БИОСЕНСОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ С КОРОВОЙ ЧАСТЬЮ ПРОТЕАСОМЫ

О.А. Бунеева[1]*, О.В. Гнеденко[1], М.В. Медведева[2], В.Г. Згода[1], А.С. Иванов[1], А.Е. Медведев[1]

[1]НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: olbuneeva@gmail.com
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, 119991, Москва

Становится всё более очевидным, что убиквитинирование внутриклеточных белков не является обязательным этапом, необходимым для их деградации в протеасомах. Известно немало подлежащих элиминации белков, которые не подвергаются предварительному убиквитинированию для узнавания регуляторными субчастицами 26S протеасомы, а поступают непосредственно в её коровую (протеолитическую) часть – 20S протеасому. Необходимым условием для этого является наличие в белке неструктурированных участков. В данной работе исследовали связывание ряда полифункциональных белков (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), альдолаза, пируваткиназа), а также белков, участвующих в процессах нейродегенерации (α-синуклеин, основной белок миелина), с иммобилизованной на чипе SPR-биосенсора Biacore 20S протеасомой. Для предотвращения возможной диссоциации 20S протеасому в ходе иммобилизации стабилизировали при помощи бифункционального сшивающего реагента – диметилпимелимидата. Из всех исследованных белков только альдолаза и пируваткиназа взаимодействовали с 20S протеасомой (K_d соответственно $8{,}17\times10^{-7}$ М и $5{,}56\times10^{-7}$ М). В дополнение к ранее обнаруженному убиквитинированию ГАФД, масс-спектрометрический анализ препаратов этих белков выявил наличие так называемой убиквитиновой сигнатуры Lys-ε-Gly-Gly только в препарате альдолазы. Окисление пируваткиназы и альдолазы, способствующее элиминации белков в результате их непосредственного взаимодействия с 20S протеасомой, приводило к снижению K_d в 2-3 раза по сравнению с интактными белками. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что с 20S протеасомой одинаково эффективно связываются как убиквитинированные (альдолаза), так и неубиквитинированные (пируваткиназа) белки.

Ключевые слова: протеасома; убиквитинирование; внутренне неупорядоченные белки; мультифункциональные белки; оптический биосенсор; пируваткиназа; альдолаза

DOI: 10.18097/PBMC20196504306

ВВЕДЕНИЕ

Казалось бы, не так много времени прошло со времени революционного открытия основного пути элиминации клеточных белков – протеасомного пути деградации, предваряемого убиквитинированием – АТР-зависимым присоединением (как правило, последовательно четырёх) остатков низкомолекулярного белка убиквитина с участием трёх типов ферментов: убиквитин-активирующего (Е1), убиквитин-конъюгирующего (Е2) и убиквитинлигазы (Е3) [1, 2]. Убиквитинированные белки затем узнаются регуляторными субчастицами сложного мультиферментного комплекса (26S протеасомы) и направляются в его коровую 20S часть, где и происходит собственно протеолиз [3]. Однако сегодня очевидно, что связь убиквитинирования и протеасомного расщепления белков не так однозначна. Убиквитинирование белков не обязательно означает их протеасомную деградацию, но может служить для регуляции самых различных процессов в клетке [4-7]. И, напротив, для протеасомного расщепления белков не обязательно их предварительное убиквитинирование.

Более того, огромное количество короткоживущих белков, подлежащих своевременному удалению из клетки, а также белков, синтезированных с ошибками или повреждённых, например, в результате окисления, расщепляется непосредственно коровой частью протеасомы (20S протеасомой). Этот процесс не требует убиквитинирования и является АТР-независимым [8, 9]. Так элиминируется большое количество белков, участвующих в самых разных внутриклеточных процессах, в том числе в процессах нейродегенерации (паркин [10], α-синуклеин [11], DJ-1 [12], тау [13, 14], основной белок миелина [15]).

Как правило, деградации непосредственно 20S протеасомой подвергаются белки с неструктурированными участками, появившимися в результате окисления, мутации или старения [16-18], а также внутренне неупорядоченные белки, то есть нативные белки, содержащие неупорядоченные области (“intrinsically unfolded proteins”) [19]. Существует определенная связь между наличием у белка внутренне неупорядоченных участков и его мультифункциональностью [20]. Вероятно, такая мультифункциональность, опровергающая известный постулат “один ген-один фермент”, и объясняется тем, что гибкие участки белка при взаимодействии с различными соединениями позволяют менять его конформацию и соответственно функцию [21].

Во многих случаях такие мультифункциональные белки, “работающие по совместительству” (“moonlighting proteins”), одновременно являются олигомерными аллостерическими ферментами [22].

В базе данных Moonprot [24] собрано достаточное количество мультифункциональных белков, к которым принадлежат, в частности, такие ключевые ферменты гликолиза, как глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), альдолаза, пируваткиназа [23-26].

Для проверки возможности элиминации этих белков путём прямой (убиквитин-независимой) деградации мы исследовали взаимодействия этих ферментов с коровой частью протеасомы (20S протеасома). Аналогичное исследование было проведено для α-синуклеина и основного белка миелина, которые, по данным ряда исследований, подвергаются убиквитин-независимой протеасомной деградации [11, 15].

В связи с тем, что ранее обнаружили убиквитинирование ГАФД [27], все использованные в данной работе белки исследовали на наличие убиквитиновой метки Lys-ε-Gly-Gly.

МЕТОДИКА

В работе использовали выделенные из скелетных мышц кролика электрофоретически гомогенные ферменты: ГАФД, пируваткиназу и альдолазу (удельная активность 135 мкмоль/мин, 265 мкмоль/мин и 15,8 мкмоль/мин на 1 мг белка соответственно) [28]. Фракция 20S протеасом кролика, α-синуклеин человеческий рекомбинантный, убиквитин бычий, основной белок миелина бычий – коммерчески доступные препараты (“Sigma-Aldrich”, США, каталожные номера соответственно P3988, S7820, U6253, M1891). Полиубиквитин рекомбинантный (Poly-ubiquitin chains (Ub 2-7) (K48-linked)) был получен от “Enzo Life Sciences” (США). Приобретённые у коммерческих фирм препараты белков дополнительной очистке не подвергали.

HBS-буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% детергент P20, 10 мМ HEPES (pH 7,4)); 10 мМ ацетатный буфер (pH 5,0); набор реагентов для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминогруппы (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), 1 М этаноламин-HCl (pH 8,5)) были получены от “GE Healthcare” (США). Остальные реагенты были от “Sigma-Aldrich”.

Мягкое окисление ГАФД, пируваткиназы и альдолазы осуществляли, как описано ранее [27], инкубируя ферментный препарат с 70 мкМ H_2O_2 в течение 30 мин при 20°C в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4).

Взаимодействие исследуемых белков с иммобилизованной 20S протеасомой исследовали, используя оптический SPR-биосенсор Biacore T200 и специальное программное обеспечение Biacore Control (“GE Healthcare”). Все измерения были выполнены при 25°C с использованием стандартного оптического чипа CM4 (“GE Healthcare”), покрытого слоем карбоксиметилированного декстрана. Молекулярные взаимодействия регистрировали в виде сенсограмм, представляющих зависимость сигнала биосенсора (в резонансных единицах, RU) от времени.

Иммобилизацию 20S протеасомы осуществляли путём формирования ковалентных связей между карбоксильными группами на поверхности оптического чипа CM4 и аминогруппами 20S протеасомы. Карбоксильные группы чипа активировали путём инжекции смеси 0,2 М EDC/0,05 М NHS в течение 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Инжекцию раствора 20S протеасомы (25 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 5,0) выполняли со скоростью 5 мкл/мин в течение 20 мин. Далее пропускали 1 М этаноламин-HCl (pH 8,5) в течение 2 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Для предотвращения возможной диссоциации в ходе экспериментов иммобилизованную 20S протеасому стабилизировали при помощи бифункционального сшивающего реагента – диметилпимелимидата, 1 мМ раствор которого в 50 мМ фосфатном буфере (pH 8,0) инжектировали со скоростью 5 мкл/мин в течение 45 мин. (Эффективность сшивки была предварительно проверена электрофоретически на препарате протеасомы в растворе). После промывки 100 мМ трис-HCl (pH 7,8) в течение 15 мин уровень иммобилизации составил 1900 RU (рис. 1).

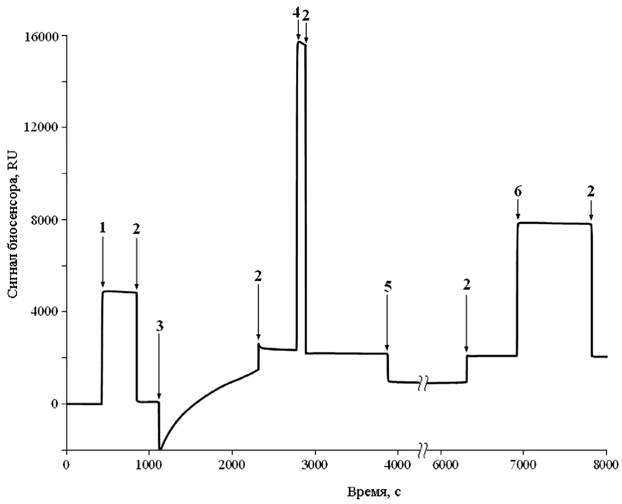

Рисунок 1. Иммобилизация 20S протеасомы на поверхности оптического чипа CM4. Стрелки показывают инжекцию: 1 – EDC/NHS; 2 – HBS; 3 – 20S протеасома 25 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере, pH 5,0; 4 – 1 М этаноламин-HCl; 5 – 1 мМ диметилпимелимидат в 50 мМ фосфатном буфере, pH 8,0; 6 – 100 мМ трис-HCl, pH 7,8.

Взаимодействие белков с иммобилизованной 20S протеасомой исследовали при скорости потока 10 мкл/мин в течение 5 мин. Перед повторным использованием поверхность чипа регенерировали промывкой 1 М NaCl в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 0,5 мин при скорости потока 50 мкл/мин.

Полученные сенсограммы анализировали с помощью программы BIAevaluation Version 4.1 (“GE Healthcare”).

Масс-спектрометрический поиск убиквитиновой сигнатуры (Lys-ε-Gly-Gly) в исследованных препаратах белков проводили, как описано в [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Протеасома 20S (коровая часть 26S протеасомы) представляет собой сложноорганизованный мультиферментный комплекс, состоящий из четырёх шестичленных колец. Чтобы предотвратить диссоциацию этого комплекса, иммобилизованного на поверхности карбоксиметил-декстранового оптического чипа, при отмывании связавшихся с ним аналитов мы осуществили его сшивку бифункциональным реагентом диметилпимелимидатом (рис. 2).

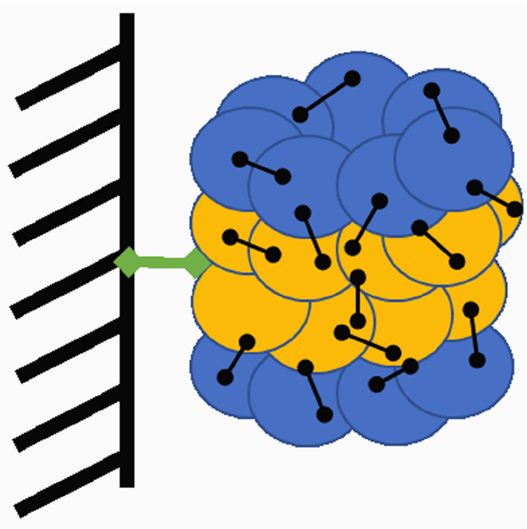

Рисунок 2. Схема 20S протеасомы, иммобилизованной на поверхности оптического чипа и сшитой бифункциональным реагентом диметилпимелимидатом.

При добавлении убиквитина, как и при добавлении полиубиквитина, изменения сигнала биосенсора не наблюдалось. Не связывалась с 20S протеасомой и ГАФД (данные не приведены). В наших предыдущих экспериментах было показано взаимодействие этого белка с иммобилизованной Rpn10 субъединицей регуляторной субчастицы протеасом, которая является рецептором убиквитина [27]. В данном препарате ГАФД методом масс-спектрометрического анализа было обнаружено семь участков убиквитинирования в полипептидной цепи [27]. Все эти результаты согласуются с представлением о том, что убиквитинированные белки перед тем как оказаться в протеолитической (коровой) части протеасомы связываются с её регуляторными субъединицами, а непосредственно в коровую часть протеасомы попадают неубиквитинированные белки, в составе которых имеются неупорядоченные участки.

В наших опытах α-синуклеин и основной белок миелина не связывались с 20S протеасомой. По данным масс-спектрометрического анализа убиквитиновые сигнатуры не были обнаружены ни у α-синуклеина, ни у основного белка миелина. При этом следует отметить, что в работе [15] эксперименты *in vitro* по деградации неубиквитинированного основного белка миелина были выполнены с использованием препарата 26S протеасом. Для этого белка было показано связывание с β1i субъединицей иммунопротеасомы и последующая убиквитин-независимая деградация [15]. Из литературы известно, что α-синуклеин связывается с субъединицей α7(PSMA3) коровой части протеасомы, и показана его убиквитин-независимая деградация 20S протеасомой; при этом окисление α-синуклеина ингибирует этот процесс [11].

Из всех исследованных белков количественное аффинное взаимодействие с 20S протеасомой было обнаружено для альдолазы и пируваткиназы (табл. 1). Добавление каждого из этих белков в ячейку биосенсора вызывало чёткий сигнал, зависевший от количества добавленного белка (рис. 3). Масс-спектрометрические эксперименты показали отсутствие участков убиквитинирования в препарате пируваткиназы, а в препарате альдолазы было обнаружено достоверное убиквитинирование нескольких остатков лизина (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что с коровой частью протеасомы могут взаимодействовать как неубиквитинированные, так и убиквитинированные белки.

Таблица 1. Взаимодействие белков с иммобилизованной коровой частью протеасомы

Белок-аналит	k_a, М$^{-1}$ с$^{-1}$	k_d, с$^{-1}$	K_d, М
Пируваткиназа	$(3{,}07\pm0{,}05)\cdot10^{3}$	$(1{,}7\pm0{,}1)\cdot10^{-3}$	$5{,}56\cdot10^{-7}$
Пируваткиназа окисленная	$(1{,}08\pm0{,}02)\cdot10^{3}$	$(2{,}69\pm0{,}03)\cdot10^{-4}$	$2{,}49\cdot10^{-7}$
Альдолаза	$(1{,}22\pm0{,}1)\cdot10^{3}$	$(1{,}00\pm0{,}03)\cdot10^{-3}$	$8{,}17\cdot10^{-7}$
Альдолаза окисленная	$(1{,}02\pm0{,}01)\cdot10^{3}$	$(2{,}86\pm0{,}1)\cdot10^{-4}$	$2{,}80\cdot10^{-7}$

Таблица 2. Участки убиквитинирования в препарате альдолазы по данным масс-спектрометрического анализа

Белок	*P00883 Fructose-bisphosphate aldolase A (*Oryctolagus cuniculus* (Rabbit))
Аминокислотная последовательность	L**K**PNMVTPGHACTQ**K**YSHEEIAMATVTALR
Модифицированная последовательность	NH2-LK<ub>PNMVTPGHAC<cmm>TQK<ub>YSHEEIAMATVTALR-COOH
Вероятность убиквитинирования	Very confident (100%)

Примечание: * – для удобства поиска дополнительной информации в различных базах данных название исследованного белка дано в том виде, в каком оно фигурирует в базе данных UniProt. Жирным шрифтом выделены остатки лизина (K), несущие так называемую“убиквитиновую сигнатуру” (Lys-ε-Gly-Gly).

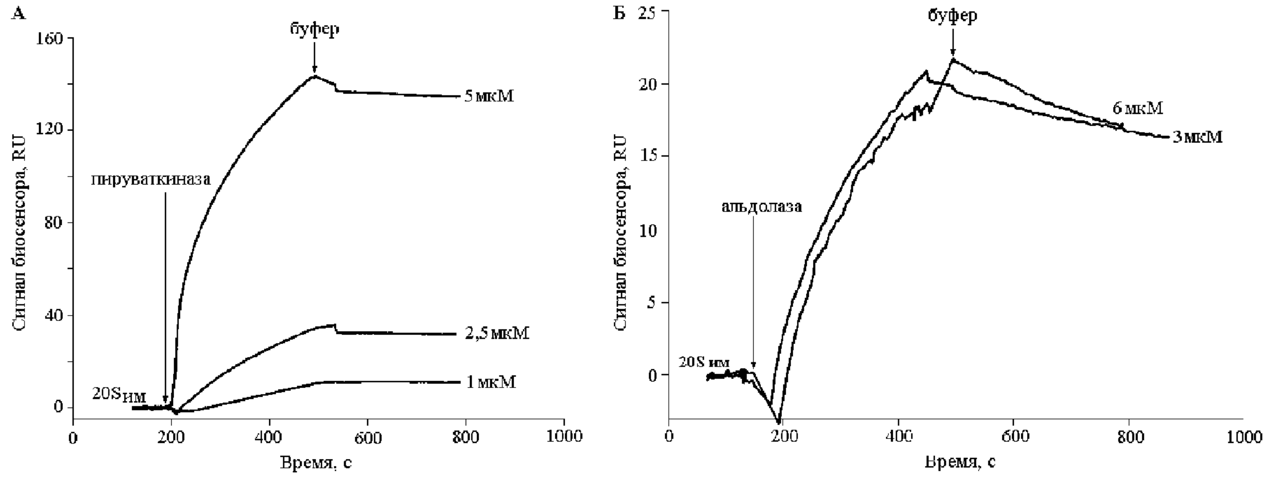

Рисунок 3. Типичные сенсограммы связывания пируваткиназы (А) и альдолазы (Б) с иммобилизованной 20S протеасомой.

Известно, что окисление вызывает появление у белков неструктурированных участков, способствующее взаимодействию (неубиквитинированных) белков с 20S протеасомой и их последующей деградации [18, 30]. В связи с этим представляло интерес исследовать взаимодействие окисленных белков пируваткиназы и альдолазы с иммобилизованной 20S протеасомой. В случае пируваткиназы значение K_d для окисленного препарата было в два раза меньше, чем для неокисленного. В случае альдолазы K_d для окисленного препарата фермента была в 3 раза меньше, чем для исходного (см. табл. 1).

Таким образом, результаты данного исследования свидетельствуют о возможности непосредственного связывания с 20S протеасомой таких мультифункциональных белков, как пируваткиназа и альдолаза. Отсутствие взаимодействия α-синуклеина и основного белка миелина с иммобилизованной и стабилизированной 20S протеасомой требует дальнейшего изучения. С одной стороны, нельзя исключить, что стабилизация 20S протеасомы сшивающими агентами оказывает определённое влияние на эффективность взаимодействия протеасомных субъединиц с участками связывания этих белков. С другой стороны, чётко детектируемое связывание интактных и окисленных препаратов пируваткиназы и альдолазы указывает на функциональную компетентность протеасом, во всяком случае, в контексте связывания с белками, имеющими гидрофобные участки, которые являются необходимым структурным условием для взаимодействия белков-субстратов с 20S протеасомами [16-19].

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (биосенсорный и протеомный анализ) и частично поддержана грантом РФФИ (№ 19-015-00073а; получение коровой 20S протеасомы и белков для биосенсорного анализа).

БЛАГОДАРНОСТИ

LCMS/MS анализ белков выполнен в ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование проведено в соответствии с соблюдением общепринятых правил и норм гуманного обращения с экспериментальными животными.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hershko A., Ciechanover A.* (1992) Annu. Rev. Biochem., **61**, 761-807.
2. *Hershko A., Ciechanover A.* (1998) Annu. Rev. Biochem., **67**, 425-479.
3. *Tanaka K.* (2009) Proc. Jpn. Acad., Ser. B, **85**, 12-36.
4. *Vertegaal A.C.O.* (2011) Chem. Rev., **111**, 7923-7940.
5. *Bremm A., Komander D.* (2011) Trends Biochem. Sci., **36**(7), 355-363.
6. *Kravtsova-Ivantsiv Y., Ciechanover A.* (2012) J. Cell. Sci., **125**, 539-548.
7. *Бунеева О.А., Медведев А.Е.* (2016) Биомед. химия, **62**(5), 496-509. [*Buneeva O.A., Medvedev A.E.* (2016) Biomed. khimiya, **62**(5), 496-509.]
8. *Sánchez-Lanzas R., Castaño J.G.* (2014) Biomolecules, **4**, 1140-1154.
9. *Бунеева О.А., Медведев А.*Е. (2018) Биомед. химия, **64**(2), 134-148. [*Buneeva O.A., Medvedev A.E.* (2018) Biomed. khimiya, **64**(2), 134-148.]
10. *Dachsel J.C., Lucking C.B., Deeg S. et al.* (2005) FEBS Lett., **579**, 3913-3919.
11. *Alvarez-Castelao B., Goethals M., Vandekerckhove J., Castano J.G.* (2014) Biochim. Biophys. Acta, **1843**, 352-365.
12. *Alvarez-Castelao B., Munoz C., Sanchez I., Goethals M., Vandekerckhove J., Castano J.G* (2012) Biochim. Biophys. Acta, **1823**, 524-533.
13. *David D.C., Layfield R., Serpell L., Narain Y., Goedert M., Spillantini M.G.J.* (2002) Neurochem., **83**, 176-185.
14. *Cardozo C., Michaud C.* (2002) Arch. Biochem. Biophys., **408**, 103-110.

15. *Belogurov A., Jr., Kuzina E., Kudriaeva A., Kononikhin A., Kovalchuk S., Surina Y., Smirnov I., Lomakin Y., Bacheva A., Stepanov A., Karpova Y., Lyupina Y., Kharybin O., Melamed D., Ponomarenko N., Sharova N., Nikolaev E., Gabibov A.* (2015) FASEB J., **29**, 1-13.
16. *Ben-Nissan G., Sharon M.* (2014) Biomolecules, **4**, 862-884.
17. *Erales J., Coffino P.* (2014) Biochim. Biophys. Acta, **1843**, 216-221.
18. *Raynes R.I., Pomatto L.C.D., Davies K.J.A.* (2016) Mol. Aspects Med., **50**, 41-55.
19. *Uversky V.N., Oldfield C.J., Dunker A.K.* (2005) J. Mol. Recognit., **18**, 343-384.
20. *Serdyuk I.N.* (2007) Molecular Biology, **41**(2), 262-277.
21. *Wright P.E., Dyson H.J.* (1999) J. Mol. Biol., **293**, 321-331.
22. *Jeffery C.J.* (1999) Trends Biochem. Sci., **24**, 8-11.
23. *Jeffery C.J.* (2015) Frontiers Genetics, **6**, Article211, 1-5.
24. *Mani M., Chen C., Amblee V., Liu H., Mathur T., Zwicke G., Zabad S., Patel B., Thakkar J., Jeffery C.J.* (2015) Nucl. Acids Res., **43**, D277-D282.
25. *Gupta V., Bamezai R.N.K.* (2010) Protein Science, **19**, 2031-2044.
26. *Dalby A., Dauter Z., Littlechild J.A.* (1999) Protein Science, **8**, 291-297.
27. *Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Копылов А.Т., Медведева М.В., Згода В.Г., Иванов А.С., Медведев А.Е.* (2017) Биохимия, **82**(9), 1338-1344. [*Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Kopylov A.T., Medvedeva M.V., Zgoda V.G., Ivanov A.S., Medvedev A.E.* (2017) Biokhimiya, **82**(9), 1338-1344.]
28. *Scopes R.K., Stoter A.* (1982) Methods Enzymol., **90**(Pt. E), 479-490.
29. *Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Медведева М.В., Иванов А.С., Медведев А.Е.* (2016) Биомед. химия, **62**(2), 60-163. [*Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Ivanov A.S., Medvedev A.E.* (2016) Biomed. khimiya, **62**(2), 60-163.]
30. *Kastle M., Reega S., Rogowska-Wrzesinska A., Grune T.* (2012) Free Rad. Biol. Med., **53**, 1468-1477.

Поступила в редакцию: 20. 06. 2019.
После доработки: 01. 07. 2019.
Принята к печати: 03. 07. 2019.

A BIOSENSOR STUDY OF PROTEIN INTERACTION WITH THE 20S PROTEASOME CORE PARTICLE

O.A. Buneeva[1]*, O.V. Gnedenko[1], M.V. Medvedeva[2], V.G. Zgoda[1], A.S. Ivanov[1], A.E. Medvedev[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow 119121 Russia; *e-mail: olbuneeva@gmail.com
[2]Moscow State University, Biological Faculty, Moscow, 119991 Russia

It becomes increasingly clear that ubiquitination of cellular proteins is not an indispensable prerequisite of their degradation in proteasomes. There are a number of proteins to be eliminated which are not pre-ubiquitinated for their recognition by regulatory subcomplex of 26S proteasome, but which directly interact with the 20S proteasome core particle (20S proteasome). The obligatory precondition for such interaction consists in existence of disordered (hydrophobic) fragments in the target protein. In this study we have investigated the interaction of a number of multifunctional (moonlighting) proteins (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), aldolase, pyruvate kinase) and neurodegeneration-related proteins (α-synuclein, myelin basic protein) with 20S proteasome immobilized on the SPR-biosensor chip and stabilized by means of a bifunctional agent dimethyl pimelimidate (in order to prevent possible dissociation of this subcomplex). Only two of all investigated proteins (aldolase and pyruvate kinase) interacted with the immobilized 20S proteasome (K_d of 8.17×10^{-7} M and 5.56×10^{-7} M, respectively). In addition to earlier detected GAPDH ubiquitination, mass spectrometric analysis of the studied proteins revealed the presence of the ubiquitin signature (Lys-ε-Gly-Gly) only in aldolase. Oxidation of aldolase and pyruvate kinase, which promotes elimination of proteins via their direct interaction with 20S proteasome, caused a 2-3-fold decrease in their K_d values as comparison with this parameter obtained for the intact proteins. The results of this study provide further evidence for direct interaction of both ubiquitinated proteins (aldolase), and non-ubiquitinated proteins (pyruvate kinase) with the 20S proteasome core particle (20S proteasome). The effectiveness of this interaction is basically equal for the ubiquitinated proteins and non-ubiquitinated proteins.

Key words: proteasome; ubiquitination; intrinsically disordered proteins; multifunctional proteins; optical biosensor; pyruvate kinase; aldolase

Funding. This work was performed within the framework of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013-2020 and was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 19-015-00073a).

Received: 20.06.2019, revised: 01.07.2019, accepted: 03.07.2019.