

УДК 577.112.083

ПОЛУЧЕНИЕ С-КОНЦЕВОГО УЧАСТКА БЕЛКА PI31 ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ 20S-ПРОТЕАСОМЫ *IN VITRO*

© 2019 г. Е. Е. Дьяконов¹, Е. А. Малкина^{1,2}, В. А. Куличкова¹, А. Н. Томилин^{1,3}, А. С. Цимоха¹ *

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Российский государственный педагогический университет имени А.И. Герцена, Санкт-Петербург, 191186 Россия

³Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*E-mail: atsimokha@incras.ru

Поступила в редакцию 09.11.2018 г.

После доработки 16.01.2019 г.

Принята к публикации 16.01.2019 г.

Белок PI31, ингибитор протеасомы, состоит из 271 аминокислотных остатков и содержит N-концевой глобулярный и богатый пролином С-концевой домен. Ингибирующая протеасому активность ассоциирована с С-концевым участком PI31. Сконструирована последовательность С-концевого участка гена *PSMF1*, кодирующего белок PI31 (151–271 а. к.), слитого на N-конце с последовательностью из шести гистидинов. Рекомбинантный С-концевой участок PI31 (6His-cPI31) экспрессировали в *Escherichia coli* и очищали с помощью металл-хелатной хроматографии. Рекомбинантный белок 6His-cPI31 ингибировал *in vitro* химотрипсин-подобную активность 20S-, но не 26S-протеасомы.

Ключевые слова: ингибитор протеасомы PI31, протеасома, протеолиз

DOI: 10.1134/S0041377119040011

Большая часть регулируемого протеолиза в клетках эукариот осуществляется убиквитин-протеасомной системой (Konstantinova et al., 2008). Протеасома в клетках эукариот представляет собой протеолитический белковый комплекс, который формируется из протеолитического ядра – 20S-протеасомы и различных регуляторных компонентов (Demartino, Gillette, 2007). За убиквитин-зависимый протеолиз белков в клетке отвечает 20S-протеасома, которая состоит из 20S-протеасомы и одного или двух 19S-регуляторных комплексов (Collins, Goldberg, 2017). 20S-протеасома представляет собой полый цилиндр, состоящий из четырех сложенных в стопку гептамерных колец: два внешних кольца образованы субъединицами α -типа, два внутренних кольца – субъединицами β -типа. β -Субъединицы в составе β -колец формируют каталитическую полость 20S-протеасом, в которой три различные β -субъединицы ($\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$) в каждом из двух внутренних колец специфически катализируют гидролиз пептидной связи (Groll et al.,

1997). α -Субъединицы в составе α -колец образуют “ворота”, тем самым регулируя доступ субстратов к протеолитической камере (Groll et al., 2000). В отсутствие регуляторных комплексов “ворота” конститутивно закрыты, что делает свободные 20S-протеасомы каталитически инертными (Groll et al., 1997). Однако связывание регуляторов с 20S-протеасомой приводит к открытию “ворот”, тем самым активируя полученный протеасомный комплекс (Stadtmueller, Hill, 2011). Помимо протеасомных активаторов 19S, PA200 и PA28 описан также протеасомный ингибитор PI31 (Li et al., 2014).

Известно, что белок PI31 содержит два домена (рис. 1): N-концевой глобулярный домен, который, возможно, ответственен за гомодимеризацию PI31 (Kirk et al., 2008) и богатый пролином С-концевой домен с нарушенной структурой, для которого показана ингибирующая активность по отношению к протеасоме (McCutchen-Maloney et al., 2000). При этом PI31 ингибирует преимущественно химотрипсин- и каспаза-подобные типы активности 20S протеасомы, но не трипсин-подобную (Zaiss et al., 1999). Интересен тот факт, что С-концевые остатки PI31 соответствуют мотиву HbYX (где Hb – гидрофобный аминокислотный остаток, Y – тирозин, X – любой аминокислотный остаток), характерному для активаторов протеасомы (Vader et al., 2011). Полагают, что ингибитор PI31 конкурирует за связывание с 20S

Принятые сокращения: 6His – последовательность из шести гистидинов, AMC – 7-амино-4-метилкумарин, 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), БСА – бычий сывороточный альбумин, ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид, ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле.