



УДК 577.22

СТРУКТУРА ВНЕШНЕГО ГЕПТАМЕРНОГО α -КОЛЬЦА 26S ИММУНОПРОТЕАСОМЫ ЧЕЛОВЕКА В ПРЕДАКТИВАЦИОННОМ СОСТОЯНИИ, ВЫЯВЛЕННАЯ МЕТОДОМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ С РАЗРЕШЕНИЕМ 3.6 Å

© 2024 г. Г. А. Саратов*, Т. Н. Баймухаметов**, А. Л. Коневега***, ****, *****,
А. А. Кудряева*, А. А. Белогуров*, *****, #

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** НИЦ “Курчатовский институт”, Россия, 123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

*** ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
НИЦ “Курчатовский институт”,

Россия, 188300 Гатчина, мкр. Орлова роца, 1

**** Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ),
Россия, 195251 Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

***** Московский государственный медико-стоматологический университет
им. А.И. Евдокимова Минздрава России,
Россия, 127473 Москва, ул. Десятская, 20/1

Поступила в редакцию 05.12.2023 г.

После доработки 13.12.2023 г.

Принята к публикации 14.12.2023 г.

26S протеасома представляет собой уникальный мультикаталитический протеиназный комплекс, совместно с системой убиквитинирования обеспечивающий контролируемую деградацию большинства внутриклеточных белков эукариот. Проблема изучения протеасомы состоит в множественности ее внутриклеточных форм, которые образуются благодаря модульности процесса сборки протеасомы. В настоящем исследовании методом криоэлектронной микроскопии нами впервые описана структура 26S иммунопротеасомы человека с разрешением 3.6 Å в сравнении с ее конститутивной формой. Детальный анализ структурных особенностей конститутивной и иммунной форм 26S протеасомы выявил раскрытие входа во внешнем гептамерном α -кольце 20S субчастицы иммунопротеасомы вследствие разобщенности *N*-концевых областей субъединиц PSMA4 и PSMA5 и образования π - π -укладки между остатками Tyr5 и Phe9 субъединиц PSMA5 и PSMA6 соответственно. Выявленное снятие стерического затруднения в центральном канале 20S субчастицы может свидетельствовать о предактивационном фенотипе 26S иммунопротеасомы человека даже в отсутствие связанного субстрата.

Ключевые слова: протеасома, иммунопротеасома, криоэлектронная микроскопия

DOI: 10.31857/S0132342324030101, **EDN:** NYZKEM

ВВЕДЕНИЕ

Убиквитин-протеасомная система, представленная более чем тысячей белков в геноме млекопитающих, участвует во всех критических внутриклеточных процессах, таких как дифференцировка, репарация ДНК, апоптоз, аутофагия, регуляция клеточного цикла, контроль качества белка,

контроль транскрипции и генерация пептидов, ассоциированных с комплексом гистосовместимости I класса [1]. Прежде чем произойдет деградация, опосредованная протеасомой, большинству белков необходимо быть ковалентно помеченными цепью в среднем из шести молекул убиквитина (Ub), что происходит благодаря каскаду убиквитин-лигаз [2]. Как правило, ϵ -аминогруппа

Сокращения: c26S – 26S конститутивная протеасома; i26S – 26S иммунопротеасома; IFN γ – интерферон гамма; Ub – убиквитин; крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 335-22-88; эл. почта: belogurov@ibch.ru).

лизина в полипептидной последовательности субстрата образует изопептидную связь с С-концевой карбоксильной группой аминокислотного остатка Gly76 проксимального Ub. Дальнейшая элонгация полиубиквитиновой цепи системой убиквитинирования осуществляется путем конъюгации следующей молекулы Ub с аминогруппой бокового радикала аминокислотного остатка Lys48 предыдущего Ub [3]. Открытие АТФ-зависимой системы убиквитинирования [4] было в дальнейшем комплементарно дополнено обнаружением мультикаталитического протеиназного комплекса массой 2.5 МДа, названного 26S протеасомой [5]. Дальнейшие исследования показали, что 26S протеасома содержит сложно организованную 19S регуляторную субчастицу [6], накрывающую торец 20S каталитической субчастицы, которая отвечает за распознавание [7], разворачивание [8], деубиквитинирование [9] субстрата и его транслокацию в каталитическую камеру [10].

Так называемое “каталитическое ядро” или “коровая” 20S субчастица представляет собой цилиндр, состоящий из четырех гептамерных колец – двух внешних α - и двух внутренних β -колец [11]. Из семи β -субъединиц только три – $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ – обладают каталитической активностью. У челюстных позвоночных животных, включая млекопитающих, конститутивные каталитические субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ под действием IFN γ заменяются на $\beta 1i$, $\beta 2i$ и $\beta 5i$, что приводит к образованию так называемой иммунопротеасомы. Иммунопротеасома теряет активность по типу каспазы, при этом по сравнению со стандартной протеасомой усиливается трипсиноподобная и химотрипсиноподобная активность. Набор антигенных пептидов, образующихся при действии иммунопротеасомы, отличается от набора пептидов, формирующегося за счет конститутивной протеасомы [12, 13]. Из-за разницы в субстратной специфичности между конститутивной протеасомой и иммунопротеасомой антигенные пептиды, имеющие гидрофобный С-конец и вследствие этого больше подходящие по структуре для загрузки на молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса, производятся главным образом иммунопротеасомой [14].

19S регуляторная субчастица (RP – regulatory particle, также известная как PA700 – proteasome activator 700) состоит из 19 различающихся между собой белковых субъединиц и подразделяется на “основание” (base) и “крышку” (lid). Нижний (базовый) элемент состоит из регуляторных частиц трипл-А (regulatory particle triple-A ATPase, Rpt), обладающих АТФазной активностью, и регуляторных частиц Rpn1, Rpn2, Rpn10 и Rpn13, не

являющихся АТФазами (Regulatory Particle, Non-ATPase-like, Rpn) [11]. Субъединицы Rpn10 [7], Rpn13 [15] и, как показано недавно, Rpn1 [16] являются рецепторами полиубиквитиновой цепи. Верхний элемент состоит из девяти не-АТФазных субъединиц: Rpn3, 5–9, 11–12 и Rpn11, осуществляющей деубиквитинирование субстрата.

На настоящий момент удалось изучить и описать молекулярный механизм, который лежит в основе гидролиза полиубиквитинированных субстратов протеасомой [17]. На первом этапе субстрат связывается посредством полиубиквитиновой цепи с UIM-доменами в составе убиквитиновых рецепторов регуляторной субчастицы протеасомы. Далее неструктурированный участок субстрата взаимодействует с верхними элементами субъединиц АТФазного кольца. Каскадный гидролиз АТФ в субъединицах Rpt1–6 приводит к перестройке АТФазного кольца в новую конфигурацию, вызывая уширение и выравнивание центрального канала, ведущего в протеолитическую полость 20S субчастицы. Одновременно с этим Rpn11 смещается в центральное положение непосредственно над входом в протеолитическую полость, благодаря чему активный сайт деубиквитиназы получает возможность отделить полиубиквитиновую цепь от субстрата по мере его транслокации. Недавно опубликованные данные свидетельствуют о ключевом значении аминокислотных остатков тирозина в составе Rpt-субъединиц, которые формируют спиральную опоясывающую структуру вокруг транслоцируемой полипептидной цепи субстрата [10]. Каскадный гидролиз молекул АТФ в Rpt-субъединицах приводит к их кооперативному смещению вниз, которое, в свою очередь, поступательно проталкивает полипептидную цепь субстрата в протеолитическую субчастицу.

Цель настоящей работы – методом криоэлектронной микроскопии впервые получить структуру 26S иммунопротеасомы человека с разрешением 3.6 Å и осуществить сравнительный анализ данной структуры с 26S протеасомой конститутивного фенотипа в том же разрешении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и обработка данных криоэлектронной микроскопии препаратов 26S конститутивной протеасомы и 26S иммунопротеасомы. В результате распознавания частиц из экспериментальных данных криоэлектронной микроскопии был получен массив из 239 705 и 146 134 проекций для конститутивной и им-

мунной форм 26S протеасомных субчастиц соответственно. Полученные проекции импортировали в cryoSPARC (версия 4.2.1) [18] для дальнейшей обработки и анализа. С помощью нескольких последовательных раундов двумерной классификации (2D classification) были исключены ложноположительные проекции, а также загрязнения образца различного рода, попавшие в выборку.

Финальный результат классификации, вместе с характерными исходными усредненными изображениями, приведен на рис. 1. Поскольку данные представляют собой смесь из 20S, 26S и 30S протеасомных субчастиц, с помощью процедуры *ab-initio* реконструкции (Ab-Initio Reconstruction) было получено предварительное разбиение выборок на три структурные группы и соответствующие начальные модели низкого разрешения (12 Å). Далее с помощью процедуры гетерогенного уточнения (Heterogeneous Refinement), используя только коровую 20S часть в качестве начальной модели, выборки были классифицированы с большей точностью, при этом выравнивание карт трех различных структурных модификаций протеасомы было выполнено по общей центральной 20S субчастице (рис. 2). Сходимость неоднородного уточнения (Non-uniform Refinement) [19] карт для 26S субчастиц вместе с локальной коррекцией дефокусировки для каждой проекции (Local CTF Refinement) и уточнением аббераций более высоких порядков (Global CTF Refinement) не было ограничено пространственной частотой Найквиста при данном физическом размере пикселя (разрешение

ограничено 3.6 Å) и достигло 3.9 Å в области 20S, оцененное в соответствии со стандартным пороговым критерием FSC = 0.143 (здесь и далее) для функции корреляции (Fourier Shell Correlation, FSC) между двумя картами (half-maps), независимо реконструированными в соответствии со случайным разбиением исходного массива на две равные подвыборки проекций [20, 21]. Далее 81 714 и 45 782 проекций 26S субъединицы конститутивной и иммунной протеасомы соответственно вместе с необходимыми метаданными (координаты проекций и относительные сдвиги изображений в стеке, найденные в процессе предобработки) экспортировали в RELION (версия 4.0.1) для оценки траекторий движения частиц, вызванного взаимодействием пучка электронов с образцом, с помощью метода на основе регрессии гауссовского процесса (Bayesian polishing) [22], который позволяет с большей точностью корректировать локальные смещения частиц, возникающие в процессе детектирования изображения.

Данный подход позволил получить карты с разрешением 3.7 Å в случае глобального уточнения (выравнивание по коровой 20S субчастице) и 4.5 Å в случае локального уточнения (Local refinement) для подвижной 19S регуляторной субчастицы с вычитанием сигнала 20S субчастицы. Для локального уточнения коровой 20S субчастицы уточнение достигло максимального разрешения 3.6 Å для данного физического размера пикселя. Для описания непрерывной конформационной динамики 19S в составе 26S протеасомы был применен новый метод уточнения (3D Flexible

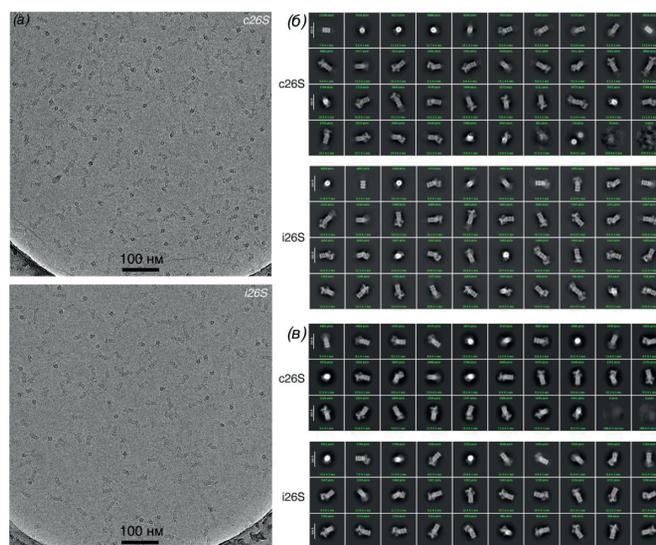


Рис. 1. (а) – Характерное исходное крио-ЭМ-изображение протеасомных субчастиц конститутивной (с26S) и иммунной (i26S) формы; (б) – результат двумерной классификации исходного набора проекций; (в) – подвыборки проекций 26S протеасомных субчастиц.

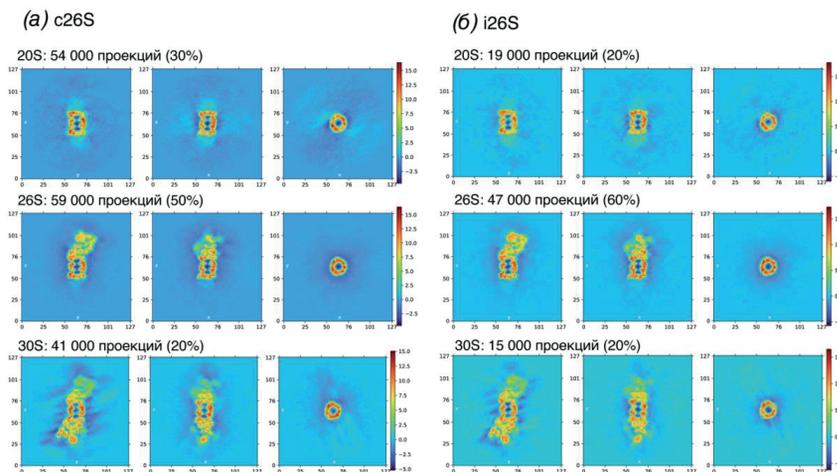


Рис. 2. Результат гетерогенного уточнения (Heterogeneous Refinement) в случае конститутивной c26S (а) и иммунной i26S (б) форм протеасомы. Показаны ортогональные срезы крио-ЭМ-карт вдоль трех осей для трех структурных организаций протеасомных субчастиц. Указаны абсолютные количества соответствующих проекций в выборке данных после двумерной классификации.

Refinement) [23], позволяющий с помощью генеративного моделирования параметризовать подвижность на уровне вторичной структуры в виде скрытых переменных. Результаты глобального уточнения использовали в качестве усредненной по всем конформациям консенсус-карты и подавали на вход процедуры, пространство скрытых переменных было ограничено двумя измерениями, все прочие параметры были выбраны по умолчанию.

Разрешение полученных карт составило 3.6 Å (для наиболее стабильных областей), разрешение в области 19S значительно улучшено относительно глобального уточнения. Корреляционные кривые FSC для четырех полученных крио-ЭМ-изображений в каждом из двух экспериментов показаны на рис. 3. Для всех карт выпол-

нена оценка локального разрешения (рис. 4) с помощью реализованной в cryoSPARC стандартной процедуры, аналогичной алгоритму Blocres [24], локальная фильтрация, а также проведена постобработка с помощью алгоритма DeepEMhancer [25], что позволило качественно повысить интерпретируемость карт в областях высокой подвижности. Карты электронных плотностей депонированы в базу данных EMDB (Electron Microscopy Data Bank) под референсными номерами EMD-19571 и EMD-19572.

Анализ особенностей структурной организации 26S иммунопротеасомы человека. В настоящей работе нами были получены структуры 26S протеасомы человека в конститутивной и иммунной формах с разрешением 3.6 Å. Сравнительный анализ общей структуры двух комп-

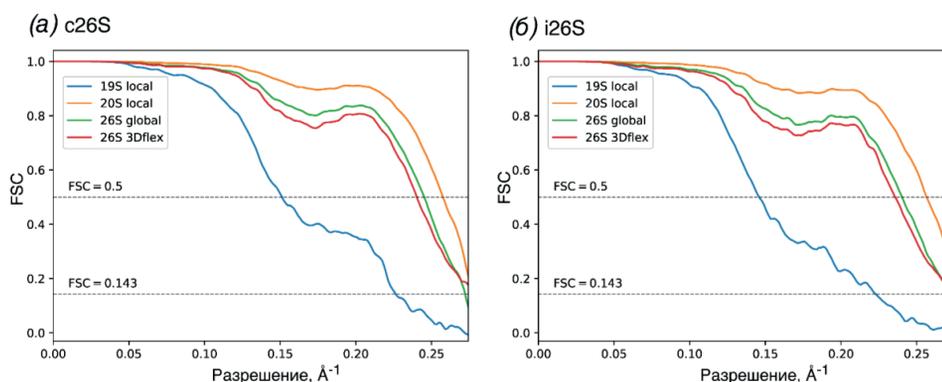


Рис. 3. Корреляционные кривые (Fourier Shell Correlation, FSC) в случае конститутивной c26S (а) и иммунной i26S (б) форм протеасомной субчастицы. Показаны кривые для локального уточнения 19S субчастицы (19S local, синий), локального уточнения коровки 20S субчастицы (20S local, оранжевый), глобального уточнения 26S субчастицы с выравниванием относительно 20S (26S global, зеленый) и уточнения с помощью метода 3D Flexible Refinement (26S 3Dflex, красный). Пунктирными линиями показаны два стандартных пороговых значения корреляций 0.5 и 0.143.

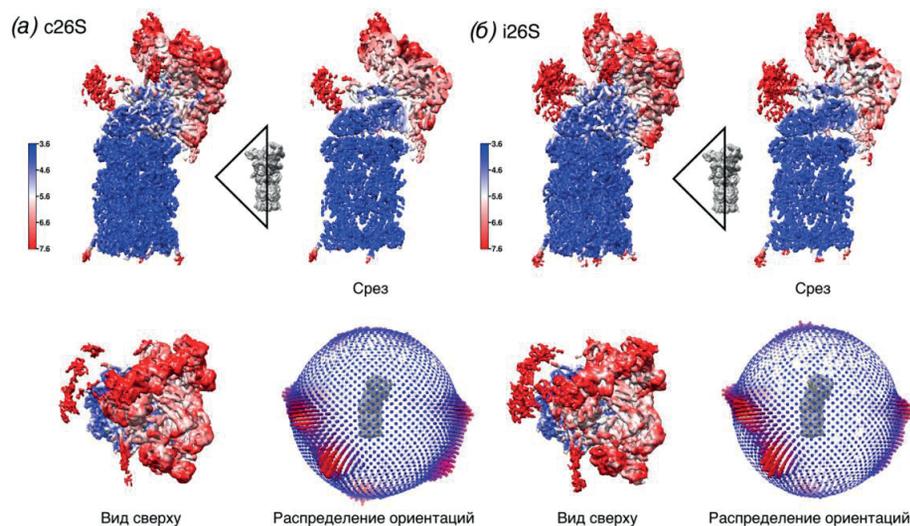


Рис. 4. Результат анализа локального разрешения в случае конститутивной c26S (а) и иммунной i26S (б) форм протеасомной субчастицы, а также распределение проекций 26S в соответствии с найденными угловыми ориентациями. Для визуализации локального разрешения использованы крио-ЭМ-карты, полученные с помощью 3D Flexible Refinement и дополнительно обработанные с помощью DeepEMhancer. Показаны боковой вид, центральный срез и вид сверху.

лексов не выявил значимых различий с референсной структурой 26S протеасомы человека [26] (рис. 5). Анализ электронной плотности в субстрат-связывающих карманах гексамерного АТФазного кольца подтвердил наличие всех шести молекул АТФ в связанном состоянии в обоих комплексах (рис. 6а), а также закоривание НbУХ-мотивов субъединиц Rpt3 и Rpt6 в гидрофобные полости гептамерного α -кольца (рис. 6б). В иммунопротеасоме конститутивные каталитические субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ под действием $\text{IFN}\gamma$ заменяются на $\beta 1i$, $\beta 2i$ и $\beta 5i$. Мы подтвердили наличие иммуносубъединиц в протеасоме, выделенной из клеток HeLa, предварительно обработанных $\text{IFN}\gamma$,

на основании изменения электронной плотности (рис. 6в) в положениях характеристических аминокислотных остатков протеасомы иммунного фенотипа [27].

Сравнительный анализ проксимального (непосредственно взаимодействующего с 19S регуляторной субчастицей) и аксиального (удаленного) гептамерного α -кольца выявил кооперативный сдвиг *N*-концевых областей α -субъединиц в структуре иммунопротеасомы в сравнении с протеасомой конститутивного фенотипа (рис. 7). *N*-Концевые фрагменты субъединиц PSMA1, PSMA4 и PSMA6 поступательно сместились в направлении субъединицы PSMA2. Визуализация электронной

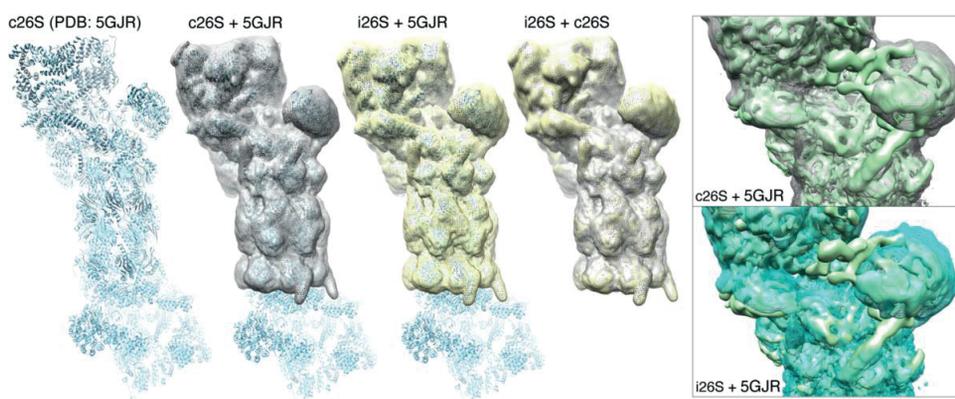


Рис. 5. Сравнительный анализ глобальной структуры 26S протеасомы человека в конститутивной (c26S) и иммунной (i26S) формах. Структура 26S протеасомы человека PDB 5GJR дана в качестве референса.

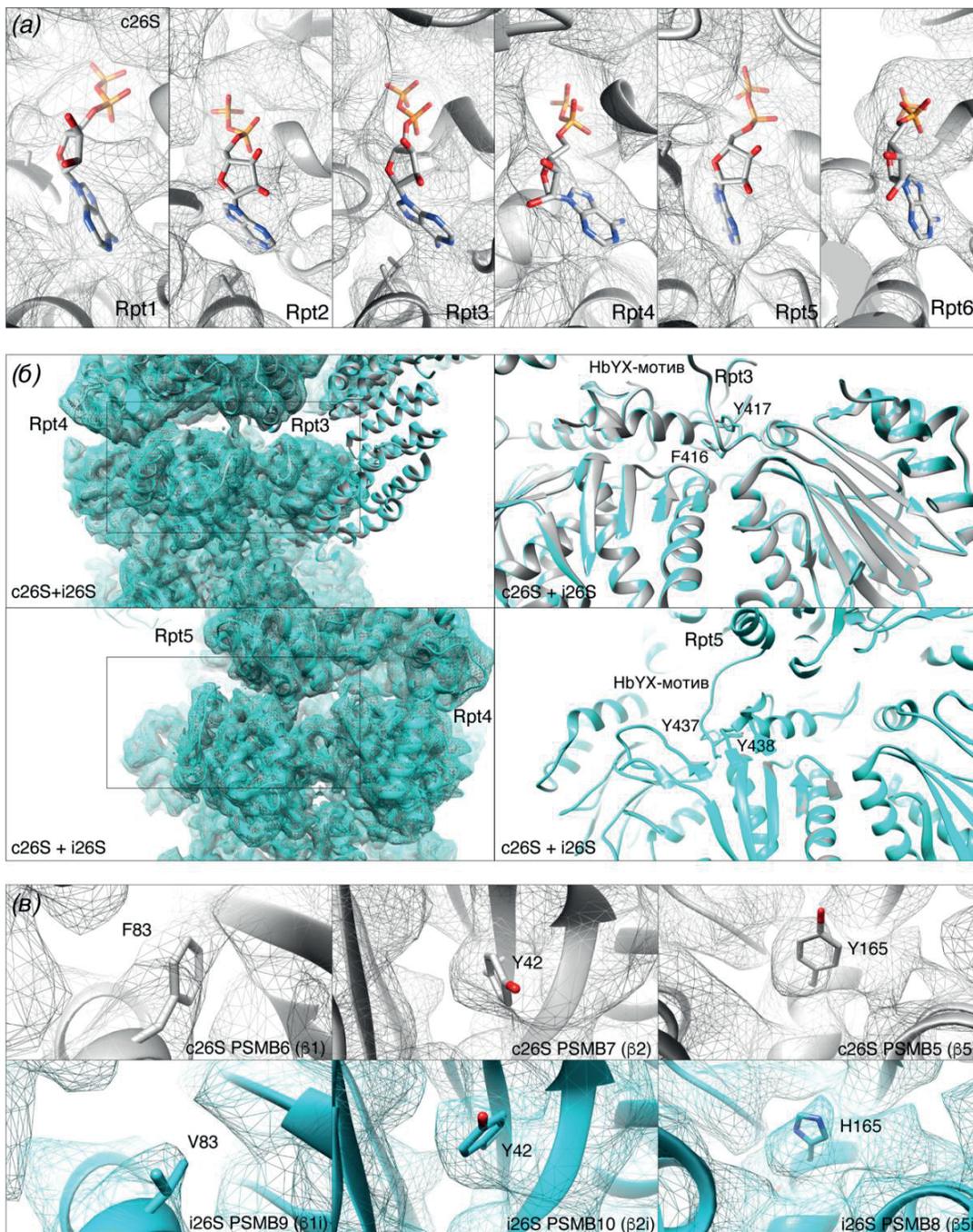


Рис. 6. (а) – Анализ электронной плотности в субстрат-связывающих карманах гексамерного АТФазного кольца; (б) – закрепление HbYX-мотивов субъединиц Rpt3 и Rpt6 в гидрофобные полости гептамерного α -кольца; (в) – присутствие иммуносубъединиц в протеасоме, изолированной из клеток HeLa, предварительно обработанных IFN γ , на основании изменения электронной плотности в положениях характеристических аминокислотных остатков протеасомы иммунного фенотипа.

плотности проксимального α -кольца в области входа во внутреннюю камеру каталитической 20S субчастицы выявила снижение стерической затрудненности в центральном канале иммунопротеасомы в сравнении с конститутивной

формой (рис. 8а). Подобный эффект вызван разобщением системы ионных связей, наблюдаемой в случае конститутивной протеасомы, между аминокислотными остатками Arg5 субъединицы PSMA7 и аспаратом субъединицы

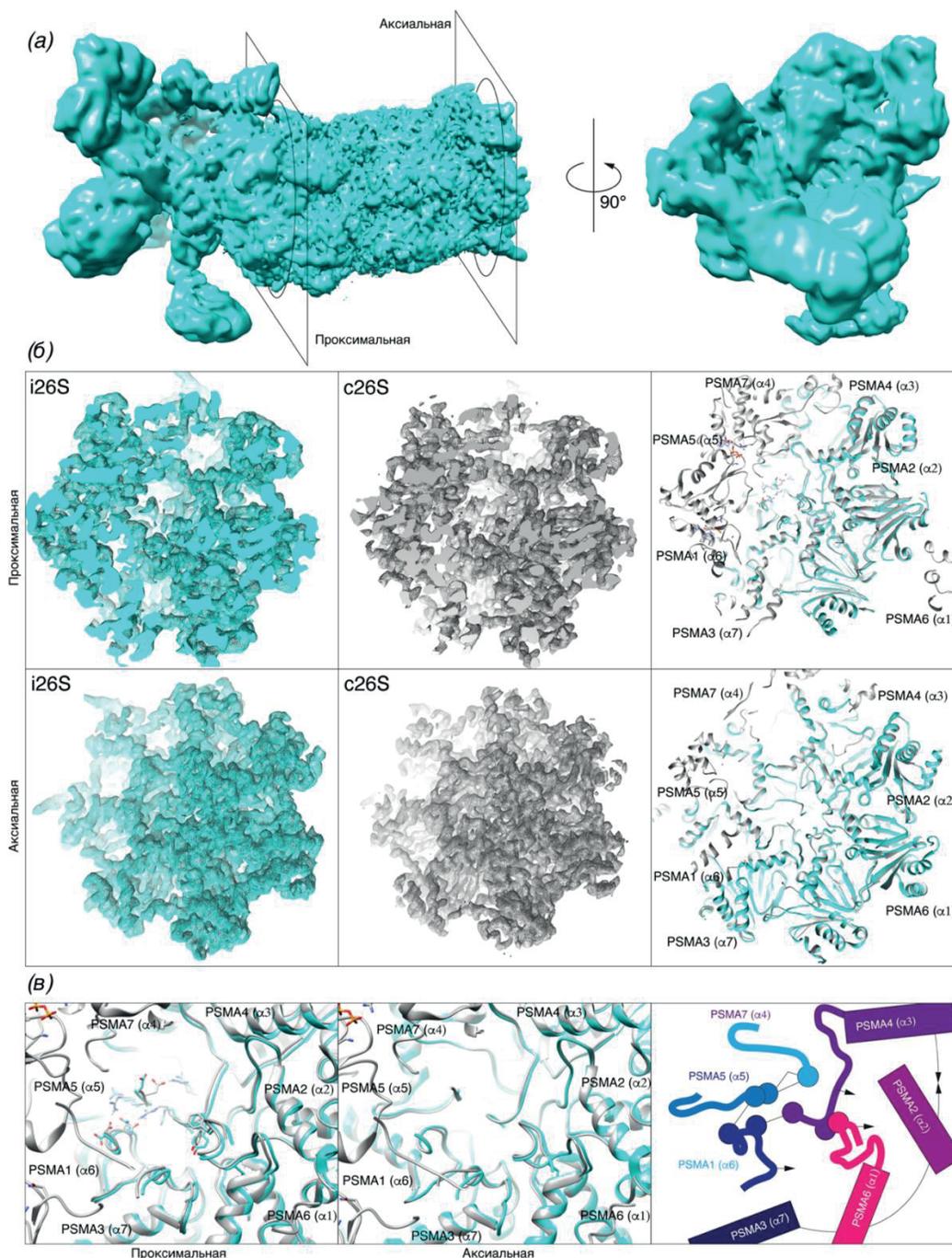


Рис. 7. Сравнительный анализ проксимального (непосредственно взаимодействующего с 19S регуляторной субчастицей) и аксиального (удаленного) гептамерного α -кольца N -концевых областей α -субъединиц в структуре иммунопротеасомы в сравнении с протеасомой конститутивного фенотипа (*б*); (*в*) – кооперативный сдвиг N -концевых фрагментов субъединиц PSMA1, PSMA4 и PSMA6 в направлении субъединицы PSMA2.

PSMA5 в положении 9, Arg10 субъединицы PSMA5 и Asp7 субъединицы PSMA1, а также аспарагина субъединицы PSMA1 в положении 8 и Arg3 субъединицы PSMA4 в структуре иммунопротеасомы (рис. 8*б*). При этом наблюдаемый сдвиг N -концевых последова-

тельств субъединиц PSMA способствует образованию π - π -укладки между остатками Trp5 и Phe9 субъединиц PSMA4 и PSMA6 соответственно, что, в свою очередь, фиксирует их N -концевые фрагменты в удалении от центрального канала (рис. 8*в*).

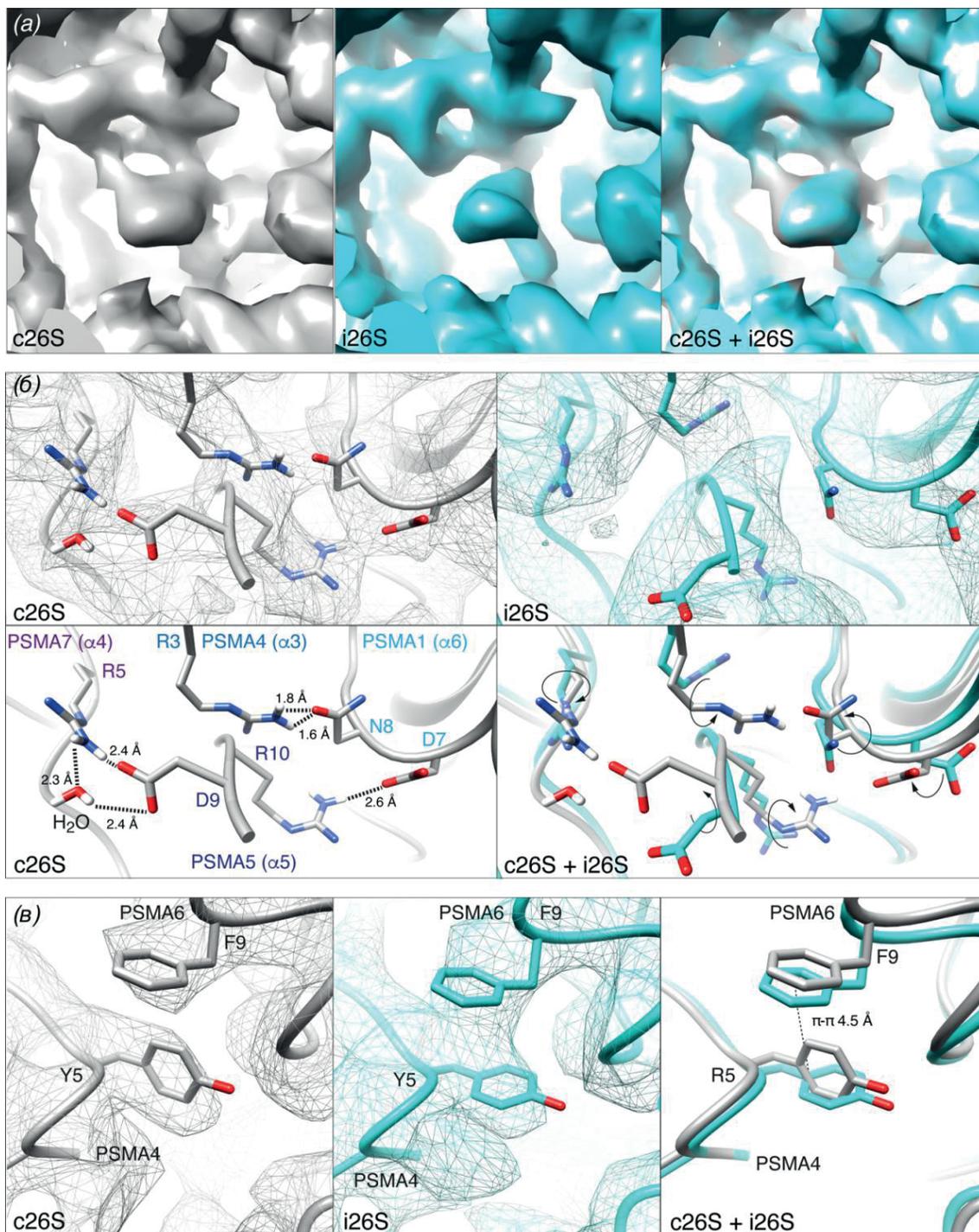


Рис. 8. (а) – Визуализация электронной плотности проксимального α -кольца в области входа во внутреннюю камеру каталитической 20S субчастицы; (б) – разобщение системы ионных связей, наблюдаемой в случае конститутивной протеасомы, между аминокислотными остатками Arg5 PSMA7 и Asp9 PSMA5, Arg10 PSMA5 и Asp7 PSMA1, а также Asn8 PSMA1 и Arg3 PSMA4 в структуре иммунопротеасомы; (в) – образование π - π -укладки между остатками Tyr5 и Phe9 субъединиц PSMA4 и PSMA6.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение и очистка препаратов протеасомы с различным каталитическим фенотипом.

Клетки HeLa (аденокарцинома шейки матки человека) были получены из исследовательского центра “Коллекция культур клеток позвоночных” Института цитологии РАН. Клеточные линии млекопитающих культивировали в среде DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). В среду добавляли 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) и 1% антибиотика-антимикотика (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). Клеточные линии культивировали в инкубаторе с постоянным увлажнением при 37°C и 5% CO₂. Все клеточные культуры рутинно тестировали на наличие микоплазмы при помощи набора MycoReport (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Получение стабильных клеточных линий HeLa, сверхэкспрессирующих субъединицу протеасомы человека PSMD14 с тегом НТВН, а также выделение препаратов протеасомы проводили согласно ранее опубликованной методике [28]. Для индукции экспрессии иммуносубъединиц клетки HeLa перед выделением протеасомы обрабатывали IFN γ (Фармаклон, Россия) в дозировке 400 U/мл и инкубировали в течение 96 ч.

Подготовка образцов для крио-ЭМ. Для подготовки образцов для крио-ЭМ использовали медные сетки Quantifoil R1.2/1.3 400 mesh (Lot #211014, Quantifoil Micro Tools GmbH, Германия), имеющие основную углеродную подложку толщиной 10–12 нм с массивом регулярных отверстий диаметром 1.2 мкм и периодом 2.5 мкм, а также тонкую (толщина < 1 нм) подложку из оксида графена, нанесенную сверху. Перед использованием сетки хранили в вакуумном эксикаторе при комнатной температуре и давлении 0.9 МПа, что обеспечивает достаточную гидрофильность поверхности подложки. Чтобы сохранить целостность подложки и исключить дополнительное влияние на ориентацию частиц при взаимодействии с поверхностью подложки, сетки не были предварительно обработаны в тлеющем разряде. Подготовленные препараты 26S протеасомных субчастиц с концентрацией 0.9 мг/мл и объемом 3 мкл в буфере 30 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ, 1 мМ ТСЕР наносили на сетки в камере установки для витрификации Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США) при следующих параметрах: степень сжатия при промакивании (blot force) – 0 усл. ед., время промакивания (blot time) – 3 с,

температура в камере – 4°C, относительная влажность в камере – 100%. После удаления излишков сетки с тонким слоем препарата быстро погружали в жидкий этан, за счет чего обеспечивали условия витрификации (образование слоя аморфного льда с препаратом).

Криоэлектронная микроскопия препаратов 26S конститутивной и 26S иммунопротеасомы.

Подготовленные сетки препаратов протеасомы и иммунопротеасомы были перенесены в жидком азоте в криоэлектронный просвечивающий микроскоп Titan Krios 60-300 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенный источником полевой эмиссии электронов типа Шоттки (FEI XFEG, Нидерланды), корректором сферических aberrаций (CEOS GmbH, Германия) и КМОП (CMOS) устройством прямого детектирования электронов Falcon II (Thermo Fisher Scientific, США). В автоматическом режиме с помощью программного обеспечения EPU (версия 1.9.1.16REL; Thermo Fisher Scientific, США) получено 1106 и 1130 наборов изображений для конститутивной и иммунной формы 26S протеасомных субчастиц соответственно, детектируемых в течение времени экспозиции 3 с. Микроскоп работал при ускоряющем напряжении 300 кВ, номинальном увеличении 37 000 \times и соответствующем калиброванном размере пикселя 1.8 Å на уровне образца, объективной линзой в режиме дефокусировки с номинальными значениями в интервале от –0.8 до –2.5 мкм с шагом 0.2 мкм и величиной суммарной дозы 60 e⁻/Å², равномерно распределенной по стеку изображений из 20 кадров. Основные параметры эксперимента сведены в табл. 1.

Исходные данные криоэлектронной микроскопии в данном случае представляли собой стек (набор) из 20 изображений-кадров, полученных за время экспонирования одной области образца и объединенных в единый MRC-файл [29]. Предобработку данных выполняли с помощью программного обеспечения Warp (версия 1.0.9) [30]. Стек изображений был условно разбит на 5 \times 5 локальных областей, для каждой из которых оценивали локальное значение дрейфа образца и дефокусировки, таким образом достигалось более точное моделирование функции передачи контраста. Поиск координат проекций частиц на скорректированных изображениях производили с помощью предобученной сверточной нейронной сети VoxNet2Mask_20180918. Для более точного распознавания частиц было проведено три раунда переобучения с помощью случайных выборок из 10 изображений с различной дефокусировкой.

Таблица 1. Параметры подготовки образцов, обработки данных и разрешения криоэлектронных структур конститутивной и иммунной 26S протеасомы человека

Подготовка образцов				
Сетки (производитель, тип основания, диаметр отверстий в мкм/расстояние между отверстиями в мкм основной подложки, тип верхнего слоя)		Quantifoil, 400 mesh (Cu), R1.2/1.3, Graphene oxide		
Концентрация, мг/мл		0.9		
Установка для витрификации		Vitrobot Mark IV		
Параметры витрификации (blot time, blot force, температура, влажность)		0 усл. ед., 3 с, 4°C, 100%		
Сбор данных				
ПЭМ		Titan Krios		
Детектор		Falcon II		
Ускоряющее напряжение, кВ		300		
Номинальное увеличение		37 000×		
Размер пикселя, Å		1.8		
Номинальный интервал дефокусировки, мкм		от -0.8 до -2.5		
Суммарная доза за время экспозиции, e ⁻ /Å ²		60		
Время экспозиции, с		5		
Размер стека изображений		20		
Доза на одно изображение в стеке, e ⁻ /Å ²		3		
Диаметр объективной апертуры, мкм		100		
Обработка данных	Конститутивная (c26S)		Иммунная (i26S)	
Исходное количество стеков изображений	1106		1130	
Размер бокса, пкс	400		400	
Исходное количество проекций	239 705		146 134	
Количество проекций 26S субчастиц	81 714		45 782	
Код депонирования в EMDB	EMD-19571		EMD-19572	
Разрешение (c26S)	19S (local)	20S (local)	26S (global)	26S (3D flex)
Итоговое разрешение (FSC _{0.5}), Å	6.64	3.88	4.08	4.17
Итоговое разрешение (FSC _{0.143}), Å	4.43	3.6*	3.68	3.6*
Разрешение (i26S)	19S (local)	20S (local)	26S (global)	26S (3D flex)
Итоговое разрешение (FSC _{0.5}), Å	6.89	3.90	4.17	4.25
Итоговое разрешение (FSC _{0.143}), Å	4.51	3.6*	3.68	3.6*

* Уточнение крио-ЭМ-карт достигло предельно возможного разрешения при данном физическом размере пикселя исходного изображения с учетом выбранного порогового значения FSC (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые была определена структура 26S иммунопротеасомы человека с использованием криоэлектронной микроскопии с разрешением 3.6 Å с последующим проведением сравнительного анализа данной структуры с 26S протеасомой конститутивного фенотипа при том же разрешении. Транслокация субстрата в каталитическую полость – одна из ключевых и времязатратных стадий гидролиза белков 26S протеасомой. Так, известно, что мутантные варианты протеасомы с делетированным *N*-концевым участком субъединицы $\alpha 3$ проявляют повышенную активность по гидролизу как низкомолекулярных субстратов *in vitro*, так и белков непосредственно в клетках [31]. В научной литературе имеется ряд свидетельств, что 26S иммунопротеасома гидролизует клеточные субстраты быстрее [32]. Данное наблюдение было подтверждено в отношении основных белков [33, 34] и потенциально связано с захватом положительно заряженных субстратов иммунопротеасомами с регуляторными субчастицами PA28 [35, 36]. Также известно об альтернативной укладке каталитических иммуносубъединиц в β -гептамерном кольце и структурно различном механизме активации 20S конститутивной и иммунной протеасомы комплексами типа PA28 [27]. Суммируя данные наблюдения с нашими результатами, можно предположить, что аллостерический эффект каталитических иммуносубъединиц, находящихся непосредственно под внешним α -кольцом, приводит к большему разведению *N*-концевых фрагментов α -субъединиц при присоединении регуляторной 19S субчастицы и, в свою очередь, возникновения у 26S иммунопротеасомы “преактивационного” фенотипа.

БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальная часть работы была выполнена на оборудовании Ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии (Курчатовский комплекс НБИКС-технологий, НИЦ “Курчатовский институт”).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено в рамках гранта Российского научного фонда № 23-74-00053 “Молекулярные механизмы действия модуляторов активности протеасомы химической и белковой природы”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ciechanover A.* // Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2017. V. 30. P. 341–355.
<https://doi.org/10.1016/j.beha.2017.09.001>
2. *Kudriaeva A.A., Livneh I., Baranov M.S., Zigan-shin R.H., Tupikin A.E., Zaitseva S.O., Kabilov M.R., Ciechanover A., Belogurov A.A., Jr.* // Cell Chem. Biol. 2021. V. 28. P. 1192–1205.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.02.009>
3. *Chau V., Tobias J.W., Bachmair A., Marriott D., Ecker D.J., Gonda D.K., Varshavsky A.A.* // Science. 1989. V. 243. P. 1576–1583.
<https://doi.org/10.1126/science.2538923>
4. *Ciechanover A., Heller H., Katz-Etzion R., Hershko A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 761–765.
<https://doi.org/10.1073/pnas.78.2.761>
5. *Arrigo A.P., Tanaka K., Goldberg A., Welch W.* // Nature. 1988. V. 331. P. 192–194.
<https://doi.org/10.1038/331192a0>
6. *Lander G.C., Estrin E., Matyskiela M.E., Bashore C., Nogales E., Martin A.* // Nature. 2012. V. 482. P. 186–191.
<https://doi.org/10.1038/nature10774>
7. *Deveraux Q., Ustrell V., Pickart C., Rechsteiner M.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 7059–7061.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37244-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37244-7)
8. *Smith D.M., Kafri G., Cheng Y., Ng D., Walz T., Goldberg A.L.* // Mol. Cell. 2005. V. 20. P. 687–698.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.019>
9. *Verma R., Aravind L., Oania R., McDonald W.H., Yates J.R., 3rd, Koonin E.V., Deshaies R.J.* // Science. 2002. V. 298. P. 611–615.
<https://doi.org/10.1126/science.1075898>
10. *de la Peña A.H., Goodall E.A., Gates S.N., Lander G.C., Martin A.* // Science. 2018. V. 362. P. eaav0725.
<https://doi.org/10.1126/science.aav0725>
11. *Kudriaeva A.A., Belogurov A.A.* // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. P. S159–S192.
<https://doi.org/10.1134/S0006297919140104>
12. *Chapiro J., Claverol S., Piette F., Ma W., Stroobant V., Guillaume B., Gairin J.E., Morel S., Bulet-Schiltz O., Monsarrat B., Boon T., Van den Eynde B.J.* // J. Immunol. 2006. V. 176. P. 1053–1061.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.2.1053>
13. *Chen W., Norbury C.C., Cho Y., Yewdell J.W., Benink J.R.* // J. Exp. Med. 2001. V. 193. P. 1319–1326.
<https://doi.org/10.1084/jem.193.11.1319>
14. *Sijts E.J., Kloetzel P.M.* // Cell. Mol. Life Sci. 2011. V. 68. P. 1491–1502.
<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0657-y>

15. Husnjak K., Elsasser S., Zhang N., Chen X., Randles L., Shi Y., Hofmann K., Walters K.J., Finley D., Dikic I. // *Nature*. 2008. V. 453. P. 481–488. <https://doi.org/10.1038/nature06926>
16. Shi Y., Chen X., Elsasser S., Stocks B.B., Tian G., Lee B.H., Shi Y., Zhang N., de Poot S.A., Tuebing F., Sun S., Vannoy J., Tarasov S.G., Engen J.R., Finley D., Walters K.J. // *Science*. 2016. V. 351. P. aad9421. <https://doi.org/10.1126/science.aad9421>
17. Matyskiela M.E., Lander G.C., Martin A. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. P. 781–788. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2616>
18. Punjani A., Rubinstein J.L., Fleet D.J., Brubaker M.A. // *Nat. Methods*. 2017. V. 14. P. 290–296. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4169>
19. Punjani A., Zhang H., Fleet D.J. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. P. 1214–1221. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00990-8>
20. van Heel M., Schatz M. // *J. Struct. Biol.* 2005. V. 151. P. 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.05.009>
21. Rosenthal P.B., Henderson R. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 333. P. 721–745. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.07.013>
22. Zivanov J., Nakane T., Scheres S.H.W. // *IUCrJ*. 2019. V. 6. P. 5–17. <https://doi.org/10.1107/S205225251801463X>
23. Punjani A., Fleet D.J. // *Nat. Methods*. 2023. V. 20. P. 860–870. <https://doi.org/10.1038/s41592-023-01853-8>
24. Cardone G., Heymann J.B., Steven A.C. // *J. Struct. Biol.* 2013. V. 184. P. 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.08.002>
25. Forsberg B.O., Shah P.N.M., Burt A. // *Nat. Commun.* 2023. V. 14. P. 5802. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41478-1>
26. Huang X., Luan B., Wu J., Shi Y. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. V. 23. P. 778–785. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3273>
27. Chen J., Wang Y., Xu C., Chen K., Zhao Q., Wang S., Yin Y., Peng C., Ding Z., Cong Y. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 739. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21028-3>
28. Saratov G.A., Vladimirov V.I., Novoselov A.L., Ziganshin R.H., Chen G., Baymukhametov T.N., Konevega A.L., Belogurov A.A., Jr., Kudriaeva A.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 2091. <https://doi.org/10.3390/ijms24032091>
29. Cheng A., Henderson R., Mastronarde D., Ludtke S.J., Schoenmakers R.H., Short J., Marabini R., Dallakyan S., Agard D., Winn M. // *J. Struct. Biol.* 2015. V. 192. P. 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.04.002>
30. Tegunov D., Cramer P. // *Nat. Methods*. 2019. V. 16. P. 1146–1152. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0580-y>
31. Choi W.H., de Poot S.A., Lee J.H., Kim J.H., Han D.H., Kim Y.K., Finley D., Lee M.J. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 10963. <https://doi.org/10.1038/ncomms10963>
32. Seifert U., Bialy L.P., Ebstein F., Bech-Otschir D., Voigt A., Schröter F., Prozorovski T., Lange N., Steffen J., Rieger M., Kuckelkorn U., Aktas O., Kloetzel P.M., Krüger E. // *Cell*. 2010. V. 142. P. 613–624. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.036>
33. Raule M., Cerruti F., Cascio P. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1843. P. 1942–1947. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.005>
34. Kuzina E.S., Chernolovskaya E.L., Kudriaeva A.A., Zenkova M.A., Knorre V.D., Surina E.A., Ponomarenko N.A., Bobik T.V., Smirnov I.V., Bacheva A.V., Belogurov A.A., Gabibov A.G., Vlasov V.V. // *Dokl. Bio. Bioph.* 2013. V. 453. P. 300–303. <https://doi.org/10.1134/S1607672913060070>
35. Kudriaeva A., Kuzina E.S., Zubenko O., Smirnov I.V., Belogurov A., Jr. // *FASEB J.* 2019. V. 33. P. 6852–6866. <https://doi.org/10.1096/fj.201802237R>
36. 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. // *FASEB J.* 2015. V. 29. P. 1901–1913. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259333>

The 3.6 Å Cryo-EM Structure of the Outer Heptameric α -Ring of Human 26S Immunoproteasome in the Preactivation State

G. A. Saratov*, T. N. Baymukhametov**, A. L. Konevega**, ***, ****, A. A. Kudriaeva*, and A. A. Belogurov, Jr.*, ***, ***, #

Phone: +7 (495) 335-22-88; e-mail: belogurov@ibch.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** National Research Center, “Kurchatov Institute”, pl. Academica Kurchatova 1, Moscow, 123182 Russia

*** Petersburg Nuclear Physics Institute Named by B.P. Konstantinov of National Research Centre,
Kurchatov Institute,

mc: Orlova Roshcha 1, Gatchina, 188300 Russia

**** Institute of Biomedical Systems and Biotechnologies, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,
ul. Politekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

***** Department of Biological Chemistry, Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,
ul. Delegatskaya 20/1, Moscow, 127473 Russia

The 26S proteasome is a unique multicatalytic proteinase complex, together with a ubiquitination system, providing controlled degradation of most intracellular eukaryotic proteins. The problem of studying the proteasome is the multiplicity of its intracellular forms, which are formed due to the modularity of the proteasome assembly process. In this study, using cryoelectron microscopy, we described for the first time the structure of the 26S human immunoproteasome in comparison with its constitutive form with a resolution of 3.6 Å. A detailed analysis of the structural features of the two complexes revealed the opening of the entrance in the outer heptameric 20S ring of the immunoproteasome subunit due to the separation of the *N*-terminal regions of the PSMA4 and PSMA5 subunits and the formation of a π – π stacking between the amino acid residues Tyr5 and Phe9 of the PSMA5 and PSMA6 subunits, respectively. The revealed removal of steric obstruction in the central channel of the 20S subunit may indicate the preactivation phenotype of the 26S human immunoproteasome, even in the absence of a bound substrate.

Keywords: proteasome, immunoproteasome, cryoelectron microscopy