных протеасом в результате массового выхода во внеклеточное пространства всех внутриклеточных белков из погибших клеток. Поэтому мы решили использовать аффинный подход при очистке протеасом из полной среды, кондиционированной клетками, полагая, что сможем избежать присутствия сывороточных белков в аффинно-очищенных внеклеточных протеасомах. Желаемого результата, к сожалению, мы не достигли (рис. 1, дорожка 5), поэтому при аффинной очистке протеасом вместо минимальной среды использовали обогащенную бессывороточную среду Opti-MEM (Invitrogen, США). При этом было отмечено резкое уменьшение количества мертвых клеток (рис. 2, дорожка 5), что позволило нам получить внеклеточные протеасомы удовлетворительной степени очистки в соответствии с общепринятой картиной распределения протеасомных белков в системе электрофореза в присутствии SDS (рис. 1, дорожки 1, б).

Анализ присутствия протеасомных антигенов в полученных нами препаратах очищенных внеклеточных протеасом представлен на рис. 3. Количество белка, наносимое на одну дорожку геля, выравнивали по методу Бредфорд, антигены выявляли методом иммуноблоттинга согласно стандартному протоколу с помощью специфических антител к протеасомным белкам 19S регуляторного комплекса Rpn7 и 20S протеасомы  $\alpha 5$ . Интересно, что в сравнении с клеточными протеасомами в популяции внеклеточных протеасом интенсивность иммунохимического выявления субъединицы Rpn7 заметно ниже (рис. 3), что согласуется с нашими ранними данными о пониженном содержании 19S регуляторного комплекса

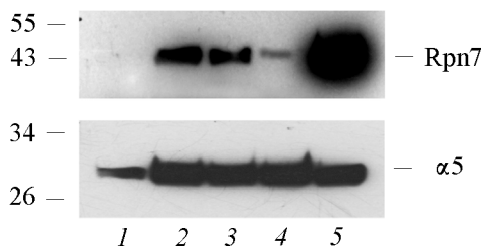


Рис. 3. Иммунохимическое выявление субъединиц 20S протеасомы  $\alpha$ -типа ( $\alpha 5$ ) и 19S регуляторного комплекса (Rpn7) в протеасомах, выделенных и очищенных с помощью биохимического подхода (1, 2) и аффинного очищения (3—5) из кондиционированной клетками K562 среды в присутствии (1, 3) или в отсутствие (2) 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, из среды Opti-MEM (4) и из клеток K562 (5).

протеасом во внеклеточном пространстве (Зайкова и др., 2013б).

При использовании ингибиторов и флуорогенных пептидных субстратов были выявлены три каталитические (пептидазные) активности протеасом: трипсин-, химотрипсин- и каспаза-подобные (Orlowski, Wilk, 2000). Пептидазные активности протеасом ассоциированы с тремя субъединицами  $\beta$ -типа: трипсин-подобная осуществляется субъединицей  $\beta 2$ , химотрипсин-подобная —  $\beta 5$ , каспаза-подобная —  $\beta 1$ .

В настоящее время процесс расщепления белков подробно изучен и описаны взаимодействия между каталитическими центрами на субъединицах коровой 20S протеасомы (Kisselev et al., 1999). Интересно, что протеолиз белка субъединицей  $\beta 5$  значительно стимулирует активность каталитического центра субъединицы  $\beta 1$ , в то время как протеолиз белка субъединицей  $\beta 1$  приводит к ингибированию трипсин-подобной активности. Авторы

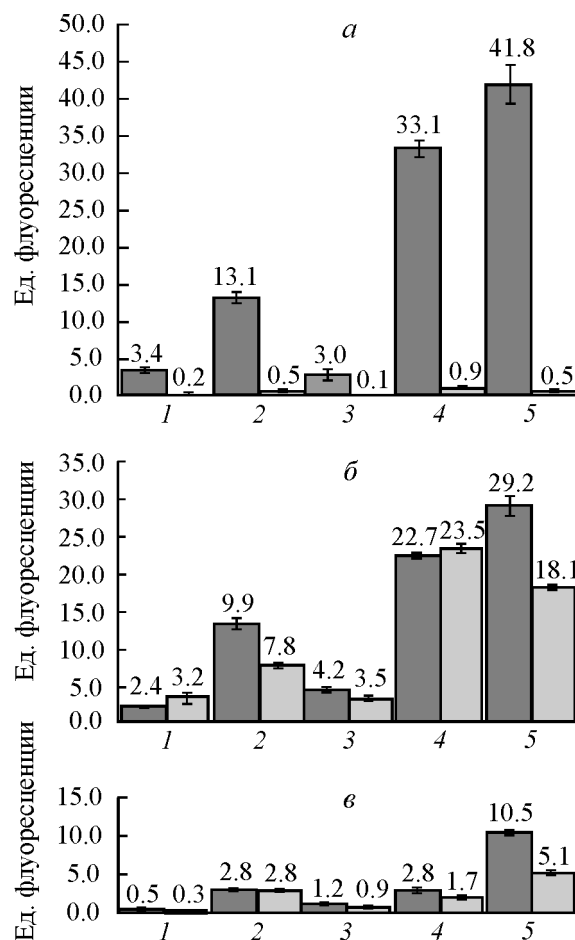


Рис. 4. Пептидазные активности протеасом, выделенных и очищенных с помощью биохимического подхода (1, 2) и аффинного очищения (3—5) из кондиционированной клетками K562 среды в присутствии 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (1, 3), в отсутствие эмбриональной телячьей сыворотки (2), среды Opti-MEM (4) и клеток K562 (5).

*а* — химотрипсин-подобная активность, *б* — трипсин-подобная активность, *в* — каспаза-подобная активность. На гистограммах показаны средние значения и стандартные отклонения трех независимых определений флуоресценции освобожденного (7-амино)-4-метилкумарина; 100 ед. флуоресценции соответствуют освобождению 50 пмоль продукта; концентрация протеасом в пробах составляет 1 мкг. Темные столбики — пептидазные активности в препаратах протеасом, светлые столбики — в препаратах протеасом с добавлением MG132.

полагают, что циклический механизм деградации белков начинается с начального расщепления по типу химотрипсина, что запускает весь каскад протеолитического расщепления белкового субстрата. Таким образом, химотрипсин-подобную активность считают определяющей в работе протеасом. Наличие у протеасом характерных для них протеолитических активностей в значительной мере определяет их функциональную значимость, поэтому представляется важной оценка влияния способов очистки внеклеточных протеасом на их пептидазную активность.

Активность очищенных внеклеточных протеасом определяли по гидролизу пептидов, специфичных для протеолитических центров протеасом: пептидазную активность протеасом химотрипсин-подобного типа определяли по гидролизу флуорогенного пептида — Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, трипсин-подобного типа — по Ac-Arg-Leu-Arg-AMC, каспаза-подобного — по Z-Leu-Leu-Glu-AMC (Enzo Life Sciences, США). Ранее мы показали, что внеклеточные протеасомы проявляют все три типа пептидазных активностей, характерных для протеасом (Зайкова и др., 2011). В настоящей работе мы также анализировали три типа пептидазных активностей протеасом, выделенные и очищенные с помощью различных подходов из кондиционированной клетками K562 среды (рис. 4). Как и следовало ожидать, оказалось, что чем чище полученный материал внеклеточных протеасом, тем выше их пептидазная активность. Однако следует отметить, что даже аффинно-очищенные протеасомы из кондиционированной клетками среды обладали меньшей активностью по сравнению с клеточными протеасомами (рис. 3). В качестве контроля за специфичностью пептидазной активности мы использовали протеасомный пептидный ингибитор MG132, который подавляет по большей части химотрипсин-подобную активность протеасом, связываясь с гидроксилом N-концевого треонина каталитической субъединицы. Нас удивил тот факт, что MG132 не ингибирует ни трипсин-подобную, ни каспаза-подобную активности внеклеточных протеасом, оказывая при этом выраженное влияние на эти типы активности внутриклеточных протеасом. Однако для объяснения этого явления на сегодняшний день недостаточно данных.

В результате проведенных исследований мы показали, что любой подход в выделении и очистке внеклеточных протеасом требует удаления сывороточных белков из образца, следовательно, сыворотки из среды культивирования клеток. С другой стороны, удаление сыворотки из среды культивирования клеток приводит к их массовой гибели, поэтому для очистки протеасом из среды, кондиционированной клетками, необходимо использовать специальные бессывороточные среды (например, улучшенную минимальную среду Opti-MEM) или к минимальной среде добавлять такие компоненты, как холестерин, прогестерон и инсулин-трансферин-селен-А (Штамм и др., 2012).

Анализ картины распределения протеасомных белков в системе электрофореза в присутствии SDS показал, что наиболее чистые препараты протеасом получают при использовании аффинного связывания.

Показано, что независимо от метода выделения и очистки протеасом из кондиционированной клетками среды внеклеточные протеасомы обладали всеми тремя типами пептидазных активностей. Наибольшей пептидазной активностью, однако, обладали аффинно-очищенные из среды культивирования клеток протеасомы.

Авторы благодарят д.б.н. Н. А. Барлева за неоценимую помощь при подготовке статьи к печати. Мы также благодарим проф. Л. Хуанг за генетическую конструкцию pQCXIP-hRpn11-НТВН.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01397) и федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (№ 8787).

### Список литературы

- Зайкова Ю. Я., Евтеева И. Н., Цимоха А. С. 2013а. Протеасомы и их возможная роль во внеклеточном пространстве. Цитология. 55(11): 753—760. (Zaikova Yu. Ya., Evteeva I. N., Tsimokha A. S. 2013a. Proteasomes and their role in the extracellular space. Tsitologiya. 55: 195—203.)
- Зайкова Ю. Я., Куличкова В. А., Ермолаева Ю. Б., Боттрилл А., Барлев Н. А., Цимоха А. С. 2013б. Характеристика внеклеточных протеасом и ассоциированных с ними белков методом iTRAQ-масс-спектрометрии. Цитология. 55 (1): 111—122. (Zaikova Yu. Ya., Kulichkova V. A., Ermolaeva Yu. B., Bottrill A., Barlev N. A., Tsimokha A. S. 2013. Characterization of extracellular proteasomes and its interacting proteins by iTRAQ mass spectrometry. Cell Tissue Biol. 7: 253—265.)
- 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. (Zaikova Yu. Ya., Kulichkova V. A., Ermolaeva Yu. B., Gause L. N., Tsimokha A. S. 2011. Comparative analysis of extra- and intracellular proteasomes from K562 cells. Cell Tissue Biol. 65: 480—486.)
- Моисеева Т. Н., Миттенберг А. Г., Барлев Н. А. 2010. Роль протеасом в регуляции транскрипции. 52 (3): 195—203. (Moiseeva T. N., Mittenberg A. G., Barlev N. A. 2010. Proteasomes and their role in transcriptional regulation. Tsitologiya. 52 (3): 195—203.)
- Цимоха А. С. 2010. Протеасомы: участие в клеточных процессах. Цитология. 52 (4): 271—300. (Tsimokha A. S. 2010. Proteasomes: their role in cellular processes. Tsitologiya. 52 (4): 271—300.)
- Штамм Т. А., Нарыжный С. Н., Ланда С. Б., Бурдаков В. С., Артамонова Т. О., Филатов М. В. 2012. Получение и анализ экзосом, секретируемых злокачественно трансформированными клетками человека в системах *in vitro*. Цитология. 54 (5): 430—438. (Shtam T. A., Naryzhny S. N., Landa S. B., Burdakov V. S., Artamonova T. O., Filatov M. V. 2012. Purification and *in vitro* analysis of exosomes secreted by malignantly transformed human cells. Cell Tissue Biol. 6: 317—325.)
- 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.
- Barrett A. J. 1980. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. Biochem. J. 187: 909—912.
- Henry L., Lavabre-Bertrand T., Vercambre L., Ramos J., Carrillo S., Guiraud I., Pouderoux P., Bismuth M., Valats J. C., Demattei C., Duny Y., Chaze I., Funakoshi N., Bureau J. P., Daurès 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 lysate. J. Biol. Chem. 262: 8303—8313.
- Kisselev A. F., Akopian T. N., Castillo V., Goldberg A. L. 1999. Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. Mol. Cell. 4: 395—402.

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.

Leggett D. S., Glickman M. H., Finley D. 2005. Purification of proteasomes, proteasome subcomplexes, and proteasome-associated proteins from budding yeast. *Methods Mol. Biol.* 301 : 57—70.

Orlowski M., Wilk S. 2000. Catalytic activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 383 : 1—16.

Sixt S. U., Adamzik M., Spyrka 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 hou-

sekeeping enzyme? *Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292 : L1280—L1288.

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.

Wang X., Chen C. F., Baker P. R., Chen P. L., Kaiser P., Huang L. 2007. Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex. *Biochemistry.* 46 : 3553—3565.

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.

Поступила 25 II 2014

#### EXTRACELLULAR PROTEASOMES PURIFICATION METHODS AND THE EVALUATION OF PROTEASOMAL PEPTIDASE ACTIVITIES

Yu. Ya. Zaykova,<sup>1</sup> V. A. Kulichkova,<sup>1</sup> K. A. Mitenkova,<sup>2</sup> A. S. Tsimokha<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and <sup>2</sup> St. Petersburg State Polytechnical University;  
\* e-mail: atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru

In this paper, we present a comparative analysis of different methods of purification of proteasomes from the culture medium in which proerithroleukemia human K562 cells were grown. The results obtained allowed us to purify proteasomes from samples of conditioned cell culture medium and control the quality of the proteasome preparations at all stages of their separation. Extracellular proteasomes purified via different approaches possess all the three types of peptidase activity described for intracellular counterparts.

**Key words:** extracellular proteasomes, peptidase activities, regulated proteolysis, ubiquitin-proteasome system.