

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Кузина Екатерина Сергеевна

УБИКВИТИН-НЕЗАВИСИМЫЙ ПРОТЕОЛИЗ ОСНОВНОГО БЕЛКА
МИЕЛИНА И ЕГО РОЛЬ В РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
АУТОИММУННОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА.

Специальность 02.00.10 - "Биоорганическая химия"

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на кафедре химии природных соединений Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научные руководители:

Доктор химических наук, профессор, чл.-корр. РАН,
Габибов Александр Габибович

Кандидат химических наук
Белогуров Алексей Анатольевич

Официальные оппоненты:

Дзантиев Борис Борисович, д.х.н., профессор, заместитель директора Института по научной работе, заведующий Лабораторией иммунобиохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук

Тоневицкий Александр Григорьевич, д.б.н., профессор, чл.-корр.РАН, заведующий Отделом трансляционной онкологии Федерального государственного бюджетного учреждения Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

Защита диссертации состоится 9 июня, в 16.00 на заседании Диссертационного совета Д501.001.41 по химическим наукам при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, МГУ, НИИ ФХБ, аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова www.chem.msu.ru.

Автореферат разослан _____ 2015 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент

Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Рассеянный склероз (РС) – одно из наиболее социально и экономически значимых неврологических заболеваний современности. Особенностью РС является возникновение заболевания в основном у лиц среднего возраста, то есть молодой и трудоспособной части населения, ведущей активную социальную жизнь. Последствия заболевания за 10-15 лет приводят практически к полной потере трудоспособности, а при недостаточно эффективном и своевременном лечении – и к летальному исходу. К сожалению, пробелы в знании этиологии РС приводят к отсутствию эффективной терапии данного заболевания.

Актуальность изучения протеолиза основного белка миелина связана с тем, что он является одним из основных аутоантигенов, на которые направлен иммунный ответ при рассеянном склерозе, а также его экспериментальной животной модели – экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЕАЕ). Изучение протеолитической деградции аутоантигенов имеет важное значение для современной биохимии и иммунологии, в особенности для понимания молекулярных механизмов патогенеза аутоиммунных заболеваний и выявления новых терапевтических мишеней. Пептиды, образующиеся в результате протеолиза внутриклеточных антигенных белков, презентуются на поверхности клетки на молекулах главного комплекса гистосовместимости I класса и могут распознаваться цитотоксическими Т-лимфоцитами, что приводит к уничтожению таргетной клетки. Ключевую роль в протеолизе внутриклеточных белков до антигенных пептидов играет протеасома – многосубъединичный белковый комплекс, обладающий широкой субстратной специфичностью. Качественный и количественный состав пептидов, презентуемых на поверхности клетки, во многом зависит от каталитических свойств протеасомы. Механизм деградции основного белка миелина протеасомой и особенности протекания этого процесса в норме и при развитии аутоиммунных патологий ЦНС до сих пор не были изучены.

Цели и задачи исследования. В данной работе была изучена роль протеасомного гидролиза МВР в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (experimental autoimmune encephalomyelitis, ЕАЕ), животной модели рассеянного склероза.

Для этого были поставлены следующие задачи:

- Изучение необходимости модификации убиквитином для гидролиза МВР протеасомой.
- Сравнение субъединичного состава и субстратной специфичности протеасомы в ЦНС в норме и при развитии ЕАЕ. Сравнение качественного и количественного

спектра пептидов, образующихся при протеасомном гидролизе МВР в норме и при развитии аутоиммунной патологии ЦНС.

– Изучение направленного подавления гидролиза МВР протеасомой как потенциального метода терапии ЕАЕ

Научная новизна и практическая значимость работы. В настоящей работе впервые описан факт убиквитин-независимого протеолиза аутоантигенного белка. Полученные в настоящей работе данные расширяют знания об убиквитин-независимой деградации белков 26S протеасомой, указывают на возможную связь между протеолитической активностью иммунопротеасомы и развитием аутоиммунных патологий ЦНС, а также на перспективность специфических ингибиторов иммунопротеасомы как потенциальных лекарственных средств. Диссертационная работа имеет чётко выраженный фундаментальный характер и вносит существенный вклад в прояснение этиологии и патогенеза рассеянного склероза. Детальное изучение данной проблемы позволит в дальнейшем использовать полученные данные для создания новых методов терапии рассеянного склероза и создания лекарственных препаратов, направленных на подавление протеолитической активности иммунопротеасомы в центральной нервной системе.

Публикация и апробация работы. По теме диссертации опубликовано 5 статей. Результаты диссертации были представлены на 6 российских и международных конференциях: конференции «Ломоносов-2010» (Москва, 2010), IV Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения» (Московская обл., 2010), 38-ом конгрессе FEBS «Mechanisms in Biology» (Санкт-Петербург, Россия, июль 2013), XXVI Зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", (Москва, 2014), конференции «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург–Колтуши, 2014), VII Всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция» (Петрозаводск, 2014).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 110 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальную часть, заключение, выводы и список литературы. Материал иллюстрирован 35 рисунками и 4 таблицами. Библиографический указатель включает в себя 187 цитированных работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

1.Изучение необходимости модификации убиквитином для гидролиза МВР протеасомой

1.1.Деградация МВР протеасомой в клетках млекопитающих

Внутриклеточный протеолиз МВР изучали с использованием клеток НЕК, трансфицированных генетической конструкцией, кодирующей рекомбинантный МВР человека, слитный с FLAG-эпитопом. Вестерн-блоттинг лизатов клеток, обработанных циклогексимидом в течение различного количества времени (**Рис. 1А**), показал, что в клетках НЕК МВР достаточно быстро подвергается протеолизу со средним временем полужизни около 1 часа. При этом протеолиз МВР очевидно осуществляется протеасомой, т.к. в присутствии ингибитора PS-341 его протеолиз практически полностью останавливается. Количество GFP, не являющегося субстратом для протеасомы, с течением времени остается практически неизменным. Для анализа протеолиза внутриклеточного МВР протеасомой в условиях, более приближенных к физиологическим, была получена первичная культура олигодендроцитов. Иммуноцитохимический анализ подтвердил наличие значительного количества OSP-позитивных клеток (олигодендроцит-специфический белок), при этом процентное содержание GFAP-позитивных клеток (glial fibrillary acidic protein, маркер астроцитов) не превышало 10% (**Рис. 1Б**). Для усиления экспрессии эндогенного МВР клетки обрабатывали 0.2 мкМ раствором бензотропина в течение двух суток перед анализом. Важно отметить, что внутриклеточный МВР заметно накапливался под действием ингибитора протеасомы PS-341 (**Рис. 1В**), что свидетельствует о протеасомной природе метаболизма МВР в олигодендроцитах.

Чтобы определить, подвергается ли МВР убиквитинилированию в клетках, рекомбинантный МВР-FLAG иммунопреципитировали из гомогената клеток НЕК, котрансфицированных генетическими конструкциями, кодирующими rhМВР-FLAG и убиквитин, слитный с HA-эпитопом (HA-Ub) (**Рис. 2**). В качестве положительного контроля использовали прекурсор NF- κ B белок p105, слитный с FLAG-эпитопом. В качестве отрицательного контроля использовали белок Ubc6. После обработки клеток ингибитором протеасомы MG132 в преципитатах, содержащих МВР-FLAG, отсутствовали даже следовые количества полиубиквитиновых конъюгатов, в то время как в преципитатах, содержащих p105-FLAG, полиубиквитиновые конъюгаты явно присутствовали. Таким образом, можно предположить, что в клетках млекопитающих МВР подвергается гидролизу протеасомой в отсутствие полиубиквитинилирования.

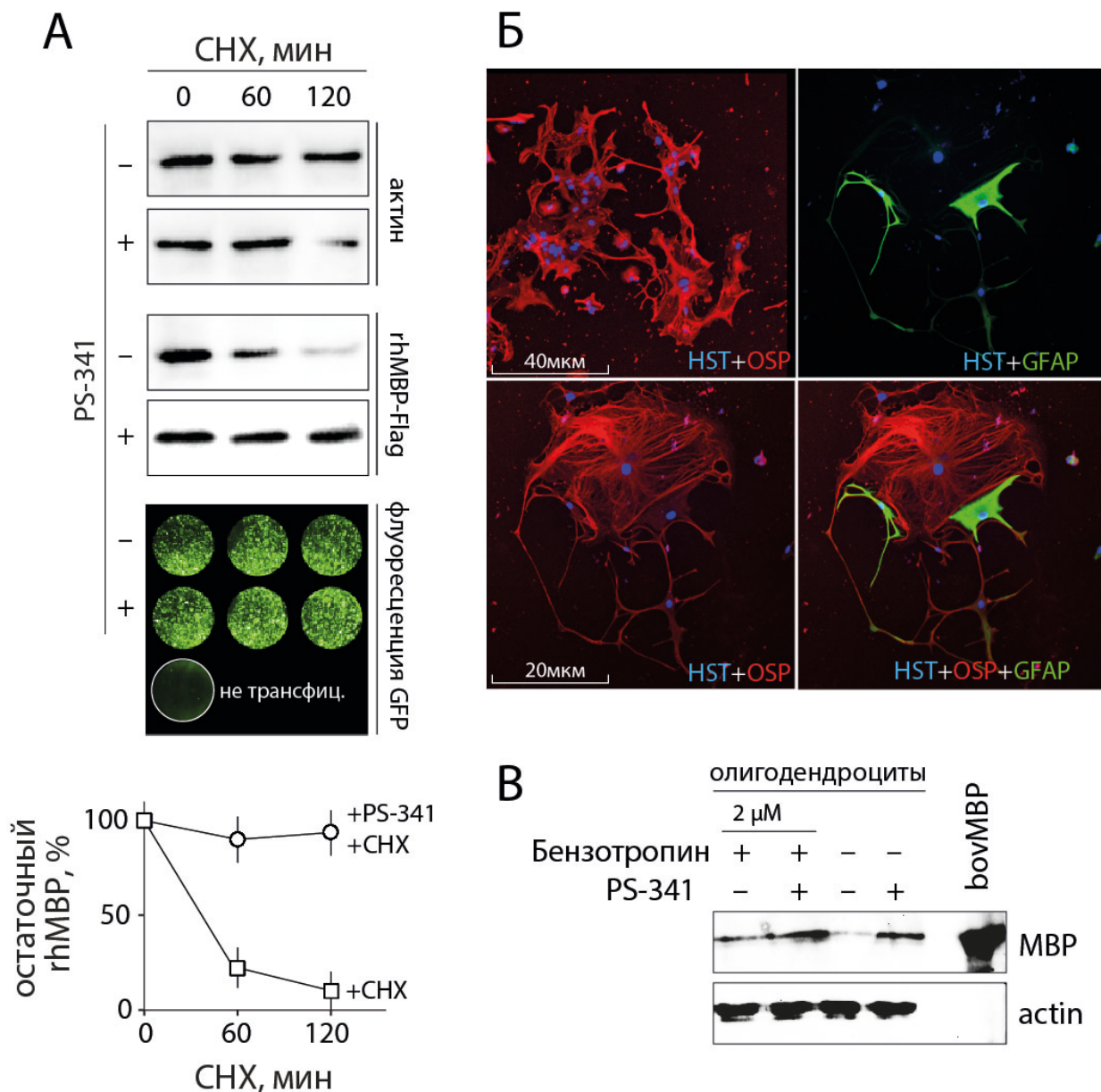


Рисунок 1. А. Определение скорости протеолиза белков в клетке с использованием циклогексимида (CHX). Б. Иммуноцитохимическое окрашивание культуры зрелых олигодендроцитов. HST – ядерный краситель Hoechst 33342, OSP – анти-OSP антитело, GFAP – анти-GFAP антитело В. Протеолиз MBP в культуре олигодендроцитов. Вестерн-блоттинг лизатов культуры зрелых олигодендроцитов, обработанных и необработанных PS-341 и бензтропином. Гибридизация с антителами, специфичными к MBP и актину.

Чтобы определить, необходимо ли полиубиквитинилирование для гидролиза MBP протеасомой, были проведены дополнительные эксперименты с использованием генетической конструкции, кодирующей вариант убиквитина K0 (UbK0), в котором все остатки лизина заменены на остатки аргинина, а также малыми интерферирующими РНК, блокирующими экспрессию убиквитин-лигазы E1 (E1 siRNA). Клетки линии НЕК были трансфицированы генетическими конструкциями, коди-

рующими UbK0 или убиквитин дикого типа (Ub WT), слитных с мус эпитопом (Рис. 3А и 3Б).

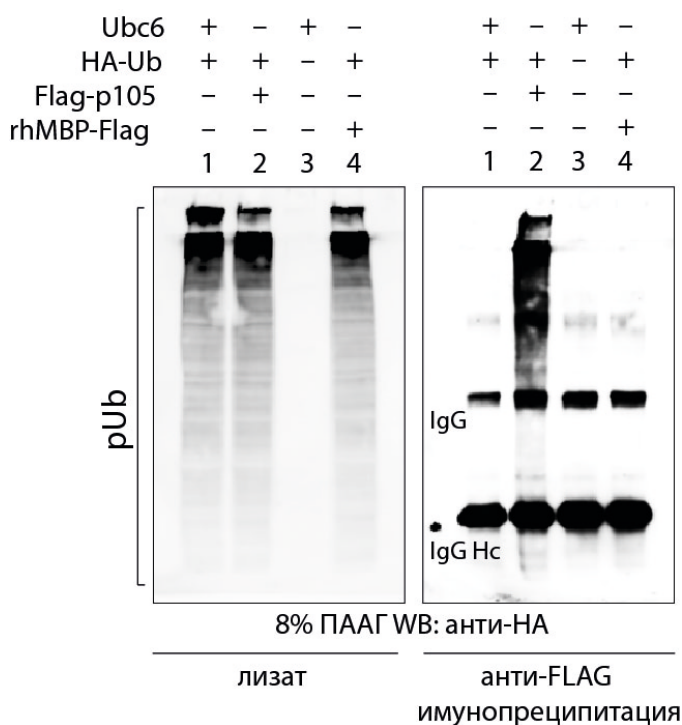


Рисунок 2. Полиубиквитинилирование MBP в клетках млекопитающих. Исходные лизаты клеток (слева) и соответствующие им элюаты после иммунопреципитации (справа) анализировали методом вестерн-блоттинга с окрашиванием анти-НА антителами. ПААГ – полиакриламидный гель, IgG – присутствующее в элюате анти-FLAG антитело, IgG Hc – его тяжелая цепь, IgG Lc – его легкая цепь, pUb – полиубиквитиновые конъюгаты.

Во втором случае клетки были трансфицированы E1 siRNA или иррелевантной siRNA в качестве контроля (Рис. 3В и 3Г). Спустя 24 часа клетки были повторно трансфицированы генетическими конструкциям, кодирующими белки MBP, с-Мус (контроль, убиквитин-зависимый субстрат) или орнитиндекарбоксилазу (ODC, контроль, убиквитин-независимый субстрат). Еще спустя 24 часа анализировали внутриклеточный протеолиз с использованием циклогексимида. Как и ожидалось, котрансфекция как UbK0, так и E1 siRNA к E1 блокировала протеасомальный гидролиз белка с-Мус и способствовала его накоплению, в то время как протеолиз ODC протеасомой в этих условиях не изменялся по сравнению с контрольной трансфекцией. MBP подвергался протеолизу с одинаковой скоростью во всех условиях, что свидетельствует об отсутствии необходимости в модификации MBP убиквитином для его гидролиза протеасомой.

1.2. Протеолиз MBP 26S протеасомой *in vitro*

26S протеасому выделяли из головного мозга мыши по методике, включающей осаждение 40% сульфатом аммония, гель-фильтрацию и анионообменную хроматографию, что исключает присутствие каких-либо компонентов системы убиквитинилирования.

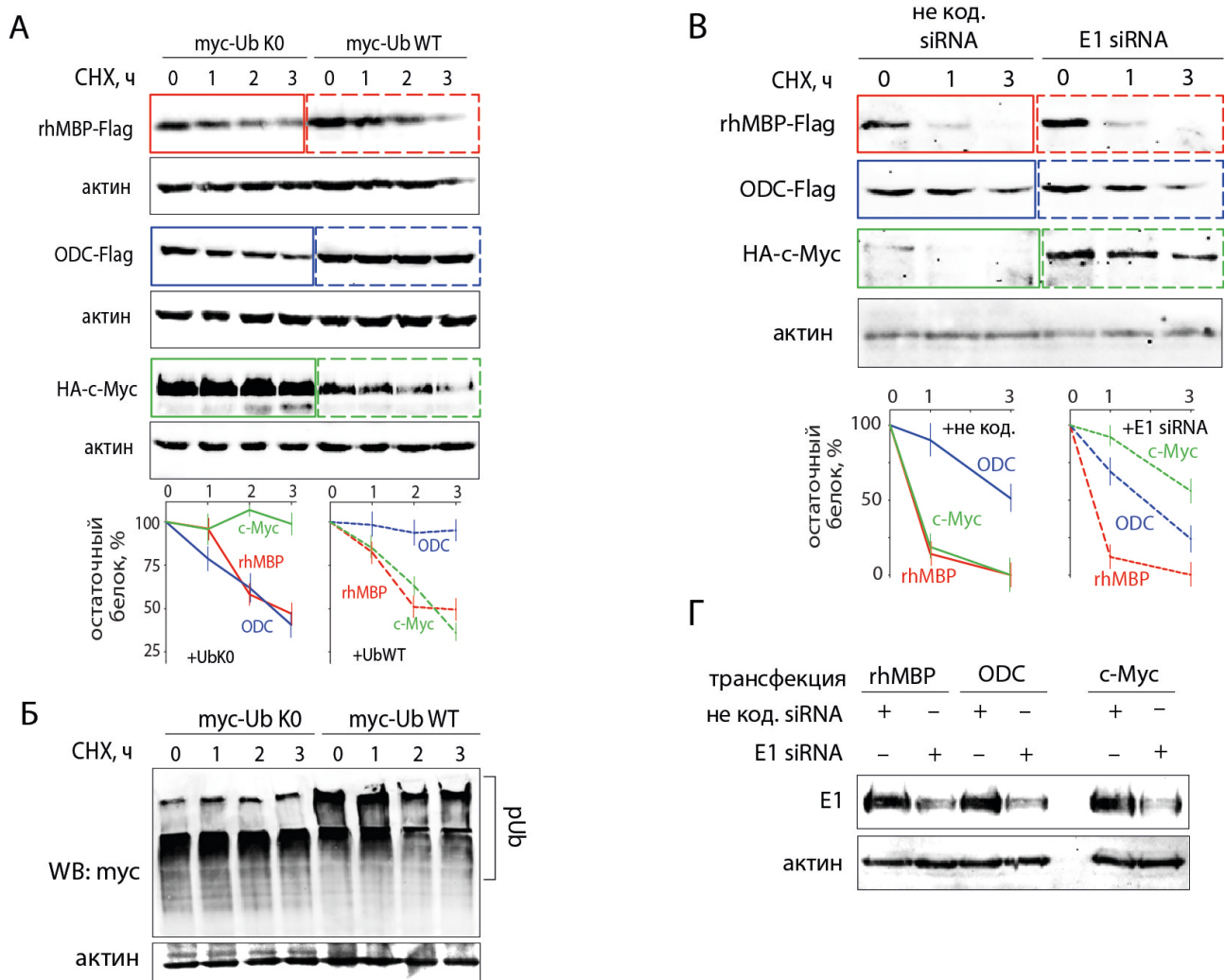


Рисунок 3. Изучение необходимости модификации убиквитином для протеасомального гидролиза MBP в клетках млекопитающих.

MBP подвергался гидролизу *in vitro* в отсутствие каких-либо компонентов системы убиквитинилирования подобной высокоочищенной 26S протеасомой, в отличие от других белков – BSA, тиоредоксина и лизоцима, которые не подвергались протеолизу даже после 24 часов инкубации (**Рис. 4А**).

Чтобы изучить влияние заряда MBP на эффективность убиквитин-независимого протеолиза, были получены ацетилированная и деиминированная формы MBP, обладающие меньшим положительным зарядом. Скорость гидролиза как ацетилированного, так и деиминированного MBP очищенным препаратом 26S протеасомы существенно замедляется по сравнению с немодифицированным природным MBP (**Рис. 4Б**), что свидетельствует о том, что возможность убиквитин-независимого протеолиза MBP по-видимому в первую очередь обусловлена большим положительным зарядом этого белка. Другим очевидным способом нейтрализации высокого положительного заряда MBP является образование ком-

плексов MBP с различными белками, которые частично компенсируют его высокий заряд.

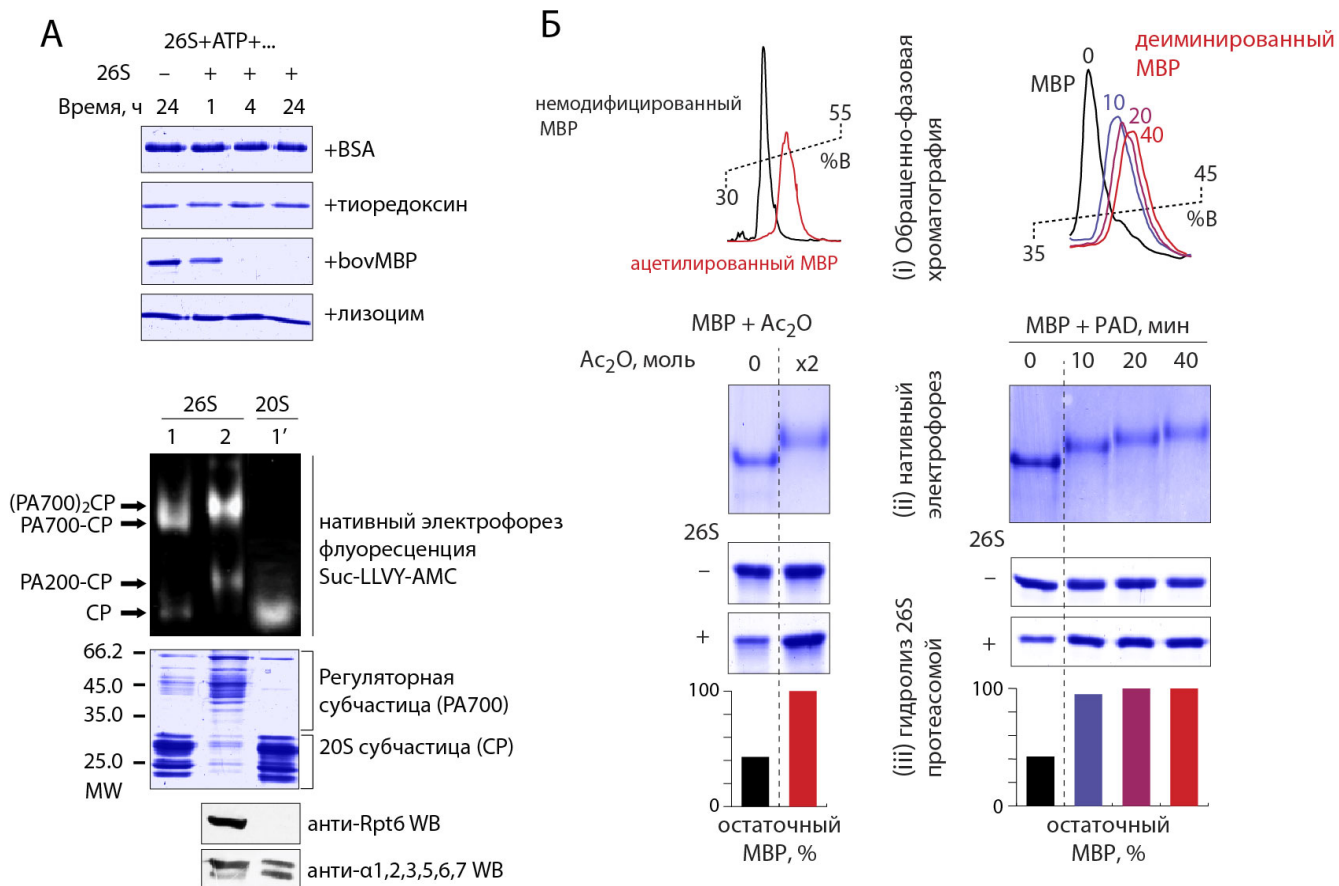


Рисунок 4. А. Электрофоретическое разделение в ПААГ гидролизатов различных белков очищенным препаратом 26S протеасомы. Анализ состава субъединичного состава очищенных препаратов протеасомы, сверху-вниз электрофоретическое разделение в нативном и денатурирующих ПААГ, вестерн-блоттинг с использованием соответствующих антител. **Б.** Снижение поверхностного положительного заряда MBP путем ацетилирования (слева) и деиминирования (справа) и гидролиз полученных модифицированных форм MBP очищенным препаратом 26S протеасомы.

Скорость гидролиза MBP протеасомой в присутствии различных белков определяли электрофоретическим разделением реакционных смесей в ПААГ с последующим денситометрическим анализом (Рис. 5А). Ни тетраубиквитин, ни моноубиквитин не влияли на скорость гидролиза MBP протеасомой, что позволяет предположить, что взаимодействие MBP с убиквитин-связывающими доменами 19S регуляторной субчастицы не является необходимым для его протеасомного гидролиза. Присутствие GST, BSA или лизоцима не влияло на скорость гидролиза MBP, в то время как актин, кальмодулин, гистон H1.3 и глатирамера ацетат (GA) ингибировали протеолиз MBP протеасомой. В дальнейшем методом поверхностного плазмонного резонанса было установлено, что MBP взаимодействует с актином, но не связывается с GA и гистонами H1.3, в то время как 26S протеасома

взаимодействовала с GA и гистоном H1.3, но не взаимодействовала с актином (Рис. 5Б). Таким образом, белки, способные ингибировать гидролиз MBP, поделились на 2 подгруппы по механизму своего действия – взаимодействующие с MBP и взаимодействующие с протеасомой.

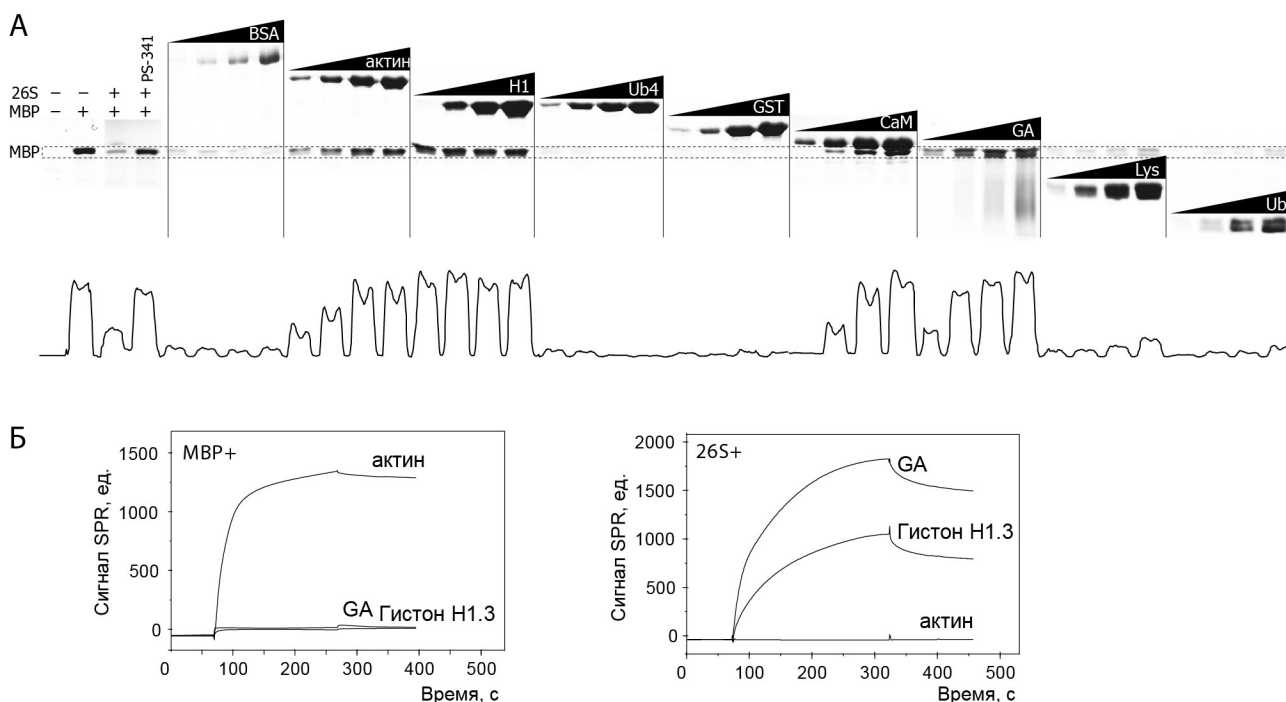
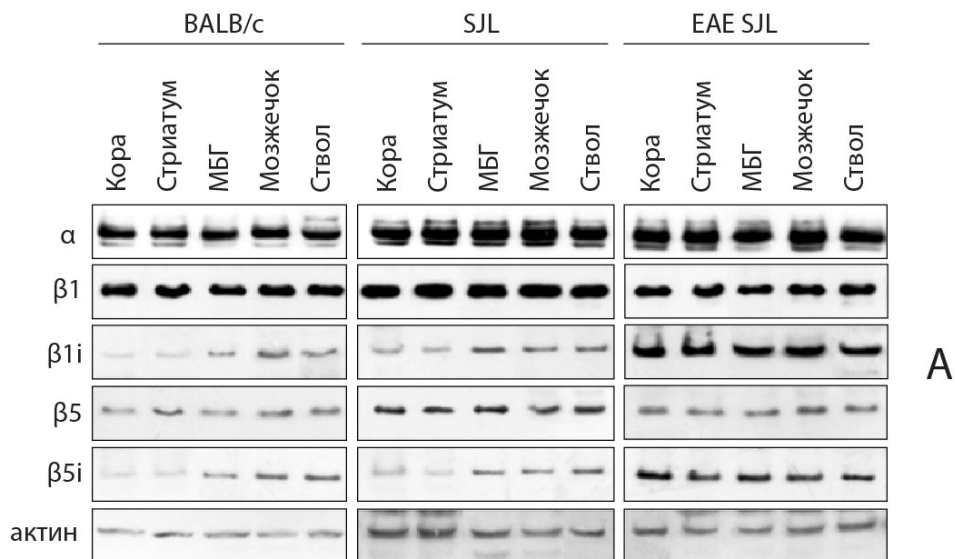


Рисунок 5. А. Электрофореграммы разделения в ПААГ продуктов гидролиза MBP 26S протеасомой *in vitro* в присутствии различных концентраций ряда белков. **Б.** Анализ связывания актина, гистона H1.3 и GA с MBP и 26S протеасомой.

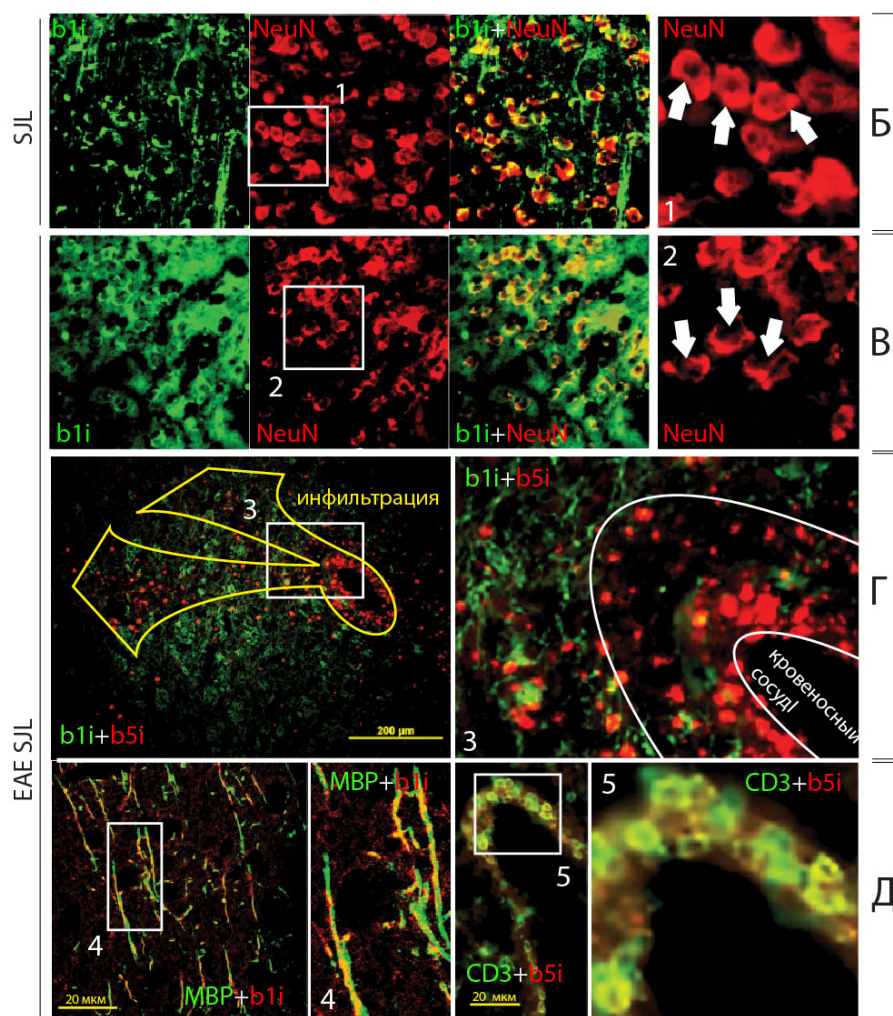
2. Анализ физиологической значимости деградации MBP иммунотеасомой

2.1. Изучение баланса протеасома-иммунопротеасома в ЦНС при развитии ЕАЕ.

Нами было исследовано содержание субъединиц конститутивной протеасомы $\beta 1/\beta 5$, и соответствующих им иммуносубъединиц $\beta 1i/\beta 5i$ в различных отделах головного мозга контрольных мышей линии BALB/c, мышей линии SJL, предрасположенных к развитию ЕАЕ, и мышей линии SJL, развивающих ЕАЕ вследствие иммунизации (Рис. 6А). Выяснилось, что содержание иммуносубъединиц протеасомы во всех отделах головного мозга значительно повышается у мышей линии SJL при развитии ЕАЕ. Кроме того, статистически значимое увеличение содержания иммуносубъединиц протеасомы в коре, стриатуме и медиабазальном гипоталамусе (МБГ) наблюдалось у неиммунизированных мышей линии SJL в сравнении с мышами линии BALB/c.



А



Б

В

Г

Д

Рисунок 6. А. Вестерн-блоттинг гомогенатов различных отделов головного мозга мышей на предмет наличия субъединиц конститутивной ($\beta 1/\beta 5$) или иммунной протеасомы ($\beta 1i/\beta 5i$). МБГ – медиабазальный гипоталамус. Б-Д. Иммуногистохимический анализ срезов головного мозга неиммунизированных мышей линии SJL (Б) и мышей линии SJL, развивающих EAE (В,Г,Д).

Для локализации иммунопротеасомы в ЦНС было проведено иммуногистохимическое исследование срезов головного мозга экспериментальных мышей. У мышей, больных ЕАЕ, повышение экспрессии субъединицы $\beta 1i$ в тканях ЦНС коррелирует с пониженной окраской на NeuN (**Рис. 6Б и 6В**), что свидетельствует о апоптотических процессах в нейронах. Данное наблюдение прямо указывает на связь между нейродегенерацией и активностью иммунопротеасомы. Интересно, что дальнейшее изучение локализации $\beta 1i$ и $\beta 5i$ в ЦНС мышей с ЕАЕ, показало, что $\beta 1i$ накапливается в олигодендроцитах - резидентных клетках ЦНС, а $\beta 5i$ скорее всего привносится в ЦНС извне Т-клетками, проникающими через поврежденный гематоэнцефалический барьер (**Рис. 6Г и 6Д**).

2.2. Сравнение спектров деградации МВР конститутивной протеасомой и иммунопротеасомой

Процесс ферментативной деградации основного белка миелина может протекать по двум основным путям – с помощью протеасомы и протеаз. Чтобы выяснить, как отличается гидролиз МВР протеасомой в норме и патологии, мы провели *in vitro* гидролиз МВР протеасомами из головного мозга здоровых мышей и мышей, развивающих ЕАЕ, а также рядом протеолитических ферментов, которые, как полагают, ассоциированы с развитием рассеянного склероза. Продукты гидролиза анализировали методом тандем-масс-спектрометрии (**Рис. 7**). Под действием протеолитических ферментов в основном образовывались пептиды, относящиеся к фрагменту МВР₁₁₀₋₁₃₀, в то время как в гидролизатах протеасомой обнаруживались пептиды, относимые практически ко всей аминокислотной последовательности МВР. Особо необходимо отметить, что спектры пептидов, образуемые под действием протеасомы из головного мозга здоровых и развивающих ЕАЕ мышей, заметно отличаются друг от друга. Пептиды, полученные под действием протеасомы из головного мозга развивающих ЕАЕ мышей, существенно перекрывались с основными Т-клеточными эпитопами МВР. Для количественного сравнения относительного содержания пептидов МВР в протеасомных гидролизатах был разработан метод, основанный на применении воды, содержащей нуклид кислорода ¹⁸O (**Рис. 8А**). Пептиды, полученные при гидролизе МВР протеасомами из различных источников, отличались друг от друга на 2 единицы молекулярной массы, но обладали одинаковым временем удерживания на обращенно-фазовом сорбенте и одинаковой эффективностью ионизации. Это позволило осуществить количественный анализ образования более чем 250 фрагментов МВР под действием протеасом из мышей линий BALB/c и SJL с и без ЕАЕ (**Рис. 8Б**).

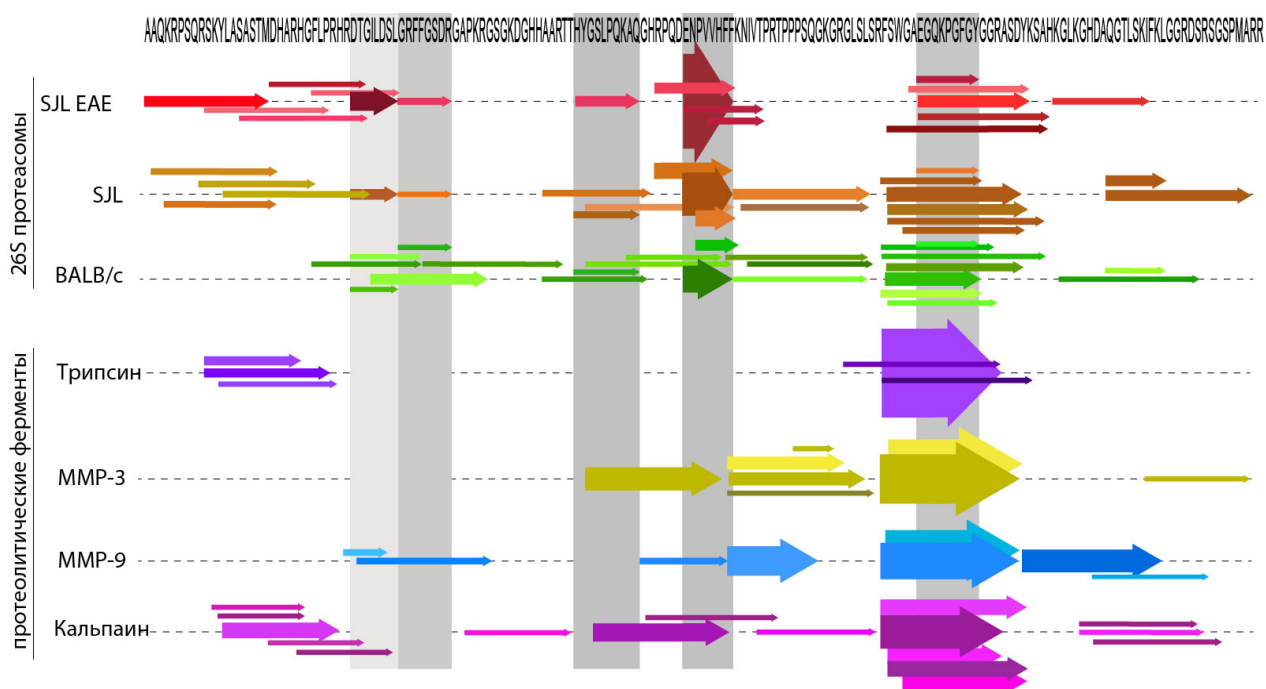


Рисунок 7. Паттерны деградации МВР протеасомами из головного мозга мышей, а также рядом протеаз, ассоциированных с развитием аутоиммунных патологий ЦНС. Сверху представлена аминокислотная последовательность МВР, каждая стрелка соответствует пептидному фрагменту этой аминокислотной последовательности, детектируемому масс-спектрометрически. Толщина стрелок соответствует количеству того или иного пептида по результатам безметочного (label-free) анализа.

Из этого количества 5 пептидов по структуре подходили для загрузки на МНС I. Количество двух из этих пептидов, DTGILDSL (МВР₃₃₋₄₀) и ENPVVHFF (МВР₈₃₋₉₀) увеличивалось в 10 раз при гидролизе МВР протеасомой из мозга ЕАЕ SJL в сравнении с гидролизом МВР протеасомой из мозга мышей линии BALB/c.

Пептид МВР₈₃₋₉₀ является частью энцефалитогенного фрагмента МВР, поэтому мы более детально изучили его образование при действии различных типов протеасомы на МВР. Для этого был синтезирован химически идентичный пептид с С-концевым фенилаланином, все атомы углерода и азота которого обладали массовыми числами 15 и 13, соответственно. Скорость образования пептида МВР₈₃₋₉₀, рассчитанная исходя из известного количества внутреннего стандарта, оказалась до 8 раз больше при гидролизе МВР протеасомой из мозга ЕАЕ SJL, чем при гидролизе протеасомой из мозга неиммунизированных мышей линии SJL и мышей линии BALB/c (**Рис. 9**). За 24 часа под действием протеасомы из головного мозга ЕАЕ-SJL образуется порядка 0.83 моль пептида ENPVVHFF на 1 моль изначального МВР.

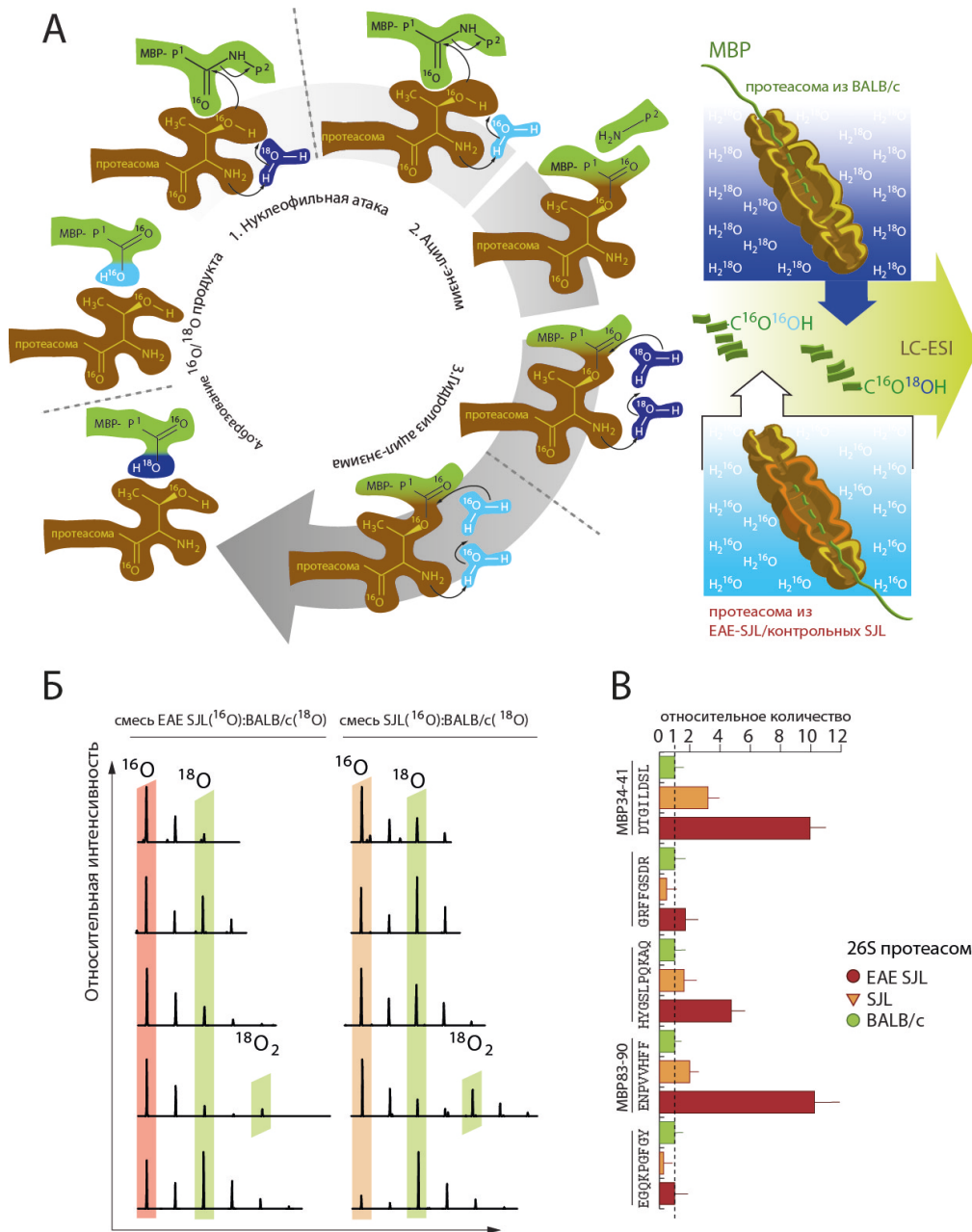


Рисунок 8. А. Схематическое изображение метода количественного анализа паттернов деградации МВР протеасомой с использованием воды, содержащей нуклид кислорода ^{18}O . **Б.** Пример участка масс-спектра, полученного данным методом. **В.** Количественная оценка некоторых пептидов МВР, образующихся под действием протеасом.

2.3. Свидетельство презентации пептида МВР83-90 на МНС I и анализ цитотоксического действия МВР₈₃₋₉₀-специфических Т-клеток на олигодендроциты.

Для изучения возможности презентации пептида ENPVVHFF на молекулах главного комплекса гистосовместимости первого класса (МНС I) были выделены мононуклеарные клетки из периферической крови мышей линии SJL, интересующего нас гаплотипа H-2^s, С3Н (H-2^k) – в качестве положительного контроля и BALB/c (H-2^d) в качестве отрицательного контроля. Мононуклеарные клетки инкубировали с синтетическим пептидом ENPVVHFF в течение 5 часов, тщательно отмывали, лизировали и определяли содержание ENPVVHFF методом количественной масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (MRM)

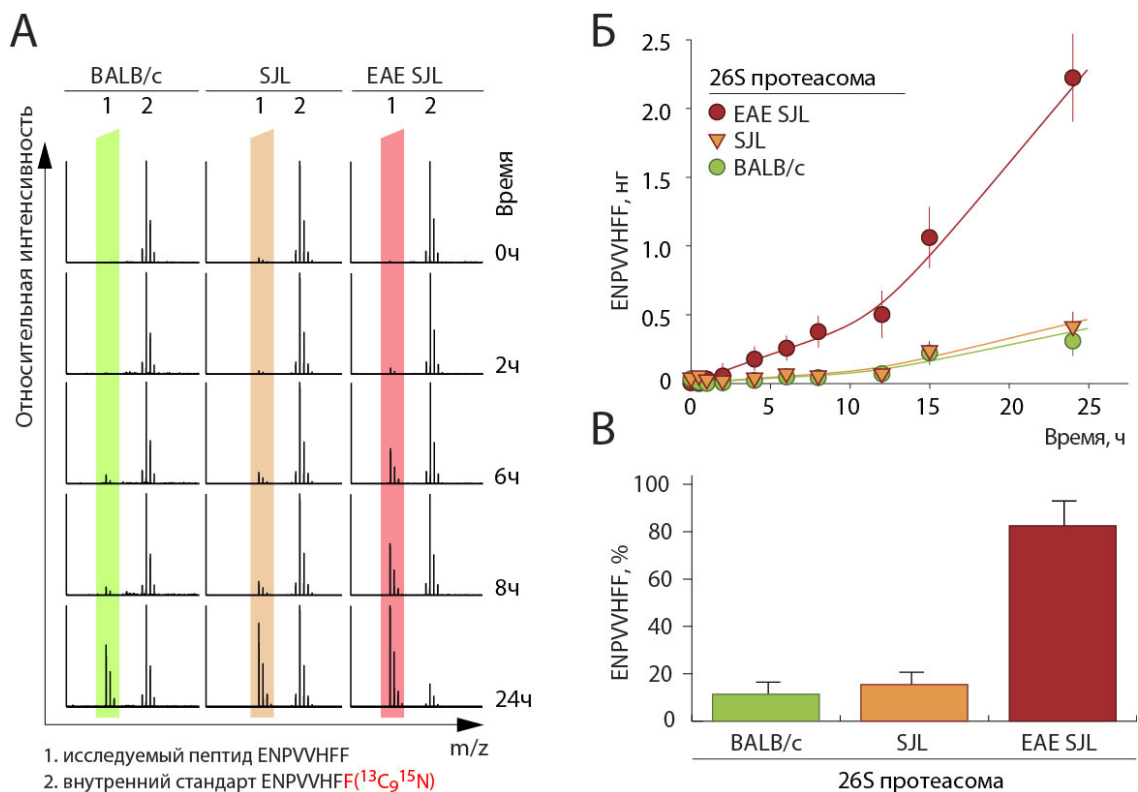


Рисунок 9. Участок масс-спектра (А), зависимость количества образовавшегося пептида ENPVVHFF от времени протеолиза (Б) и количество ENPVVHFF, образовавшегося за 24 часа гидролиза МВР протеасомой из головного мозга мышей BALB/c, SJL и EAE SJL (в процентах от количества исходного МВР) (В).

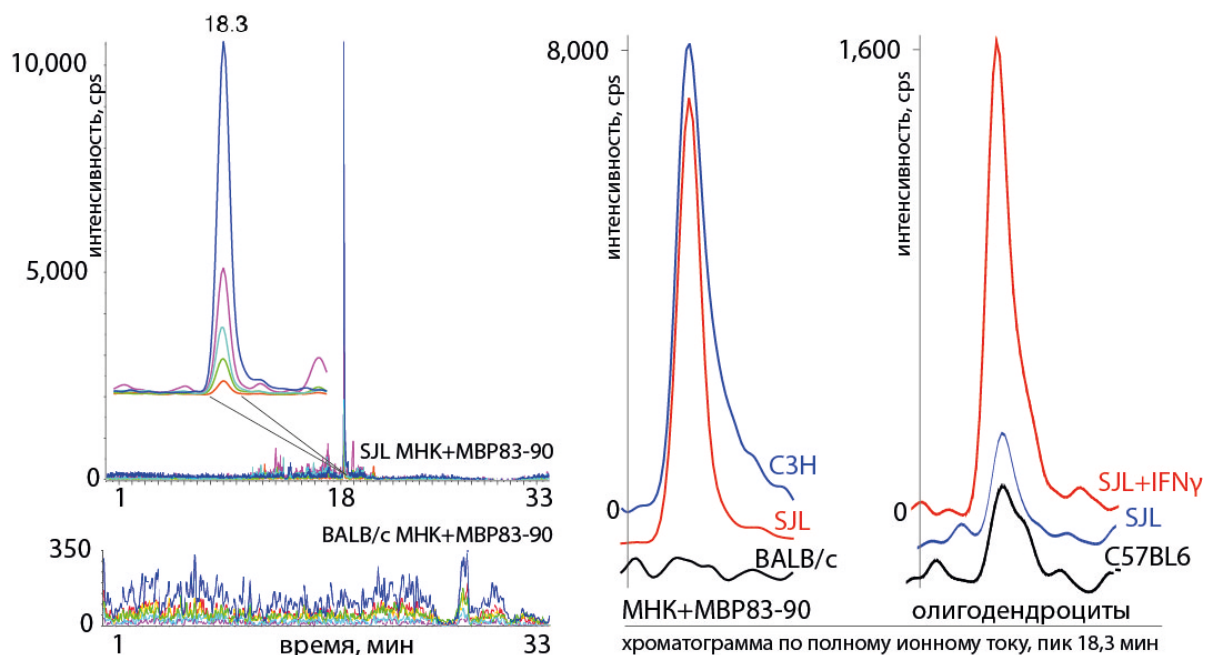


Рисунок 10. Анализ связывания пептида ENPVVHFF с МНС I мыши методом MRM масс-спектрометрии. Хроматограммы по полному ионному току (слева) и пик, соответствующий данному пептиду (время удерживания 18,3 мин) для 5 MRM транзаций (справа).

(Рис. 10). В результате анализа исследуемый пептид был обнаружен в образцах клеток с гаплотипами H-2^k и H-2^s, но не обнаружен в клетках с гаплотипом H-2^d. Методом MRM также было показано, что количество ENPVVHFF, образованного из эндогенного MBP, увеличивается в культуре олигодендроцитов при обработке интерфероном-гамма.

На следующем этапе работы из мышей линии SJL методом активации *ex vivo* были получены цитотоксические Т-лимфоциты, специфичные к ENPVVHFF. В качестве контроля использовались цитотоксические Т-лимфоциты, специфичные к пептиду вируса энцефалита Тейлера FNFTAPFI. Цитотоксические ENPVVHFF-реактивные Т-лимфоциты специфически лизировали олигодендроциты, полученные из мышей линии SJL, при этом этот процесс ингибировался анти-МНС I антителами и его эффективность значительно увеличивалась в случае олигодендроцитов, обработанных интерфероном-гамма (**Рис. 11**).

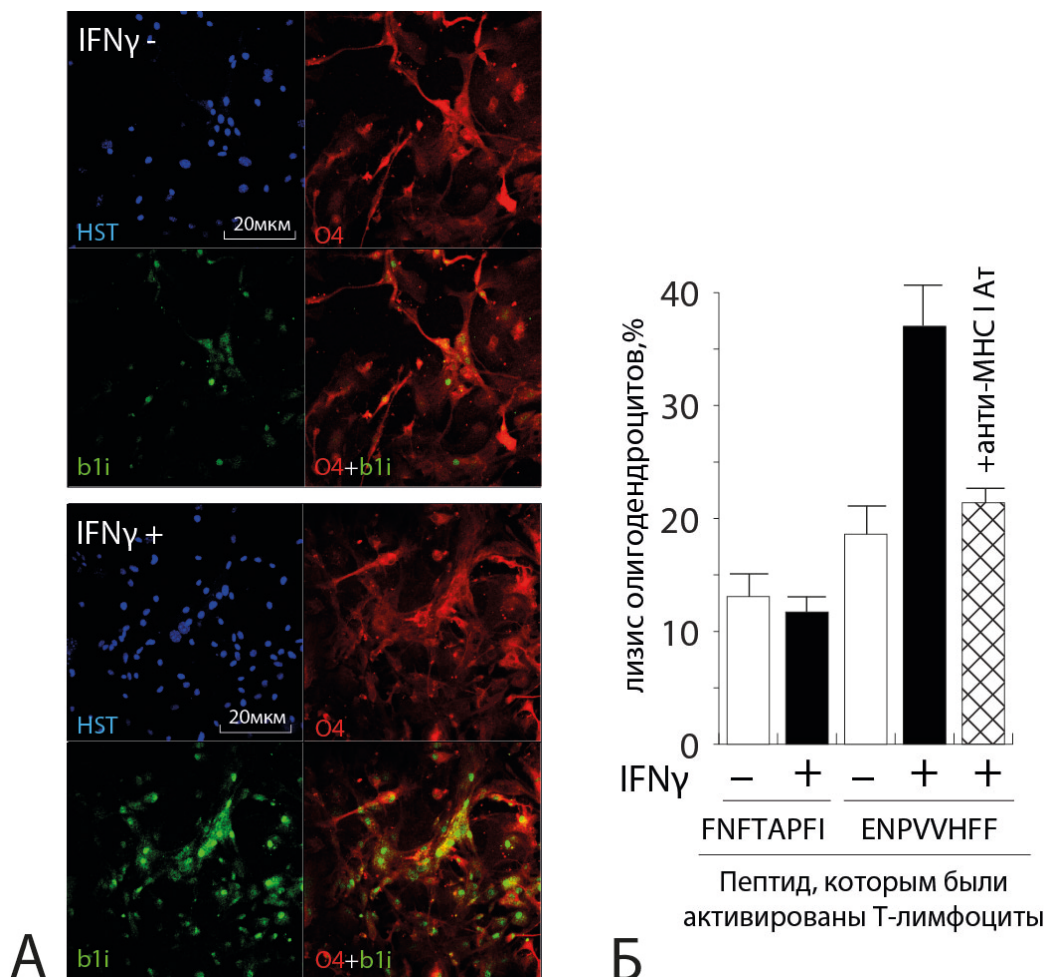


Рисунок 11. А. Иммуноцитохимия культуры зрелых олигодендроцитов, обработанных (внизу) и не обработанных (вверху) интерфероном-гамма. Гибридизация с антителами к O4 (маркер олигодендроцитов) и иммуносубъединице протеасомы $\beta 1i$. **Б.** Лизис олигодендроцитов, обработанных (IFN γ +) и не обработанных (IFN γ -) интерфероном-гамма, цитотоксическими Т-лимфоцитами.

3. Подходы к направленному подавлению гидролиза МВР протеасомой для терапии ЕАЕ

Как показали результаты предыдущих экспериментов, протеолиз МВР иммунопротеасомой может быть одним из этапов СТЛ-опосредованного разрушения миелиновой оболочки нервных волокон и развития аутоиммунных патологий ЦНС. Если заблокировать этот процесс, то это, возможно, остановит или замедлит аутоиммунную демиелинизацию. Подавление экспрессии иммуносубъединиц протеасомы с помощью соответствующих siRNA является способом воздействия на процесс протеолиза МВР иммунопротеасомой. Проведение предварительной трансфекции клеточной культуры siRNA к иммуносубъединицам протеасомы $\beta 1i$ и $\beta 5i$ в сравнении с контрольной siRNA не только понижало уровень экспрессии соответствующих иммуносубъединиц, но и ингибировало внутриклеточный протеолиз МВР (Рис. 12).

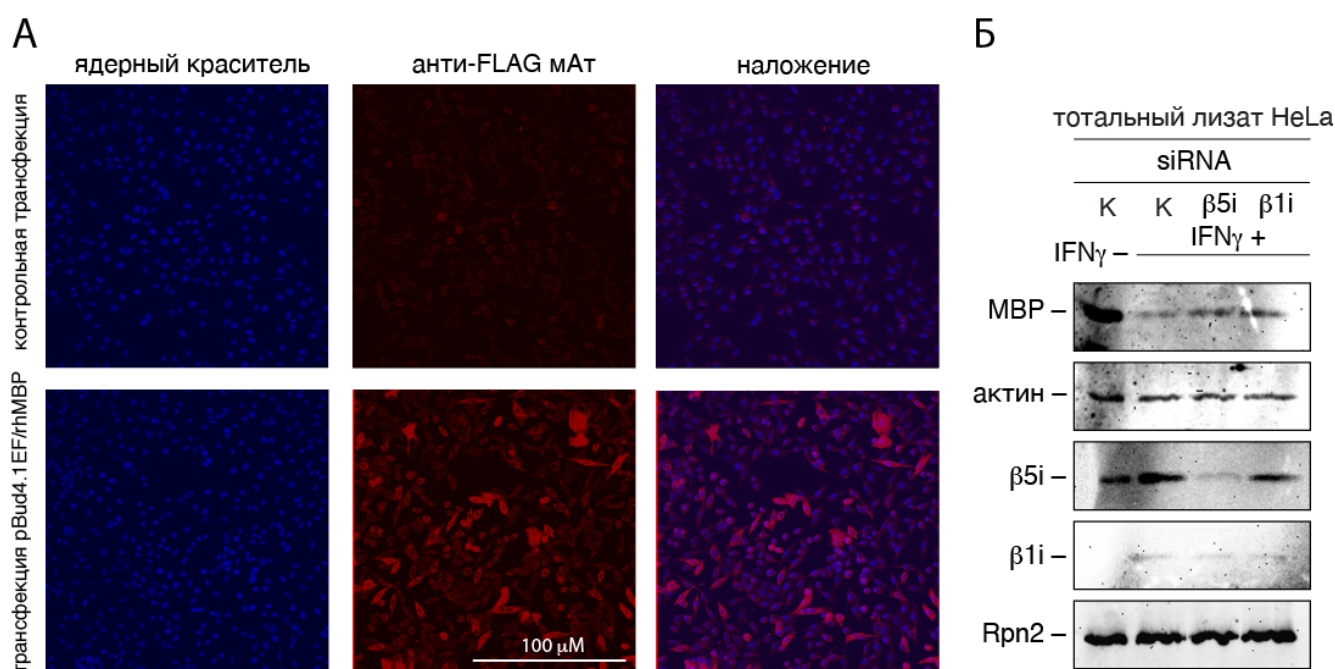


Рисунок 12. А. Иммуноцитохимический анализ клеток линии HeLa, трансфицированных генетической конструкцией, кодирующей МВР, слитный с Flag эпитопом. Контрольная трансфекция – HA-с-Мус. Б. Вестерн_блоттинг лизатов клеток линии HeLa, экспрессирующих рекомбинантный МВР, обработанных (IFN γ +) и необработанных (IFN γ -) интерфероном γ , а также клеток, в которых понижен уровень иммуносубъединиц $\beta 1i$ и $\beta 5i$ в результате воздействия малых интерферирующих РНК.

Другой подход к блокированию протеолитической активности иммунопротеасомы заключается в применении низкомолекулярных ингибиторов. Для этого были проанализированы 3 ингибитора протеасомы: PS-341, воздействующий на все каталитические субъединицы конститутивной и иммунопротеасомы; MG-132, ингибирующий преимущественно химотрипсин-подобную активность конститу-

тивной и иммунопротеасомы, и $\beta 1i$ -специфический пептидилэпоксикетон, необратимо ковалентно связывающий остаток треонина в активном центре данной субъединицы. Константы ингибирования для PS-341 и MG-132 (Табл. 1) соответствовали ранее опубликованным данным. Константа ассоциации $k_{obs}/[I]$ для $\beta 5i$ -специфического пептидилэпоксикетона составила около $240 \text{ M}^{-1}\text{сек}^{-1}$. PS-341 и MG-132 одинаково воздействовали на протеасому из головного мозга здоровых и развивающих ЕАЕ мышей. В случае $\beta 1i$ -специфического пептидилэпоксикетона, как и следовало ожидать, эффективность ингибирования напрямую зависела от количества конститутивных и иммуносубъединиц протеасомы. Наиболее эффективно данный ингибитор подавлял активность протеасомы из головного мозга ЕАЕ-SJL мышей, при этом он практически не воздействовал на протеасому из головного мозга мышей линии BALB/c (Рис. 13А). Все три протестированных ингибитора существенно замедляли гидролиз MBP 26S протеасомой *in vitro* (Рис. 13Б).

Таблица 1. Ингибирование химотрипсин-подобной активности протеасомы из головного мозга мышей.

26S протеасома из головного мозга	PS-341* K_i , нМ	MG-132† K_i , нМ	$\beta 1i$ -PEK $k_{obs}/[I]$, $\text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$
BALB/c	7±2	28±8	не определена
Контрольные SJL	10±3	35±8	230±60
ЕАЕ SJL	6±2	26±4	250±40

На конечном этапе была протестирована способность ингибиторов PS-341 и $\beta 1i$ -специфического пептидилэпоксикетона подавлять развитие ЕАЕ у мышей линии SJL. Указанные препараты вводили внутривенно в хвостовую вену 2 раза в неделю с первого по 21й день после иммунизации. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что $\beta 1i$ -специфический пептидилэпоксикетон снижает тяжесть протекания заболевания эффективнее, чем PS-341 в той же дозировке (0.5 мг/кг) (Рис. 13В).

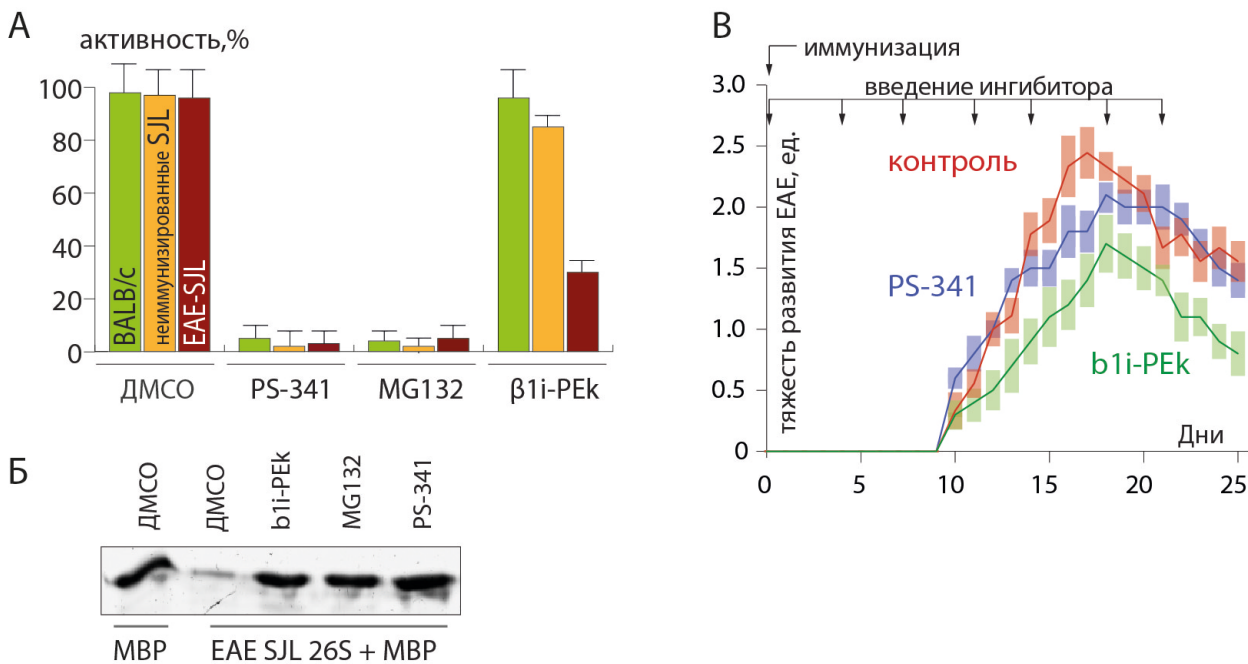
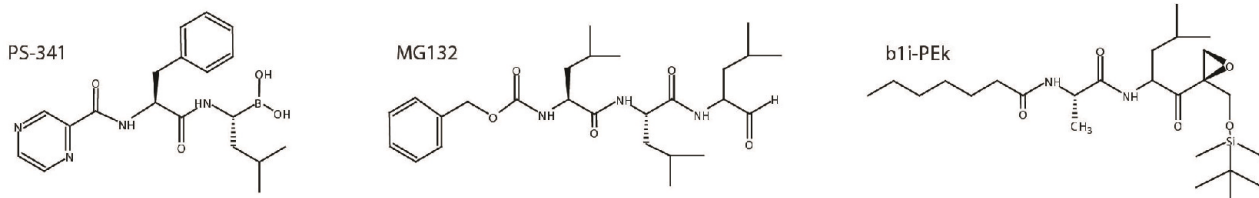


Рисунок 13. А. Химотрипсин-подобная активность протеасомы (в процентах от активности протеасомы, не обработанной ингибиторами) при воздействии 1% ДМСО (контроль), 1 мкМ PS-341, 1 мкМ MG-132 и 1 мкМ β 1i-специфического пептидилэпоксикетона Б. Воздействие ингибиторов протеасомы на гидролиз MBP *in vitro* 26S протеасомой из головного мозга мышей SJL-EAE. В. Терапия EAE ингибиторами протеасомы у мышей линии SJL

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

На основании полученных в работе данных можно сделать предположение о роли убиквитин-независимого гидролиза MBP иммунопротеасомой в развитии аутоиммунных патологий ЦНС (Рис. 14). Рассеянный склероз и EAE характеризуются повреждением гематоэнцефалического барьера и развитием воспаления в ЦНС, что приводит к активному траффингу аутореактивных лимфоцитов в ЦНС. Секретируемые ими провоспалительные цитокины, в частности интерферон-гамма, взаимодействуют с соответствующими рецепторами на поверхности олигодендроцитов и посредством сигнальных каскадов активируют экспрессию в этих клетках иммуносубъединицы протеасомы β 1i. Под действием иммунопротеасомы образуется повышенное количество пептида MBP₈₃₋₉₀ [ENPVVHFF], который в контексте MHC I эффективно распознается CD8⁺ Т-лимфоцитами. Непосредственное взаимодействие олигодендроцитов с эффекторными клетками, обусловленное

этими событиями, приводит к их гибели, разрушению миелиновой оболочки и, как следствие, нарушению проведения нервного импульса.

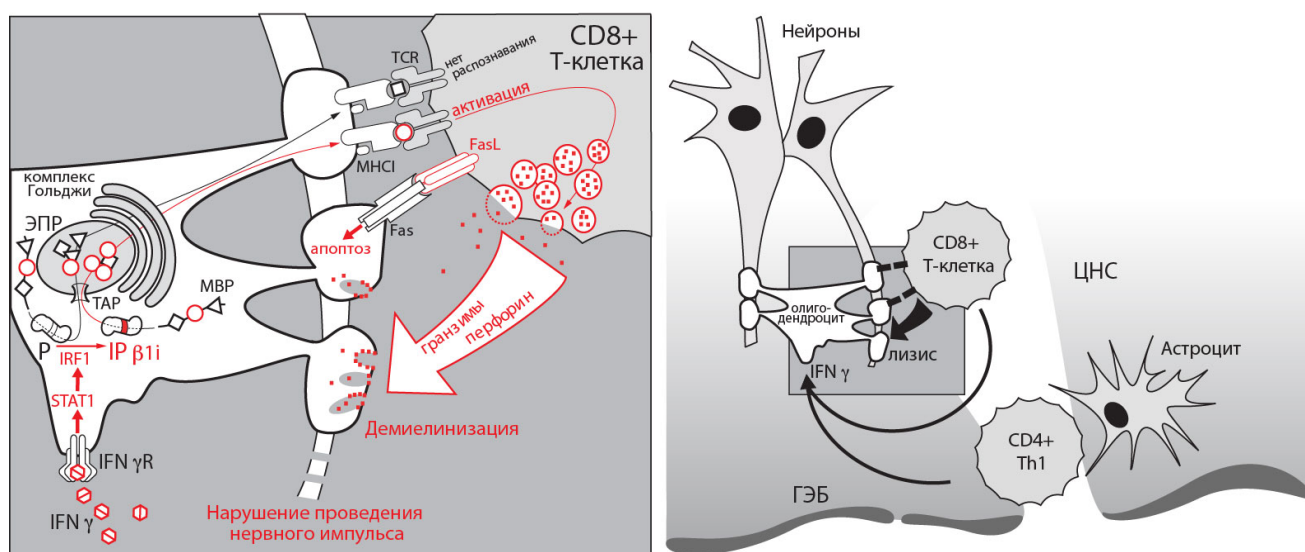


Рисунок 14. Предполагаемая патологическая роль убиквитин-независимого гидролиза МВР иммунопротеасомой в развитии аутоиммунных заболеваний ЦНС

ВЫВОДЫ.

1. На основе проведенных экспериментов показано, что один из наиболее важных аутоантигенов при рассеянном склерозе, основной белок миелина (МВР), при физиологически значимых концентрациях гидролизуется 26S протеасомой по убиквитин-независимому пути. Возможность убиквитин-независимого протеолиза МВР как минимум частично обусловлена его аномально высоким положительным зарядом.

2. Продемонстрировано, что количество каталитических иммуносубъединиц протеасомы значительно возрастает в ЦНС животных с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЕАЕ). При этом субъединица $\beta 1i$ локализована преимущественно в олигодендроцитах - резидентных клетках ЦНС, а $\beta 5i$ локализована преимущественно в Т-лимфоцитах, проникающих в ЦНС через поврежденный гематоэнцефалический барьер.

3. При гидролизе МВР иммунопротеасомой, выделенной из головного мозга мышей, развивающих ЕАЕ, образуется повышенное количество ряда пептидов, в том числе пептида МВР₈₃₋₉₀ [ENPVVHFF], являющегося частью энцефалитогенного фрагмента МВР. CD8+ Т-клетки, специфичные к данному пептиду, лизируют обработанные интерфероном-гамма олигодендроциты *ex vivo*, что указывает на возможную роль иммунопротеасомы в аутоиммунной демиелинизации.

4. Специфический ингибитор иммуносубъединицы $\beta 1i$ селективно воздействует на иммунопротеасому *in vitro*, а также эффективно подавляет развитие ЕАЕ *in vivo* у экспериментальных животных. Это свидетельствует о перспективности применения ингибиторов иммунопротеасомы, в том числе $\beta 1i$ -специфических пептидилэпоксикетонов, в качестве терапевтических средств против аутоиммунных заболеваний ЦНС.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи:

1) Бачева А.В., Белогуров А.А., Кузина Е.С., М.В. Серебрякова, Н.А. Пономаренко, В.Д. Кнорре, В.М. Говорун, А.Г. Габибов. Функциональная деградация основного белка миелина. Протеомный подход. // *Биоорганическая химия*. — 2011. — Т. 37, № 1. — С. 39–47.

2) Кузина Е.С., Черноловская Е.Л., Кудряева А.А., Зенкова М.А., Кнорре В.Д., Сурина Е.А., Пономаренко Н.А., Бобик Т.В., Смирнов И.В., Бачева, А.В. Белогуров А.А., Габибов А.Г., Власов В.В. Ускорение внутриклеточного протеолиза основного белка миелина иммунопротеасомой. // *Доклады Академии наук, серия Биохимия и биофизика*. — 2013. — Т. 453, № 4. — С. 446–449.

3) Belogurov, A. Jr, Kudriaeva A. , Kuzina E. , Smirnov I. , Bobik T. , Ponomarenko N. , Kravtsova-Ivantsiv Y. , Ciechanover A. , and Gabibov A. . Multiple sclerosis autoantigen myelin basic protein escapes control by ubiquitination during proteasomal degradation. // *Journal of Biological Chemistry*. — 2014. — Vol. 289, no. 25. — P. 17758–17766.

4) Kuzina E., Kudriaeva A., Smirnov I., Dubina M., Gabibov A., Belogurov A. Jr. Glatiramer acetate and nanny proteins restrict access of the multiple sclerosis autoantigen myelin basic protein to the 26s proteasome. // *BioMed Research International*. — 2014. — P. 2014:926394–2014:926394.

5) 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. Ubiquitin-independent proteosomal degradation of myelin basic protein contributes to development of neurodegenerative autoimmunity. // *FASEB Journal*. - 14-259333 — 2015, Jan 29. 2015. * - equal contribution

Опубликованные тезисы конференций и доклады:

1) Кузина Е.С., Бачева А.В., Белогуров А.А., Габибов А.Г. Влияние состава каталитических субъединиц 26S протеасомы мышцы на ее ферментативную активность. Конференция «Ломоносов-2010» (Москва, 2010)

2) Кузина Е.С., Кононихин А.С., Белогуров А.А., Бачева А.В., Харьбин О.Н., Пономаренко Н.А., Николаев Е.Н., Габибов А.Г.. Изучение протеолиза основного белка миелина при аутоиммунных патологиях ЦНС методом масс-спектрометрии. IV Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения» (Московская обл., 2010).

3) Kuzina E., Kudriaeva A., Bacheva A., Gabibov A., Belogurov A.. Brain-derived immunoproteasome generates increased amounts of encephalitogenic mbp peptide epitope. The 38th FEBS Congress, Санкт-Петербург, 2013

4) Кузина Е.С., Кудряева А.А., Сурина Е.А., Кононихин А.С., Бачева А.В., Белогуров А.А., Габибов А.Г. Патогенное значение иммунопротеасом субъединичного состава $\beta 1i^{high}\beta 5i^{low}$ при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите. XXVI Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 2014

5) Кузина Е.С., Кудряева А.А., Сурина Е.А., Кононихин А.С., Бачева А.В., Белогуров А.А., Габибов А.Г. Убиквитин-независимый гидролиз основного белка миелина протеасомой и его роль в развитии аутоиммунных патологий ЦНС. Конференция «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург–Колтуши, 2014)

6) Кузина Е.С., Кудряева А.А., Сурина Е.А., Кононихин А.С., Бачева А.В., Белогуров А.А., Габибов А.Г. Убиквитин-независимый гидролиз основного белка миелина протеасомой и его роль в развитии аутоиммунных патологий ЦНС. VII Всероссийская конференция "Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция", Петрозаводск, 2014.