

В КОМПЛЕКСЕ С ОЧИЩЕННЫМИ ПРОТЕАСОМАМИ ОБНАРУЖЕНА УКОРОЧЕННАЯ ФОРМА α -ТУБУЛИНА

© *Е. Ю. Иванова*^{1, 2, *} *Т. О. Артамонова*³ *Ю. Я. Зайкова*²
*М. А. Ходорковский*³ *А. С. Цимоха*^{2, *}

¹ *С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034,*

² *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и*

³ *Центр Нанобиотехнологий С.-Петербургского политехнического университета Петра Великого,
Санкт-Петербург, 195251;*

* *электронные адреса: ivanova.027@gmail.com; atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru*

26S протеасома — мультисубъединичный белковый комплекс, отвечающий за избирательную деградацию белков в клетке. Существует ряд белков с известными и неизвестными функциями, которые постоянно или краткосрочно связываются с 26S протеасомами. Определение белков, взаимодействующих с протеасомами, является одним из важных этапов в понимании функций протеасом в клетке и механизмов их регуляции. На примере клеток миелогенной лейкемии человека линии K562 мы показали с помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии, что с аффинно-очищенными протеасомами ассоциированы такие белки цитоскелета, как актин, α -актинин 4, α - и β -тубулины. Вестерн-блот-анализ показал, что с очищенными из клеток K562 протеасомами ассоциирована укороченная изоформа α -тубулина. Присутствие изоформы α -тубулина в комплексе с аффинно-очищенными протеасомами также обнаружено в человеческих клетках линии HEK293.

Ключевые слова: α -тубулин, аффинная очистка, MALDI-ICR-масс-спектрометрия, протеасома.

Принятые сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель, НТВН — сложный полипептид, состоящий из двух последовательностей из шести гистидинов (H), специфического сайта расщепления TEV-протеазой (T) и сигнальной последовательности для биотинилирования *in vivo* (B).

Мультисубъединичный белковый комплекс, отвечающий за избирательную деградацию белков в клетке, называется 26S протеасомой. 26S протеасома состоит из частицы 20S, обладающей протеолитической активностью, и одного или двух 19S-регуляторных комплексов (Цимоха, 2010). В настоящее время прослеживается связь между патогенезом различных заболеваний, включая нейродегенеративные, аутоиммунные, онкологические, и нарушениями в работе убиквитин-протеасомной системы. Поэтому так важно широкое и комплексное изучение механизма работы убиквитин-протеасомной системы и способов регуляции функционирования протеасом в клетке. Существует ряд белков с известными и неизвестными функциями, которые постоянно или краткосрочно связываются с протеасомами; эти белки условно поделены на две группы — белки убиквитиновой системы и белки, регулирующие активность и функции протеасом за счет прямого связывания. К белкам убиквитиновой системы относятся, например, белки Rad23, Dsk2 и Ddi1, играющие роль в связывании белка Rpn1 основания регуляторного комплекса с полиубиквитиновой цепью с помощью доменов UBL/UBS (Chen, Madura, 2002; Funakoshi et al., 2002; Hartmann-Petersen et al., 2003; Gomez et al., 2011). Белки Hul5/KIAA10, Ufd4, Parkin, Rnf2 и Ubr1 относятся к семейству E3-убиквитин-лигаз и участвуют в процессе полиубиквитинирования (Schmidt et al., 2005). К другим

белкам, связывающимся с протеасомами, можно отнести белки-шапероны семейств Hsp 70 и Hsp90. Благодаря способности узнавать белки, подвергшиеся конформационным изменениям, они принимают участие в распознавании протеасомой аномальных, неправильно свернутых белков (Patterson, Höhfeld, 2008). В комплексе с очищенными протеасомами обнаружен и ряд других белков, однако функциональное значение такого связывания пока неизвестно (Schmidt et al., 2005; Guerrero et al., 2006; Wang et al., 2007; Besche et al., 2009; Tai et al., 2010). Поэтому определение белков, взаимодействующих с протеасомами, является одним из важных этапов в понимании функций протеасом в клетке и механизмов их регуляции.

Согласно нашим данным, полученным с помощью iTRAQ-масс-спектрометрического анализа очищенных с помощью последовательного фракционирования протеасом, было определено 249 ассоциированных с протеасомами белков, среди которых присутствовали такие белки цитоскелета, как α - и β -тубулины, актин, α -актинин, миозин и филламин (Зайкова и др., 2013). Интересно, что подтверждение данных iTRAQ-масс-спектрометрии методом Вестерн-блот-анализа с использованием антител, специфичных α -тубулину (TUBA4A), выявило присутствие укороченной формы α -тубулина с мол. массой около 40 кДа в комплексе с очищенными протеасомами (Зайкова и др., 2013). Важно отметить, что в исследованиях дру-

гих авторов число белков, ассоциированных с очищенными протеасомами, из других клеток и организмов было значительно меньшими и не превышало 50 (Verma et al., 2000; Guerrero et al., 2006; Horiuchi et al., 2006; Wang et al., 2007; Besche et al., 2009; Tai et al., 2010; Wang et al., 2011; Russell et al., 2013). В силу слишком большого числа выявленных нами в комплексе с очищенными протеасомами белков мы предположили, что присутствие укороченной формы α -тубулина могло быть следствием неспецифического взаимодействия, протеолиза или контаминации из-за недостаточной степени очистки протеасомных комплексов.

В современной литературе встречаются различные способы выделения и очистки протеасом (Leggett et al., 2005). Однако в основе всегда лежит один из двух подходов: биохимический способ очистки протеасом или метод аффинного связывания на сорбенте. Биохимический способ основывается на фракционировании белков с помощью центрифугирования, ступенчатом высаливании сульфатом аммония и последующем применении хроматографических методик. Метод аффинной хроматографии основан на слиянии одной из протеасомных субъединиц со специальной меткой, способной специфически взаимодействовать с соответствующим носителем. Основным преимуществом этого метода является скорость получения очищенных протеасом. Кроме того, аффинная хроматография является наиболее подходящей для определения белков, ассоциированных с протеасомами, так как позволяет добиться наиболее высокой степени очистки (Leggett et al., 2005).

Таким образом, перед нами встала задача использовать стратегию аффинной очистки протеасомных комплексов с последующим масс-спектрометрическим анализом белков, ассоциированных с протеасомой. Масс-спектрометрические эксперименты проводили с помощью MALDI-ICR-масс-спектрометра (ионно-циклотронного резонанса с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией), характеризующегося очень высокой точностью и разрешением.

Материал и методика

Клетки миелогенной лейкемии человека линии K562 и клетки почки эмбриона человека линии HEK293, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), культивировали при 37 °С в средах соответственно RPMI-1640 и DMEM, содержащих 10 % сыворотки плодов коров, в присутствии пенициллина и стрептомицина. В экспериментах по аффинной очистке протеасом были использованы стабильные клеточные линии K562/ β 7-НТВН (Артамонова и др., 2014) и HEK293/Rpn11-НТВН (Wang et al., 2007), экспрессирующие рекомбинантные протеасомные белки протеасом β 7 и Rpn11, слитые на С-конце с полипептидом НТВН.

Для приготовления клеточного экстракта клетки промывали охлажденным PBS и лизировали в буфере (50 мМ Na-фосфат, pH 7.5, 100 мМ NaCl, 10 % глицерина, 5 мМ АТФ, 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, 0.5 % NP-40 и ингибиторы протеаз) в течение 30 мин при 4 °С. Клеточные фрагменты удаляли центрифугированием в течение 30 мин при 4 °С.

Выделение протеасом из клеток K562 последовательным фракционированием проводили в соответ-

ствии с методикой, описанной ранее (Tsimokha et al., 2007). Аффинно протеасомы очищали из клеток K562/ β 7-НТВН и HEK293/Rpn11-НТВН согласно описанному ранее протоколу (Wang et al., 2007).

Вестерн-блот-анализ белков с применением вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, выполняли с соблюдением рекомендаций фирмы Sigma (США). Пероксидазу выявляли с помощью набора реактивов 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 мМ Трис-НСl, 190 мМ глицина, 0.05 % додецилсульфата натрия и 20 % метанола, pH 7.3. Мембрану отмывали в буфере PBS и блокировали центры неспецифического связывания 5%-ным обезжиренным молоком в этом же буфере. Избыток блокирующего агента отмывали PBS, мембрану инкубировали с антителами против α -тубулина (Sigma-Aldrich, США), а затем со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США).

MALDI-ICR-масс-спектрометрический анализ проводили согласно описанному ранее протоколу (Артамонова и др., 2014).

Использованные реактивы: среда DMEM, глутамин, сыворотка плодов коров, пенициллин-стрептомицин, трипсин и PBS (Биолот, Россия); Кумасси, G-250 (Serva, Германия); метанол, этанол, уксусная и соляная кислоты, глицерин KCl и NaOH (Россия); акриламид, дитиотрейтол, трис-гидроксиметиламинометан, глицин, MgCl₂, АТФ, додецилсульфат натрия, β -меркаптоэтанол, персульфат аммония и NaCl (Amresco, США); метилен-бис-акриламид, ЭДТА, фенилметилсульфонилфторид, ТЕМЕД, Tween-20, ацетат натрия, обезжиренное молоко, козьи антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена и антитела против α -тубулина (Sigma, США); NaCl и ацетат натрия (Merck, Германия); набор SuperSignal (Pierce, США).

Результаты и обсуждение

Согласно масс-спектрометрическим данным, в комплексе с протеасомами, очищенными из клеток миелогенной лейкемии человека линии K562, был обнаружен α -тубулин (Зайкова и др., 2013). Вестерн-блот-анализ с использованием антител, специфичных к α -тубулину (TUBA4A), показал присутствие в комплексе с очищенными протеасомами укороченной формы α -тубулина с мол. массой, соответствующей 40 кДа, в сравнении с полноразмерной формой α -тубулина в клеточном экстракте с мол. массой, соответствующей 50 кДа (рис. 1). Протеасомы, используемые в эксперименте, были очищены из клеток K562 в соответствии с методикой, которая основывалась на фракционировании последовательным центрифугированием и высаливанием сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией. Такой способ очистки не исключает присутствия в препаратах очищенных протеасом неспецифически соочищающихся белков. Наблюдаемый феномен поэтому требовал дальнейшего подтверждения, потому что присутствие в комплексе с протеасомами короткой формы α -тубулина могло быть результатом неспецифического протеолиза или контаминации.

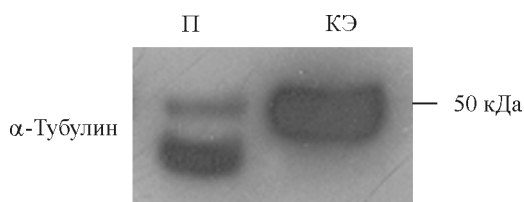


Рис. 1. Вестерн-блот белков, ассоциированных с протеасомами (П), очищенных из клеток линии K562 с помощью последовательного фракционирования.

КЭ — клеточный экстракт.

Мы выбрали аффинный способ очистки протеасом, который позволяет добиться более высокой степени очистки протеасомных комплексов. Протеасомы выделяли из стабильной клеточной линии K562/ β 7-НТВН, экспрессирующей субъединицу 20S протеасомы β 7, меченную по С-концу пептидом НТВН (Артамонова и др., 2014). Пептид включает в себя два фрагмента His6, специфический сайт расщепления протеазой вируса *Tobacco Etch Virus* (TEV-протеазой) и сигнальную последовательность биотинилирования *in vivo* (Wang et al., 2007). Для очистки протеасом использовали метод нековалентного связывания — образование комплекса биотина со стрептавидином с последующей элюцией посредством TEV-протеазы. Протеасомные белки комплексов, очищенных двумя вышеописанными способами, разделяли в системе денатурирующего электрофореза и визуализировали с помощью окрашивания Кумасси G-250 (рис. 2). Можно заметить, что в составе аффинно-очищенных протеасомных комплексов присутствует меньше белков, чем в комплексе с протеасомами, очищенными путем последовательного фракционирования.

Чтобы охарактеризовать белки, ассоциированные с аффинно-очищенными протеасомными комплексами, был проведен MALDI-ICR-масс-спектрометрический анализ. Белки протеасом, аффинно-очищенных из клеток K562/ β 7-НТВН, разделяли в системе денатурирующего электрофореза и визуализировали в геле окраской Кумасси G-250, после чего окрашенные полоски вырезали из геля. Белки, содержащиеся в полосках геля, подвергали воздействию трипсина и анализировали методом MALDI-ICR-масс-спектрометрии. Результаты масс-спектрометрического анализа определили 16 ассоциированных с протеасомами белков, включая такие белки цитоскелета, как актин, α - и β -тубулины, α -актинин 4 (см. таблицу), и это доказывает, что метод аффинной очистки протеасом для дальнейшего анализа этих комплексов с помощью методов масс-спектрометрии или Вестерн-блот-анализа является наиболее подходящим для выявления ассоциированных с протеасомой белков. Важно отметить, что в составе аффинно-очищенных протеасом мы снова обнаружили α -тубулин, что исключает вопрос о его неспецифическом взаимодействии с протеасомами.

Проведенный Вестерн-блот-анализ с применением антител, специфичных к α -тубулину (TUBA4A), также показал присутствие в комплексе с аффинно-очищенными протеасомами укороченной формы α -тубулина с мол. массой, соответствующей 40 кДа (рис. 3, а).

Для того чтобы исключить возможность того, что наблюдаемое взаимодействие протеасом с укороченной формой тубулина является особенностью лишь миелоидных клеток, мы проанализировали протеасомы из клеток почки эмбриона человека линии HEK293/Rpn11-НТВН. Эта стабильная клеточная линия экспрессирует субъединицу

19S протеасомы Rpn11, меченную по С-концу тем же пептидом НТВН. Протеасомы также очищали аффинным способом и разделяли в системе денатурирующего электрофореза. Вестерн-блот-анализ с использованием антител к α -тубулину вновь выявил присутствие укороченной формы α -тубулина в комплексе с аффинно-очищенными протеасомами (рис. 3, б).

Основная функция α - и β -тубулинов в клетке — формирование микротрубочек. Одной из основных функций микротрубочек является структурная — поддержание определенной формы клетки. Другой, не менее важной, является двигательная — участие в движении клеточных органелл с помощью специальных белков, транслокаторов (Gelfand, 1989). Помимо транслокаторов существует целый ряд белков, связывающихся с микротрубочками в клетке. Именно ассоциированные с микротрубочками белки влияют на их свойства и функции, способствуют полимеризации и стабилизации микротрубочек (Vallee, 1984).

Есть несколько генов α - и β -тубулинов, они высококонсервативны как между собой, так и между видами

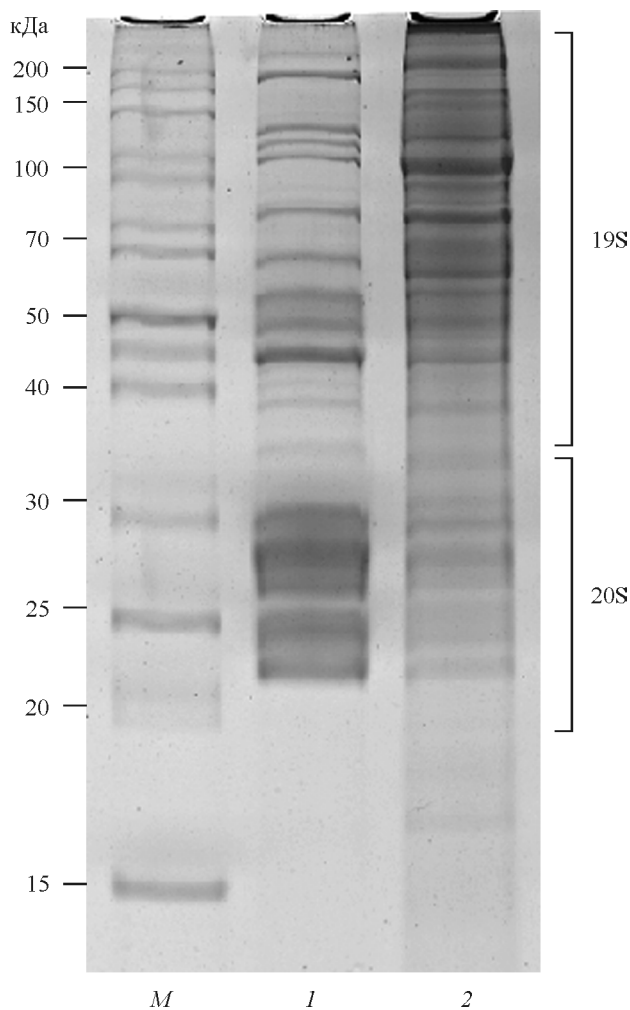


Рис. 2. Сравнение распределения белков протеасом, очищенных разными способами, в системе электрофореза в присутствии SDS, визуализированных с помощью окрашивания Кумасси.

Дорожки: 1 — аффинно-очищенные протеасомы клеток линии K562/ β 7-НТВН, 2 — протеасомы, выделенные из клеток линии K562 с помощью последовательного фракционирования. М — маркеры молекулярной массы.

Идентифицированные с помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии белки, ассоциированные с аффинно-очищенными протеасомами клеток K562/ β 7-НТВН

Белок	Номер в базе данных Uniprot ^a	Ген	Молекулярная масса, кДа	Доля покрытия, %	Число пептидов
Белки убиквитин-протеасомной системы:					
убиквитин-60S-рибосомный белок L40	P62987	<i>UBA52</i>	14.7	36	4
убиквитин-40S-рибосомный белок S27a	P62979	<i>RPS27A</i>	17.9	27	5
убиквитин-С-концевая гидролаза L5/UCH37	Q9Y5K5	<i>UCHL5</i>	37.6	15	3
убиквитин-лигаза E3A	Q05086	<i>UBE3A</i>	100.7	5	4
Белки теплового шока (Hsp):					
Hsp70	P11142	<i>HSPA8</i>	70.9	31	18
глюкозорегулируемый белок 78 кДа	P11021	<i>HSPA5</i>	72.3	36	17
Hsp90- β	P08238	<i>HSP90AB1</i>	83.3	23	14
Hsp60, митохондриальный	P10809	<i>HSPD1</i>	61.1	18	8
Hsp70 1A/1B	P08107	<i>HSPA1A</i>	70.1	17	10
Hsp70, митохондриальный	P38646	<i>HSPA9</i>	73.7	16	8
Белки цитоскелета:					
актин цитоплазматический 1	P60709	<i>ACTB</i>	41.7	45	14
тубулин (α -1С-фрагмент)	Q9BQE3	<i>TUBA1C</i>	49.9	26	7
тубулин (β -фрагмент)	P07437	<i>TUBB</i>	49.7	26	8
α -актинин-4	O43707	<i>ACTN4</i>	104.9	21	39
Белки-участники метаболизма:					
метилкротонил-КоА-карбоксилаза (β -фрагмент)	Q9HCC0	<i>MCCC2</i>	61.3	27	12
митохондриальная L-лактатдегидрогеназа (С-фрагмент)	P07864	<i>LDHC</i>	36.3	9	3

^a База данных Uniprot: <http://www.uniprot.org>.

(Cleveland et al., 1985). Для многих белков семейства α -тубулинов (48—49 кДа) показано существование различных изоформ в результате альтернативного сплайсинга (Гельфанд, Розенблат, 1977). Разнообразие изоформ α -тубулина оказывает влияние на динамику сборки микротрубочек (Villasante et al., 1986). Помимо этого, разнообразие изоформ α - β -тубулинов оказывает влияние на способность микротрубочек специфически связываться с теми или иными белками, что сказывается на изменении функций микротрубочек.

В литературе встречаются данные о процессинге белков в протеасомах (Сорокин и др., 2009). Например, обнаружено, что субъединица p50 транскрипционного фактора NF- κ B образуется из предшественника p105 в результате процессинга протеасомами (Chen et al., 2005). Еще один пример белкового процессинга протеасомами — ДНК/РНК-связывающий ядерно-цитоплазматический белок клеток животных γ B-1, принимающий участие прак-

тически во всех ДНК- и мРНК-зависимых процессах. Он расщепляется АТФ- и убиквитин-независимо 20S протеасомой по пептидной связи после остатка Glu-219 на два фрагмента (Сорокин и др., 2009). Таким образом, наблюдаемая нами укороченная форма α -тубулина также может быть результатом не альтернативного сплайсинга, а протеасомного процессинга.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного центра (проект 16-04-10343; очистка протеасомных комплексов, Вестерн-блот-анализ), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-08128; масс-спектрометрические исследования) и с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий СПбГПУ» на базе СПбГПУ при финансовой поддержке Министерства образования и наук РФ.

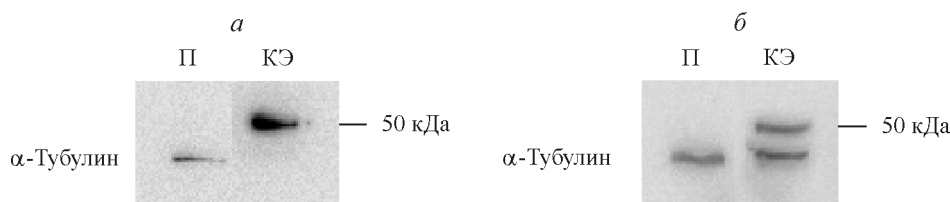


Рис. 3. Вестерн-блот-анализ белков, ассоциированных с аффинно-очищенными протеасомами (П) из клеток линии K562/ β 7-НТВН (а) и клеток линии HEK293/Rpn11-НТВН (б).

КЭ — клеточный экстракт.

Список литературы

- Артамонова Т. О., Ходорковский М. А., Цимоха А. С. 2014. Масс-спектрометрический анализ аффинно-очищенных протеасом из клеток миелогенной лейкемии человека по линии K562. *Биоорг. химия*. 40 (6) : 720—734. (Artamonova T. O., Khodorkovskii M. A., Tsimokha A. S. 2014. Mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes from the human myelogenous leukemia K562 cell line. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 40 (6) : 666—680.)
- Гельфанд В., Розенблат В. 1977. Микротрубочки. Их структура, химия и функциональная роль. В кн.: *Итоги науки и техники. Сер. биол. науки. М.: ВИНТИ. 2 : 78—143.* (Gelfand V., Rozenblat V. 1977. Microtubules. Their structure, chemistry and functional role. In: *Results of science and technic. Biol. Sci.* 2 : 78—143.)
- Зайкова Ю. Я., Куличкова В. А., Ермолаева Ю. Б., Боттрилл А., Барлев Н. А., Цимоха А. С. 2013. Характеристика внеклеточных протеасом и ассоциированных с ними белков методом iTRAQ-масс-спектрометрии. *Цитология*. 55 (2) : 111—122. (Zaykova 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. (Tsitologiya)*. 7 (3) : 253—265.)
- Сорокин А. В., Ким Е. Р., Овчинников Л. П. 2009. Протеасомная система деградации и процессинга белков. *Успехи биол. химии*. 49 : 3—76. (Sorokin A. V., Kim E. R., Ovchinnikov L. P. 2009. Proteasome system of degradation and processing of the proteins. *Adv. Biol. Chem. (Russian)*. 49 : 3—76.)
- 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 : 271—300.)
- 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.
- Chen L., Madura K. 2002. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 22 : 4902—4913.
- Chen Z. J. 2005. Ubiquitin signaling in the NF- κ B pathway. *Nature Cell Biol.* 7 : 758—765.
- Cleveland D. W., Sullivan K. F. 1985. Molecular biology and genetics of tubulin. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 331—366.
- Funakoshi M., Sasaki T., Nishimoto T., Kobayashi H. 2002. Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 99 : 745—750.
- Gelfand V. 1989. Cytoplasmic microtubular motors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1 : 63—66.
- Gomez T. A., Kolawa N., Gee M., Sweredoski M. J., Deshaies R. J. 2011. Identification of a functional docking site in the Rpn1 LRR domain for the UBA-UBL domain protein Ddi1. *BMC Biol.* 9 : 1—24.
- 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 26S proteasome-interacting network. *Mol. Cell. Proteomics*. 5 : 366—378.
- Hartmann-Petersen R., Hendil K. B., Gordon C. 2003. Ubiquitin binding proteins protect ubiquitin conjugates from disassembly. *FEBS Lett.* 535 : 77—81.
- Horiguchi R., Dohra H., Tokumoto T. 2006. Comparative proteome analysis of changes in the 26S proteasome during oocyte maturation in goldfish. *Proteomics*. 6 : 4195—4202.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680—685.
- Leggett D. S., Glickman M. H., Finley D. 2005. Purification of proteasomes, proteasome subcomplexes, and proteasome-associated proteins from budding yeast. *Ubiquitin-Proteasome Protocols*. 301 : 57—70.
- Patterson C., Höhfeld J. 2008. Molecular chaperones and the ubiquitin-proteasome system. In: *Protein science encyclopedia*. Weinheim: John Wiley & Sons Inc. 1—30.
- Russell J. D., Scalf M., Book A. J., Lador D. T., Vierstra R. D., Smith L. M., Coon J. J. 2013. Characterization and quantification of intact 26S proteasome proteins by real-time measurement of intrinsic fluorescence prior to top-down mass spectrometry. *PLoS ONE*. 8 : e58157.
- Schmidt M., Hanna J., Elsasser S., Finley D. 2005. Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol. Chem.* 386 : 725—737.
- 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.
- Tsimokha A. S., Mittenberg A. G., Kulichkova V. A., Kozhukharova I. V., Gause L. N., Konstantinova I. M. 2007. Changes in composition and activities of 26S proteasomes under the action of doxorubicin—apoptosis inducer of erythroleukemic K562 cells. *Cell Biol. Int.* 31 : 338—348.
- Vallee R. B. 1984. MAP2 (microtubule-associated protein 2). In: *The cytoskeleton*. New York: Springer USA. 289—311.
- Verma R., Chen S., Feldman R., Schieltz D., Yates J., Dohmen J., Deshaies R. J. 2000. Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 3425—3449.
- Villasante A., Wang D., Dobner P., Dolph P., Lewis S., Cowan N. 1986. Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: testis-specific expression of two sister genes. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 2409—2419.
- Wang D., Zong C., Koag M. C., Wang Y., Drews O., Fang C., Scruggs S. B., Ping P. 2011. Proteome dynamics and proteome function of cardiac 19S proteasomes. *Mol. Cell. Proteomics*. 10 : M110.006122.
- 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.

Поступила 22 IX 2016

THE SHORTENED ISOFORM OF α -TUBULIN IS DETECTED IN COMPLEX WITH PROTEASOMESE. Yu. Ivanova,^{1,2,*} T. O. Artamonova,³ Yu. Ya. Zaykova,² M. A. Khodorkovskii,³ A. S. Tsimokha^{2,*}¹ St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, ² Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, 194064, and³ Center of Nanobiotechnologies of Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251;

* e-mail: ivanova1.027@gmail.com; atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru

The proteasome is a multi-subunit protein complex that serves as a major pathway for intracellular protein degradation playing important functions in various biological processes. By using MALDI-ICR-mass-spectrometry and Western-blot analysis, we have shown the presence of shortened isoform of α -tubulin in complex with the affinity-purified proteasomes from stable cell lines K562 and HEK293.

Key words: alpha-tubulin, MALDI-ICR-mass-spectrometry, proteasome, proteasome-interacting protein.