



УДК 577.122.2

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА. ПРОТЕОМНЫЙ ПОДХОД

© 2011 г. А. В. Бачева<sup>\*\*</sup>, А. А. Белогуров<sup>\*\*</sup>, Е. С. Кузина<sup>\*</sup>, М. В. Серебрякова<sup>\*\*\*</sup>,  
Н. А. Пономаренко<sup>\*\*</sup>, В. Д. Кнорре<sup>\*\*</sup>, В. М. Говорун<sup>\*\*\*</sup>, А. Г. Габиров<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Воробьевы горы, д. 1, стр. 3;

<sup>\*\*</sup> Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

<sup>\*\*\*</sup> Протеомный центр РАМН, НИИ Физико-химической медицины Росздрава РФ

Поступила в редакцию 05.08.2010 г. Принята к печати 09.08.2010 г.

Протеолитическая деградация аутоантигенов имеет важнейшее значение в современной биохимии и иммунологии. Наиболее принципиальным вопросом является функциональная роль образовавшихся пептидов при изменении специфичности расщепления в процессе перехода от нормы к патологии. Идентификация конкретных пептидных фрагментов является в ряде случаев диагностическим и прогностическим критерием развития патологии. Предметом настоящей работы является сравнительное исследование особенностей деградации одного из главных нейроантигенов, основного белка миелина, протеиназами, активируемыми при развитии патологического демиелинизирующего процесса, и протеасомой, выделенной из различных источников. Проведенное сравнение специфичности перечисленных биокатализаторов дает в ряде случаев основание судить о резком изменении набора пептидных фрагментов основного белка миелина, способных презентироваться на главном комплексе гистосовместимости первого класса при нейродегенерации, что, по всей видимости, способствует развитию аутоиммунной патологии.

*Ключевые слова:* основной белок миелина; протеиназы, ассоциированные с рассеянным склерозом; протеасома, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ); масс-спектрометрия.

### ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) — это комплексное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы человека, характеризующееся множественными повреждениями белого вещества головного мозга. Хотя этиология РС до конца не изучена, считается, что протеолиз как напрямую, так и опосредованно, играет значительную роль в разрушении миелиновой оболочки аксонов нейронов и в продукции энцефалитогенных пептидов. Повышенный уровень протеолитической активности различных пептидаз был обнаружен в тканях головного мозга и спинномозговой жидкости пациентов, страдающих РС. Поэтому наиболее вероятным механизмом, отвечающим за генерацию аутоантигенов и презентацию их иммунным клеткам, является протеолиз.

Как было показано еще в 1968 г., опосредованная клетками демиелинизация при ЕАЕ включает в себя внутриклеточное расщепление белковых антигенов (основного белка миелина — ОБМ, протеолипидно-

го протеина — ПЛП, миелин-олигодендроглицинопротеина — МОГ) в антигенпрезентирующих клетках (АПК) до меньших по размеру пептидов для их презентации Т-лимфоцитам [1, 2]. Известно, что макрофаги/лимфоциты, а также нейтрофилы экспрессируют кислые катепсины В и D, нейтральный кальпаин, металлопротеиназы матрикса MMP3 и MMP9, способные деградировать компоненты миелина на фрагменты, которые могут быть иммуногенными [3]. При этом макрофаги начинают синтезировать протеиназы только после стимуляции цитокинами, в то время как терминально дифференцированные нейтрофилы уже содержат заранее сформированные гранулы с такими ферментами. Следовательно, протеиназы нейтрофилов могут отвечать за острую начальную стадию заболевания, а протеиназы макрофагов — за хронический нейродегенеративный процесс.

Среди главных аутоантигенов при РС выделяют несколько белков миелиновой оболочки, в том числе ОБМ. Известно, что ген ОБМ человека расположен на 18-й хромосоме и имеет 3 промоторные области. В процессе созревания мРНК этого белка синтезируется несколько альтернативных форм, различающихся числом экзонов и, следовательно, размером белка. Молекулярные массы получаю-

Сокращения: АПК — антигенпрезентирующие клетки; ОБМ — основной белок миелина; РС — рассеянный склероз, ЕАЕ — экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит; МНС — главный комплекс гистосовместимости.

# Автор для связи (тел.: (495) 939-55-29; эл. почта: apbach@genebee.msu.ru).

1 AAQKRPSQRS KYLASASTMD HARHGFLPRH RDTGILDSLGRFFGSDRGAP  
 51 KRGSKGKDGHN AARTTHYGSL PQKAQGHPRQ DENPVVHFFK NIVTPRTPPP  
 101 SQGKGRGLSL SRFSWGAEGQ KPGFGYGGRA SDYKSAHKGL KGHDAQGTLS  
 151 KIFKLGGRDS RSGSPMARR

Рис. 1. Аминокислотная последовательность ОБМ.

щихся протеинов для разных животных лежат в диапазоне от 14.0 до 21.5 кДа. У человека присутствуют три сплайс-формы белка: с молекулярной массой 21.5 кДа (составлена из семи экзонов), с *M* 18.5 кДа (из пяти экзонов) и 17.5 кДа (из двух экзонов). Для крыс также показано наличие нескольких изоформ данного белка с *M* 21.5, 18.5, 17.0 и 14.0 кДа. Интересно, что сплайс-формы ОБМ крысы с *M* 21.5 и 18.5 кДа кодируются экзонами, высокоомологичными человеческим, за небольшим исключением, касающимся незначительных перестановок аминокислотных последовательностей. Изоформы ОБМ крысы с *M* 17.0 и 14.0 кДа не имеют аналогий с ОБМ человека. Для мышей доказано наличие изоформ ОБМ с *M* 21.5, 17.0 и 14.0 кДа. Изоформы ОБМ мыши с меньшими массами образуются путем делеции участка хромосомы, кодирующей аминокислотную последовательность в области С-конца. Показана значительная степень гомологии между аминокислотными последовательностями ОБМ (80–90%) среди млекопитающих. Так, в аминокислотных последовательностях ОБМ человека и быка имеются различия аминокислотных остатков лишь в нескольких положениях, в то время как ОБМ крысы отличается от ОБМ человека и быка положением 40 а.о. в середине полипептидной цепи (от 118 до 157 остатка) [4].

ОБМ характеризуется необычайно высоким содержанием (~25%) основных аминокислот (аргинин, лизин и гистидин), равномерно распределенных по всей полипептидной цепи (рис. 1), что и обуславливает очень высокую изоэлектрическую точку белка (*pI* 11.5–13.0). Основная изоформа ОБМ с *M* 18.5 кДа подвергается нескольким посттрансляционным модификациям, в том числе фосфорилированию, ацетилированию *N*-конца, дезамидированию глутамин и аспарагин и дезиминированию остатков аргинина. Все это приводит к микрогетерогенности по заряду молекул белка. Одним из главных источников гетерогенности считается фосфорилирование и дезиминирование. Такая микрогетерогенность зарядов может варьировать у различных индивидуумов в зависимости от возраста и патологического состояния организма. Так, например, ОБМ-компонент 1 (С1) соответствует изоформе с максимальным положительным зарядом, в которой ни один из 19 аргининов не модифицирован, а ОБМ-компонент 8 (С8) соответствует изоформе, в которой 6 из 19 остатков Arg превратились в цитруллин. Интересно отметить, что количество компо-

нента С8 значительно возрастает в тканях мозга пациентов, страдающих РС [5]. Например, в головном мозге взрослого человека 20% от общего количества ОБМ существует в С8-изоформе, при РС количество этой изоформы возрастает до 45%, а при остром склерозе Марбурга доходит до 80% и выше [6]. В последнем случае у ОБМ 18 из 19 остатков Arg подвергаются модификации. Было показано, что уменьшение положительного заряда ОБМ приводит к уменьшению способности агрегировать липидные везикулы, что, вероятно, приводит к менее компактной миелиновой оболочке, легче подвергаемой разрушению.

В процессе метаболизма внутриклеточный протеолиз ОБМ, как и других белков, происходит под действием различных протеиназ, а также протеасомы. После процессинга пептиды – продукты деградации ОБМ, представляются на молекулах главного комплекса гистосовместимости (МНС). Изменение состава пептидов, презентуемых на МНС, может приводить к различным патологическим нарушениям. Идентификация пептидов, образующихся при гидролизе ОБМ различными ферментами, и определение их иммуногенности может, в перспективе, привести к выявлению ключевых протеиназ, вовлеченных в развитие рассеянного склероза, как мишеней для лекарственной терапии этого социально значимого заболевания.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс ферментативной деградации ОБМ может протекать по двум основным путям – с помощью протеасомы и протеиназ. Часть пептидов, которые получают после деградации белков протеасомой, связываются в эндоплазматическом ретикулуме с ТАР-белками (белки-транспортёры, ассоциированные с процессингом антигенов) и затем представляются на молекулах МНС I класса для взаимодействия с CD8+ Т-клетками. Аналогично, часть пептидов, которые получают после деградации белков протеиназами, могут затем представляться на молекулах МНС II класса для опознавания CD4+ Т-клетками (рис. 2).

В данной работе для изучения протеолиза ОБМ были использованы несколько ферментов, которые, как уже было показано ранее, могут принимать участие в развитии демиелинизации при рассеянном склерозе, а именно металлопротеиназы MMP3 и

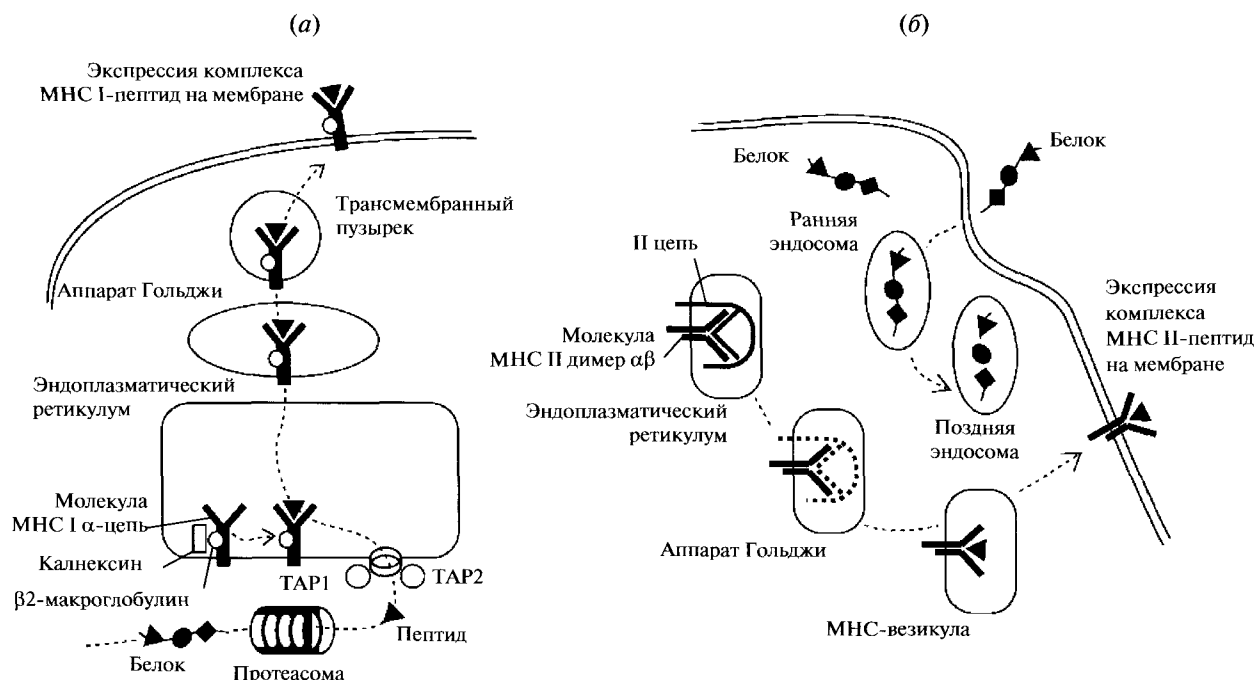


Рис. 2. Процессинг и презентация антигенов: на молекулах МНС I класса (а) и на молекулах МНС II класса (б).

ММР9, кальпаин, катепсин D и трипсин. Протеиназы могут участвовать в процессе демиелинизации, не только гидролизуя белки миелиновой оболочки, но и активируя аутоиммунные реакции лимфоцитов на собственные антигены.

Протеолитическая активность металлопротеиназ, уровень продукции которых увеличивается во время воспаления, приводит к деградации различных экзогенных белков. Пептиды, образующиеся в данном процессе, могут далее процессироваться и представляться на молекулах МНС II класса, активируя таким образом аутореактивные Т-клетки [7]. Роль металлопротеиназ в разрушении миелиновых мембран хорошо изучена, кроме того, секреция желатиназы В-нейтрофилами и макрофагами, регулируемая цитокинами, была подробно исследована *in vitro* [3].

*ММР3, или стромелизин (КФ 3.4.24.17)*

Известно, что стромелизин (нейролизин) распознает в субстратах последовательность из шести аминокислотных остатков с мотивом RXX-X<sub>АН</sub>XX (1), XX<sub>В</sub>X-X<sub>АН</sub>XX (2), где Р – остаток пролина, X – ароматический, гидрофобный или основной аминокислотный остаток, X<sub>В</sub> – основной аминокислотный остаток, X<sub>АН</sub> – ароматический или большой гидрофобный остаток [8]. Исходя из данных по протеолизу природных субстратов можно определить, что нейролизин способен гидролизовать не только связи между гидрофобными либо положительно за-

ряженными аминокислотными остатками, но и такие связи, как Pro-Met/Leu, Glu-Val/Met, Nva, Gln/Asn-Phe, Gly-Phe/Leu, Ile [9].

Группой исследователей из Канады [10, 11] было показано, что содержание протеиназы ММР3 (стромелизин-1) значительно повышается в экстрактах из белого вещества больных РС, при этом выявлена высокая протеолитическая активность ММР3 в отношении ОБМ. Отмечается, что скорость гидролиза (по данным электрофореза) С8-изоформы ОБМ стромелизином-1 была почти в 2 раза выше, чем изоформы С1, что, вероятно, связано с конформационными различиями изоформ. С помощью иммуноблоттинга было показано, что при гидролизе С1 стромелизином продуцируется пептид, содержащий иммунодоминантный эпитоп 84–89. Кроме того, авторами работы [11] с помощью масс-спектрометрии фракций после разделения гидролизата методом ВЭЖХ были обнаружены следующие пептиды: 1–18, 44–89, 66–89, 76–89, 90–113, 114–133, 134–152, 134–170, 150–168, 156–170.

В проведенных нами исследованиях набор найденных пептидов был гораздо более представительным (табл. 1), что может быть связано с увеличенным временем протеолиза и с альтернативной методикой анализа полученных образцов (в нашей работе суммарный гидролизат анализировали методом MALDI-масс-спектрометрии без хроматографического разделения). Интересно, что мы обнаружили несколько пептидов, начало или конец которых соответствует гидролизу связи Arg41–Phe42, Phe88–Phe89, Arg112–Phe113, Asp132–Tyr133, сов-

**Таблица 1.** Гидролиз ОБМ протеиназами. Наиболее часто встречающиеся места протеолиза и получающиеся пептиды

Фермент	Связи, часто гидролизующиеся в ОБМ	Области редкого гидролиза	Пептиды, найденные в гидролизате, которые могут представляться на МНС II	Литературные данные
MMP3	S10-K11, S17-T18, R41-F42, F43-G44, G58-H59, A62-R63, Y67-G68, D81-E82, H87-F88, F88-F89, R106-G107, S109-L110, R112-F113, D132-Y133, D144-A145, A145-Q146	1-8, 18-25, 50-56, 72-79, 89-101, 154-165	68-87, 68-88	S17-T18, R43-F44, R65-Y66, F88-F89, S113-R114, D132-Y133, S152-K153, F155-K156, R158-D159 [11]
MMP9	P28-A29, G40-R41, R41-F42, F42-F43, F43-G44, F88-F89, F89-K90, Q102-G103, S109-L110, F113-S114, D132-Y133	50-60, 79-88, 114-132, 155-167	72-88, 75-88, 75-91, 76-90	F89-K90, S109-L110, D132-Y133 [12] F89-K90, S109-L110, F113-S114, D132-Y133 [13]
Катепсин D	S10-K11, L27-P28, D32-T33, F42-F43, F43-G44, K73-A74, D81-E82, F88-F89, N91-I92, Q102-G103, R112-F113, W115-G116, G125-Y126, K134-S135	12-23, 64-73, 92-101, 150-169	8-24, 11-23, 12-26, 14-27, 33-49, 44-59, 55-73, 68-88, 74-88, 89-103, 92-110, 116-134, 120-137, 125-143	L36-D37, F42-F43, F88-F89, N91-I92 [15], а также обнаружен пептид 1-91 [16]
Трипсин	RK9-S10, R29-H30, R41-F42, K51-R52, R63-T64, R78-P79, K90-N91, R96-T97, R106-G107, R112-F113, R129-A130, K141-G142	12-24, 116-130, 142-169	10-29, 11-28, 12-29, 32-51, 40-55, 41-54, 43-61, 71-87, 74-90, 79-93, 101-115, 112-129, 132-148, 140-156	Липидсвязанная форма ОБМ человека R78-T79, R96-T97 свободный ОБМ R23-H24, R63-T64, R78-T79, R96-T97, R106-G107 [19]
Кальпаин	K4-R5, T18-M19, R29-H30, H30-R31, G68-S69, Q75-G76, V86-H87, H87-F88, R96-T97, G107-L108, S109-L110, R112-F113, G116-A117, E118-G119, R129-A130, Y133-K134	10-24, 31-38, 52-61, 93-108, 134-166	12-26, 13-29, 29-41, 31-44, 31-47, 35-51, 48-65, 69-81, 69-85, 69-86, 69-88, 69-89, 74-87, 75-87, 76-87, 76-92, 77-91, 97-111, 102-116, 110-129, 113-129, 116-132, 119-131, 119-133, 146-162	V93-T94, R47-G48, A16-S17, H21-A22, G25-F26, D59-S60, G68-S69, R96-T97, S109-L110, D144-A145, L155-G156 [24] F89-K90 [27]

падающих с данными Москарелло [10, 11]. Стоит отметить, что в нашем случае гидролизуется связь Lys154-Leu155, а не Phe153-Lys154, как определили канадские исследователи.

#### *MMP9, или желатиназа В (КФ 3.4.24.35)*

ОБМ, как было показано ранее, является природным субстратом для MMP9 [3]. Известно, что количество MMP9 увеличивается при различных воспалительных процессах в ЦНС, в том числе при энцефаломиелитах, рассеянном склерозе и деменциях, связанных со СПИДом, при этом MMP9 секретируется лимфоцитами.

Специфичность этой протеиназы была определена методом фагового дисплея и делится на три подтипа: X-Arg-Arg-Hy-Ser/Thr, Pro-X-X-Hy-Ser/Thr, Gly-Leu-Lys/Arg [12], где Hy – гидрофобная аминокислота. Уникальность этой металлопротеиназы заключается в предпочтении аргинина как в позиции P2, так и в позиции P1, а также серина/треонина в позиции P2'.

В основном все определенные в нашей работе места гидролиза соответствуют специфичности

MMP9. Однако, как и для любых других пептидаз, места гидролиза больших белковых субстратов часто определяются доступностью участков, то есть локализации участка на поверхности или внутри белковой структуры.

Интересно, что в гидролизате обнаруживается очень много пептидов, начало или конец которых соответствуют гидролизу связи Asp132-Tyr133. Аспарагиновая кислота в P1-положении не полностью соответствует специфичности фермента, который предпочитает положительно заряженные аминокислотные остатки слева от расщепляемой связи. Объяснением данного экспериментального факта может служить наблюдение, что такое же место протеолиза было обнаружено Криделем с соавт. [12], которые объясняют его наличием тирозина – гидрофобной аминокислоты в положении P1'. В другой работе [13] было обнаружено, что при протеолизе изоформы ОБМ с массой 21.5 кДа получается только пять основных фрагментов, соответствующих основным иммунодоминантным пептидам – активаторам Т-клеток.

*Катепсин D (КФ 3.4.23.5)*

Катепсин D является мажорной аспартильной эндопептидазой в головном мозге млекопитающих. Иммуноцитохимическими методами было продемонстрировано наличие катепсина D в нейронах, олигодендроцитах, эпителии хорoidalного плексуса (однослойный секреторный эпителий, выстилающий желудочки мозга) и в клетках эпендимы, но не в астроцитах [14]. Присутствие катепсина D в олигодендроцитах указывает на то, что этот фермент может быть вовлечен в метаболизм белков миелиновой оболочки. Кроме того, было показано, что содержание катепсина D увеличивается в тканях животных с развивающимся экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЕАЕ), а также в бляшках больших рассеянным склерозом.

Ранее методами электрофореза и ионообменной хроматографии с последующим определением N-концевых аминокислот было показано, что под действием катепсина D ОБМ деградирует до набора фрагментов, состав которых различается в зависимости от рН буфера, в котором осуществлялся гидролиз [15, 16]. При этом основными сайтами протеолиза являются Leu36–Asp37, Phe42–Phe43, Phe88–Phe89 и Asn91–Ile92. Необходимо отметить, что специфичность катепсина D, определенная по пептидным субстратам и по окисленной В-цепи инсулина, показывает предпочтения связям, образованным ароматическими аминокислотами фенилаланином или тирозином, а также гидрофобным лейцином (Leu-Tyr, Phe-Phe, Phe-Tyr, Phe-Leu, Leu-Leu). В то же время под действием катепсина D также могут гидролизоваться связи Tyr-Thr, Phe-His, Phe-Lys и Leu-Leu [17].

Мы обнаружили все перечисленные выше сайты протеолиза кроме Leu36–Asp37 (табл. 1). Предположительно, это связано с тем, что мы использовали фермент, выделенный из иного, чем в работах [15, 16] органа (из печени, а не из мозга). Были определены и другие сайты протеолиза, в основном перед или после гидрофобных либо ароматических аминокислотных остатков, то есть укладываемые в существующие представления о специфичности катепсина D.

*Трипсин (КФ 3.4.21.4)*

Известно, что единственная мРНК трипсиноподобных ферментов, найденная в головном мозге, это мРНК трипсина 4, или мезотрипсина. Мезотрипсин по специфичности можно отнести к наиболее узкоспецифичным трипсинам, с обычными для этого семейства протеиназ предпочтениями к положительно заряженным аминокислотам слева от гидролизуемой связи. Связи, образованные карбоксильной группой аргинина, гидролизуются в 7–10 раз быстрее, чем в случае лизина [18].

Ранее методами идентификации N-конца пептида и электроспрей-масс-спектрометрии (ESI-MS)

было определено, что ОБМ является хорошим субстратом трипсина 4. Основной белок миелина, находясь в липидсвязанной форме, подвергается селективному гидролизу в двух местах, 79–80 и 97–98 [19]. Для свободной (не связанной с липидами) формы ОБМ в работе Медвецкого с соавт. [19] были определены следующие сайты протеолиза трипсином 4: Arg29–His30, Arg63–Thr64, Arg96–Thr97, Arg106–Gly107, которые совпадают с полученными нами (табл. 1). Кроме этих сайтов, нами были определены следующие: Lys51–Arg52, Lys90–Asn91, Arg112–Phe113, Arg129–Ala130.

*Кальпаин (КФ 3.4.22.52)*

Семейство кальпаинов делится на два подсемейства – тканеспецифичные и встречающиеся во всех клетках организма. Среди последних есть две изоформы, которые активируются микромолярным и миллимолярным количеством ионов кальция ( $\mu$ - и  $m$ -кальпаин соответственно). В данном исследовании использовался  $\mu$ -кальпаин, который в дальнейшем мы будем обозначать просто кальпаин. Этот белок экспрессируется в виде профермента и состоит из двух субъединиц: каталитической – с  $M$  80 кДа и регуляторной – с  $M$  30 кДа [20]. В процессе активации он превращается в фермент с  $M$  76 кДа. Ранее было показано, что при ЕАЕ и при РС активность кальпаина значительно увеличивается. Он может активироваться и высвобождаться из инфильтрирующих воспалительных и резидентных клеток ЦНС, таким образом продуцируя иммуногенные пептиды, которые могут быть процессированы для дальнейшей презентации Т-лимфоцитам. Известно, что некоторые фрагменты ОБМ (50–97, 71–170), полученные после гидролиза кальпаином, содержат потенциально иммуногенные сайты, которые вызывают ЕАЕ у крыс Льюиса. Кальпаин активно продуцируется в активированных астроцитах, моноядерных фагоцитах и Т-клетках [20, 21]. Было показано, что активированные макрофаги также секретируют кальпаин *in vitro* [22].

Специфичность этой протеиназы была определена с использованием выродженных биотинилированных библиотек пептидных субстратов [23]. Для подсайта  $P1$  предпочтение убывает в ряду Leu = Phe > Val = Tyr > Thr > Ile = Met = Lys > Gly  $\gg$  Glu > His, и для подсайта  $P1'$  в ряду Met > Ala > Arg > Lys = Leu > Phe  $\gg$  Ser > Gly > His.

В нашей работе (табл. 1) были определены несколько мест протеолиза, которые в основном соответствуют специфичности данного фермента, с учетом доступности участков полипептидной цепи для гидролиза. Необходимо отметить, что среди фрагментов, массы которых определены MALDI-масс-спектрометрией, присутствует довольно много пептидов, начало либо конец которых соответствует гидролизу связей His30–Arg31, Gly68–Ser69, Val86–His87, Arg129–Ala130. Часть из этих сайтов была

подтверждена в работе [24]. Интересно, что при длительном протеолизе исчезают пептиды, полученные при гидролизе связи Glu118–Gly119 и появляются пептиды, которые на С-конце несут остаток His87, то есть происходит разрыв связи His87–Phe88. Практически не подвергаются деградации районы 10–24, 31–38, 52–61, 93–108, 134–166.

Для всех изученных протеиназ при сравнении характера деградации ОБМ за разное время инкубации (8 и 24 ч) можно сделать следующие выводы: количество пептидов, определяемых в гидролизате, при длительной инкубации уменьшается, оставшиеся через 24 ч пептиды либо совпадают с теми, которые присутствовали в смеси 8-часового протеолиза, либо получаются расщеплением более длинных предшественников. Так, например, в случае действия на ОБМ ММР3 за 8 ч было обнаружено 58 пептидов, через 24 ч осталось 38, из них 24 совпадают с предыдущими (для ММР9 это 37, 34 и 15; для кальпаина 36, 28 и 12; для катепсина D 29, 21 и 11 и для трипсина 32, 17 и 7).

Секреция энцефалитогенных пептидов-фрагментов ОБМ протеиназами значительно увеличивает молярное количество продуктов, которые могут в дальнейшем презентироваться Т-клеткам [3]. Известно, что с молекулами МНС II класса связываются пептиды с числом аминокислотных остатков 12–20, но не более 25. В работе [25] был проведен анализ пептидов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости людей, страдающих РС. Довольно значительное количество пептидов соответствует последовательности основного белка миеллина, а именно фрагментам 10–30 и 77–112.

С точки зрения презентации на молекулах МНС II класса, наиболее интересен в гидролизате ММР3 пептид 68–87, а также появляющийся при длительном гидролизе (24 ч) пептид 68–88. В случае ММР9 это может быть пептид 75–88 и появляющиеся при продолжительном гидролизе пептиды 72–88, 75–91, 76–90. В гидролизате ОБМ катепсином D присутствуют в основном довольно длинные пептиды, более 12 а.о. Для представления на МНС II наиболее подходящими являются пептид 74–88, а также появляющийся при гидролизе в течение 24 ч пептид 68–88. В случае трипсина, поскольку мы использовали бычий трипсин, характер деградации этим ферментом немного отличается от такового для мезотрипсина человека. Тем не менее бычий трипсин также способен генерировать пептиды, которые могут представляться на молекулах МНС II класса, это пептиды 64–87, 74–90, 79–93, а также появляющийся при длительном гидролизе пептид 71–87. Кальпаин отличается от других использованных протеиназ тем, что продуцирует довольно много пептидов, которые могли бы представляться на молекулах МНС II класса (табл. 1). Необходимо отметить, что кальпаин занимает особое место среди внутриклеточных протеиназ. Недавние исследования показали, что

инактивация протеасомы ингибитором бортезомибом приводит к активации экспрессии кальпаина, который может частично замещать функции протеасомы [26].

### Протеасома

В предыдущих работах нами уже была показана принципиальная возможность гидролиза ОБМ протеасомой [27, 28], однако не было проведено сравнения сайтов протеолиза протеасомами, выделенными из разных источников. Известно, что протеасома представляет собой мультисубъединичный протеиназный комплекс с молекулярной массой более 2 МДа и широкой субстратной специфичностью. Состав каталитических субъединиц неоднороден и может варьировать от одного белкового комплекса к другому, в зависимости от ткани, из которой выделяется протеасома. Помимо этого, состав может меняться и вследствие действия на клетки различных цитокинов, например гамма-интерферона, при этом экспрессируются так называемые иммуно-субъединицы, формирующие иммунопротеасому. В связи с этим изменяются и предпочтения к гидролизу конкретных пептидных связей, реже происходит гидролиз после отрицательно заряженных аминокислотных остатков и усиливается расщепление связей после гидрофобных аминокислот.

Часть пептидов, продуцируемых протеасомой при гидролизе внутриклеточных белков, представляются на молекулах МНС I класса Т-клеткам [29]. Ранее было показано, что пептиды, содержащиеся на С-конце гидрофобные аминокислотные остатки, значительно лучше связываются с молекулами МНС I класса. Кроме того, известно, что у пациентов, страдающих РС, наблюдается увеличение количества молекул МНС I класса в очаге воспаления под действием гамма-интерферона. Поэтому изменение состава продуцируемых протеасомой пептидов может приводить к усилению Т-клеточного ответа.

Для деградации ОБМ мы использовали протеасому, выделенную из двух эукариотических линий клеток, СНО и NSO, необработанных и обработанных гамма-интерфероном (табл. 2). Можно отметить большое разнообразие аминокислотных остатков, между которыми происходит гидролиз. Полученные данные соответствуют представлениям о широкой субстратной специфичности протеасомы, в состав которой входит три типа каталитических центров, разных по специфичности. При обработке клеток гамма-интерфероном изменялся состав пула выделяемых протеасом, что приводило и к увеличению числа мест гидролиза и соответственно – увеличению числа определяемых фрагментов. Эти наблюдения совпадают с литературными данными по увеличению активности иммунопротеасомы по сравнению с конститутивной [30].

**Таблица 2.** Гидролиз ОБМ протеасомой, выделенной из эукариотических клеток. Наиболее часто встречающиеся места протеолиза и получающиеся фрагменты

Источник протеасомы	Связи, часто гидролизуются в ОБМ (в скобках указана частота встречаемости данного сайта протеолиза)	Области редкого гидролиза	Пептиды, найденные в гидролизате, которые могут представляться на МНС I (в скобках указана длина пептида, число а.о.)
NSO	D37-S38, T65-H66, G68-S69, P71-Q72, D81-E82(6), F89-K90(4), Q102-G103, L110-S111(3), F113-S114(4), G116-A117, A117-E118(4), A130-S131, A136-H137(3), A145-Q146(5)	1-12, 26-31, 52-58, 90-102, 120-128, 152-169	69-81(12), 82-89(8), 109-117(9)
NSO + IFNg	T18-M19, M19-D20, A22-R23(3), H24-G25, D37-S38, R41-F42, F43-G44(5), R47-G48, H60-A61, A61-A62, T64-T65(3), T65-H66, Y67-G68, G68-S69, D81-E82(8), F89-K90(4), L108-S109, L110-S111(3), F113-S114(3), G116-A117, G125-Y126, A136-H137(5), K138-G139, A145-Q146	70-81, 90-102, 152-169	9-18(10), 32-43(12), 33-43(11), 50-60(11), 82-89(8), 109-115(7)
CHO	R31-D32, G48-A49, T65-H66(4), Y67-G68, G68-S69, D81-E82(3), H87-F88, F88-F89(6), F113-S114(3), E118-G119, Y133-K134(3)	1-15, 18-30, 32-41, 51-64, 89-98, 100-108, 120-127, 143-169	76-86(11), 82-88(7), 99-109(11), 109-115(7), 119-129(11)
CHO + IFNg	S17-T18(3), R23-H24, H30-R31, R31-D32(4), D37-S38, G48-A49, T65-H66(4), Y67-G68, G68-S69, Q75-G76, D81-E82(5), F88-F89(7), F89-K90(4), G103-K104, L108-S109(3), F113-S114(4), W115-G116(5), G116-A117(3), A117-E118(9), E118-G119(4), G119-Q120(3), F124-G125(3), G127-G128(3), A130-S131(3), D132-Y133(3), Y133-K134(7), A136-H137(4), G139-L140(3)	11-17, 148-169	8-17(10), 9-17(9), 23-31(9), 24-30(7), 24-31(8), 42-48(7), 51-59(9), 76-86(11), 82-88(7), 82-89(8), 99-109(11), 108-118(11), 109-117(9), 111-117(7), 114-124(11), 119-129(11), 120-126(7), 120-127(8), 125-133(9), 137-147(11)

Протеасома, выделенная из мозга мышей, продуцирует значительно больше пептидов, чем протеасома из обеих линий клеток (табл. 3). В отличие от протеиназ, при увеличении длительности гидролиза протеасомой количество потенциальных пептидов, которые могут представляться на МНС, увеличивается. Мыши линии BALB/c использовались в качестве контроля, как не развивающие аутоиммунные заболевания. Протеасома из мозга мышей этой линии за 4 ч инкубации с ОБМ практически не выселяет пептидов, способных представляться на поверхности клетки. В случае продолжительного гидролиза такие пептиды появляются. Мыши линии SJL предрасположены к развитию ЕАЕ, — мышинной модели РС. Протеасома, выделенная из мозга таких мышей, гидролизует ОБМ в максимальном числе мест, давая большое разнообразие пептидов, способных представляться на комплексе МНС I класса. Вероятно, это может быть связано с увеличением содержания иммуносубъединиц в протеасоме из этого источника [28]. Полученные данные указывают на возможную связь между составом пула протеасом и склонностью к развитию аутоиммунных патологий.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**В работе использованы:** Трис, глицин, дитиотреит (ДТТ), натриевая соль АТР, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, β-меркаптоэтанол, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-АМС, 2,5-дигид-

роксibenзойная кислота (Sigma, США), глицерин, Тритон X-100, NaCl, EDTA, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Helicon, Россия). DMSO (MP Biomedicals). Ацетонитрил для ВЭЖХ, TFA (ICN, США). MMP3 (каталитический домен, рекомбинантный фермент человека), MMP9 из мыши, кателсин D из печени человека, трипсин быка, кальпаин из плазмы крови человека (Sigma, США). ОБМ выделяли из мозга быка по методике [31].

**Оборудование.** Центрифугирование проводили на центрифугах Eppendorf (Германия), спектрофотометрические и флуориметрические измерения — на планшетном спектрофлуориметре Tecan Genios (Tecan, Австрия) в планшетах Greiner Bio-One, Германия. Все хроматографические стадии осуществляли на приборах для скоростной и высокоэффективной жидкостной хроматографии (FPLC, HPLC) фирм “Bio-Rad” и “Waters” (Millipore) с использованием колонок Superose 6 10/300, MonoQ 5/50 (GE Healthcare).

**Масс-спектрометрия.** Масс-спектры были получены на тандемном MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd). Масс-спектры получены в режиме положительных ионов в линейной моде, с использованием рефлектрона и в тандемном режиме; точность измеренных средних масс в линейной моде составляла 2–4 Да, точность измеренных моноизотопных масс — около 0.005–0.01%, точ-

**Таблица 3.** Гидролиз основного белка миелина протеасомой, выделенной из мозга мышей. Наиболее часто встречающиеся места протеолиза и получающиеся фрагменты

Источник протеасомы	Связи, часто гидролизующиеся в ОБМ (в скобках указана частота встречаемости данного сайта протеолиза)	Области редкого гидролиза	Пептиды, найденные в гидролизате, которые могут представляться на МНС I (в скобках указана длина пептида)
BALB/c, 4 ч	A14-S15, F42-F43, F43-G44, R63-T64, H66-Y67(3), Y67-G68, D81-E82(4), F88-F89(4), F89-K90(6), L108-S109, L110-S111, R112-F113, F113-S114(5), W115-G116, A117-E118(6), Y133-K134(3), A136-H137(5), K138-G139, L140-K141, A145-Q146(6)	20-40, 44-62, 70-80, 97-107, 146-166	3-14(12), 82-88(7), 82-89(8), 111-121(11)
BALB/c, 24 ч	A14-S15, S17-T18(4), R23-H24, H24-G25, R31-D32(6), F42-F43, F43-G44, T65-H66(4), H66-Y67(4), A74-Q75(4), D81-E82(6), F88-F89(6), F89-K90(7), T94-P95(6), R96-T97, L108-S109(5), L110-S111(5), R112-F113(6), F113-S114(6), S114-W115(3), A117-E118(10), A130-S131(4), S131-D132(3), D132-Y133(5), Y133-K134, A136-H137, L140-K141, A145-Q146(5)	52-61, 120-127, 150-167	1-9(9), 1-10(10), 3-14(12), 7-17(11), 9-17(9), 22-31(10), 24-31(8), 46-55(10), 51-59(9), 67-74(8), 75-81(7), 82-88(7), 82-89(8), 95-103(9), 109-117(9), 111-117(7)
SJL, 4 ч	Q8-R9, R9-S10(3), L13-A14(3), A14-S15, H24-G25(3), G25-F26(3), F26-L27, R29-H30, R31-D32(5), L39-G40, G40-R41, F42-F43(3), F43-G44(3), G44-S45, S45-D46, A49-P50(3), P50-K51, K51-R52, H59-H60, A61-A62, R63-T64, H66-Y67(4), Y67-G68(3), G68-S69(4), S69-L70, Q75-G76, G76-H77(3), D81-E82(7), F88-F89(6), F89-K90(6), K90-N91, T94-P95(6), L108-S109(3), L110-S111, S111-R112(8), R112-F113(4), F113-S114(3), S114-W115(11), W115-G116(5), G116-A117(3), A117-E118(4), E118-G119(8), G127-G128, R129-A130(3), A130-S131(5), S131-D132(5), D132-Y133(5), Y133-K134(4), A136-H137(7), L140-K141(3), D144-A145, A145-Q146(3)	3-8, 52-59, 156-169	1-9(9), 1-11(12), 3-14(12), 9-17(9), 13-24(12), 23-31(9), 24-31(8), 25-31(7), 42-48(7), 43-49(7), 50-61(12), 51-59(9), 82-88(7), 82-89(8), 108-118(11), 109-117(9), 114-124(11), 121-131(11), 122-129(8), 146-155(10)

ность измеренных масс фрагментов – 1–2 Да. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Поиск по «пептидному фингерпринту» и спектрам фрагментации проводили в «домашней» базе данных, куда предварительно поместили последовательность ОБМ с указанной выше точностью, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и *N*-концевого ацетилирования. Специфичность протеолиза нигде не указывали.

Все растворы готовили на дистиллированной воде или на воде особой чистоты из установки Milli-Q (Millipore). Использовались следующие буферные растворы: буфер А: 20 мМ Трис-НСl, 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 2 мМ АТР, 10% глицерина, рН 7.5. Буфер Б: 20 мМ Трис-НСl, 250 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 1 мМ АТР, 20% глицерина, рН 7.5. Буфер Г: 20 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 1 мМ АТР, рН 7.5. Буфер Е: 20 мМ Трис-НСl, 0.1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 0.1 мМ АТР, 10% глицерина, рН 7.8.

**Выделение протеасомы.** Клетки осаждали из ростовой среды или гомогената ткани центрифугированием при 800 g. Суспензию клеток ресуспендировали в равном объеме буфера А, гомогенизировали в стеклянной ступке, 3 раза проводили цикл замораживания в жидком азоте и размораживания. Центрифугировали от дегриса при 1500 g, +4°C, 30 мин, затем супернатант отделяли и центрифугировали при 13200 g, +4°C, 30 мин. Полученный супернатант осаждали сульфатом аммония в концентрации 40% от насыщения в течение 1 ч при +4°C. Центрифугировали при 13200 g, +4°C, 30 мин, осадок отделяли и ресуспендировали в буфере Б, полученный раствор центрифугировали 13200 g, +4°C, 10 мин для удаления не растворившихся компонентов. Полученный таким образом раствор наносили на колонку Superose 6, уравновешенную буфером Б, и вели элюцию на скорости 0.3 мл/мин. Собранные фракции анализировали на присутствие протеасомы, измеряя скорость гидролиза модельного пептидного субстрата Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC. Фракции, содержащие протеасому, переводили в буфер Е, содержащий 0.275 М NaCl, с помощью диализа. Получен-



ный раствор наносили на колонку MonoQ, уравновешенную буфером E, содержащим 0.275 M NaCl, и промывали 10 объемами этого буфера, затем проводили элюцию в градиенте концентрации NaCl (от 0.275 до 1 M в 20–25 объемах буфера E). Собранные фракции анализировали на присутствие протеасомы. Фракции, содержащие протеасому, переводили в буфер Г диализом в течение 12 ч.

**Протеолиз ОБМ.** ОБМ инкубировали с ферментом при 37°C в течение 8 и 24 ч. Содержание ОБМ в реакционной смеси составляло 0.12 мг/мл, содержание 26S протеасомы 25 мкг/мл, кальпаина и MMP3 2.4 мкг/мл, катепсина D и MMP9 1.2 мкг/мл, трипсина 0.12 мкг/мл. Использовали следующие буферы: для 26S протеасомы – буфер Г, для катепсина D – 0.05 M ацетат аммония, pH 3.5; для кальпаина – 20 mM Трис-HCl pH 7.5, содержащий 10 mM CaCl<sub>2</sub> и 5 mM β-меркаптоэтанол; для трипсина и MMP3 – 20 mM Трис-HCl pH 7.5, содержащий 10 mM CaCl<sub>2</sub>, для MMP9 – 20 mM Трис-HCl pH 7.5, содержащий 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01% Тритон X-100 и 200 mM NaCl. В контрольном опыте было определено, что инкубация ОБМ в различных использовавшихся буферах при 37°C в течение 48 ч не приводит к самопроизвольной деградации белка.

### ВЫВОДЫ

Таким образом, в работе показано, что характер гидролиза ОБМ протеиназами и протеасомой значительно различается. Протеиназы, ассоциированные с PC, расщепляя пептидные связи в ОБМ чаще всего в соответствии со своей специфичностью, продуцируют небольшое количество пептидов длиной 10–20 а.о., способных презентироваться на поверхности клетки. Среди протеиназ выделяется кальпаин, генерирующий значительное количество пептидов, которые могут связываться с молекулами МНС II класса. Протеасома, вследствие своей широкой субстратной специфичности, гидролизует ОБМ в большем числе мест, чем любая из протеиназ. Наиболее интенсивно основной белок миеллина процессируется под действием протеасомы, выделенной из головного мозга мышей, склонных к развитию ЕАЕ. Этот факт может свидетельствовать об усиленной презентации иммунодоминантных фрагментов ОБМ в клетках мозга мышей линии SJL.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была поддержана грантами РФФИ № 09-04-01546-а, 09-04-12128-офи\_м, ГК от 02 марта 2009 г. № 02.512.12.2026, “Работы по проведению проблемно-ориентированных поисковых исследований и созданию научно-технического задела в области геномных и постгеномных технологий создания лекарственных средств с участием организаций Франции”, программой “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на

2009–2013 годы ГК П1371 от 02 сентября 2009 г. Программой фундаментальных исследований Президиума РАН № 27 (Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rinne U.K., Riekkinen P. // *Acta Neurol. Scand.* 1968. V. 44. P. 156–167.
2. Cross A.H., Dolich S., Raine C.S. // *Cell Immunol.* 1990. V. 129. P. 22–31.
3. Opdenakker G., van Damme J. // *Immunol. Today.* 1994. V. 15. P. 103–107.
4. Чехонин В.П., Гурина О.И., Дмитриева Т.Б., Семенова А.В., Савченко Е.А., Григорьев М.Э. // *Вопросы мед. химии.* 2000. V. 6. P. 10–27.
5. Moscarello M.A., Wood D.D., Ackerley C., Boulias C. // *J. Clin. Invest.* 1994. V. 94. P. 146–154.
6. Wood D.D., Bilbao J.M., O'Connors P., Moscarello M.A. // *Ann. Neurol.* 1996. V. 40. P. 18–24.
7. van den Steen P.E., Proost P., Grillet B., Brand D.D., Kang A.H., van Damme J., Opdenakker G. // *FASEB J.* 2002. V. 16. P. 379–389.
8. Kadonosono T., Kato M., Ueda M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 75. P. 1353–1360.
9. Nagase H., Fields C.G., Fields G.B. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 20952–20957.
10. D'Souza C.A., Mak B., Moscarello M.A. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 13589–13596.
11. D'Souza C.A., Moscarello M.A. // *Neurochem. Res.* 2006. V. 31. P. 1045–1054.
12. Kridel S.J., Chen E., Kotra L.P., Howard E.W., Mobashery S., Smith J.W. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 20572–20578.
13. Proost P., van Damme J., Opdenakker G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. V. 192. P. 1175–1181.
14. Whitaker J.N., Terry L.C., Whetsell W.O., Jr. // *Brain. Res.* 1981. V. 216. P. 109–124.
15. Whitaker J.N., Seyer J.M. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. P. 6956–6963.
16. Whitaker J.N., Seyer J.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. V. 661. P. 334–341.
17. Marks N., Benuck M., Hashim G. // *J. Neurosci. Res.* 1980. V. 5. P. 217–223.
18. MEROPS, [merops.sanger.ac.uk](http://merops.sanger.ac.uk).
19. Medveczky P., Antal J., Patthy A., Kekesi K., Juhasz G., Szilagyi L., Graf L. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 545–552.
20. Shields D.C., Schaecher K.E., Saido T.C., Banik N.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 11486–11491.
21. Schaecher K.E., Shields D.C., Banik N.L. // *Neurochem. Res.* 2001. V. 26. P. 731–737.
22. Smith M.E., van der Maesen K., Somera F.P., Sobel R.A. // *Neurochem. Res.* 1998. V. 23. P. 427–434.
23. Cuerrier D., Moldoveanu T., Davies P.L. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 40632–40641.
24. Banik N.L., Chou C.H., Deibler G.E., Krutzsch H.C., Hogan E.L. // *J. Neurosci. Res.* 1994. V. 37. P. 489–496.
25. Fissolo N., Kraus M., Reich M., Ayturan M., Overkleeft H., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2008. V. 38. P. 2401–2411.

26. Li Ch., Chen Sh., Yue P., Deng X., Lonial S., Khuri F.R., Sun Sh. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 16096–16104.
27. Белогуров А.А., Пономаренко Н.А., Говорун В.М., Габибов А.Г., Бачева А.В. // Докл. АН. 2009. V. 425. P. 251–255.
28. Бачева А.В., Белогуров А.А., Пономаренко Н.А., Кнорре В.Д., Говорун В.М., Серебрякова М.В., Габибов А.Г. // *Acta Naturae.* 2009. T. 1. C. 84–87.
29. Kloetzel P.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. V. 1695. P. 225–233.
30. Cardozo C., Kohanski R.A. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 16764–16770.
31. Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Belogurov A.A., Telegin G.B., Suchkov S.V., Kiselev S.L., Lagarkova M.A., Govorun V.M., Serebryakova M.V., Gabibov A.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 281–286.

## Functional Degradation of Myelin Basic Protein. Proteomic Approach

A. V. Bacheva<sup>\*\*</sup>, A. A. Belogurov<sup>\*\*</sup>, E. S. Kuzina<sup>\*</sup>, M. V. Serebryakova<sup>\*\*\*</sup>,  
N. A. Ponomarenko<sup>\*\*</sup>, V. D. Knorre<sup>\*\*</sup>, V. M. Govorun<sup>\*\*\*</sup>, and A. G. Gabibov<sup>\*,\*\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7(495) 939-55-29; e-mail: [anbach@genebee.msu.ru](mailto:anbach@genebee.msu.ru)

<sup>\*</sup>Chemistry Department of Moscow State University, Vorob'evy gory, 1, build. 3, 119991, Moscow

<sup>\*\*</sup>Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

<sup>\*\*\*</sup>Proteomic Centre RAMS, Institute of Physico-Chemical Medicine RAMS, Moscow

Proteolytic degradation of autoantigens is of prime importance in current biochemistry and immunology. The most fundamental issue in this field is the functional role of peptides produced when the specificity of hydrolysis changes during the shift from health to disease and from normal state to pathology. The identification of specific peptide fragments in many cases proposes the diagnostic and prognostic criterion in the pathology progression. The aim of this work is comparative study of the degradation peculiarities of one of the main neuroantigen, myelin basic protein by proteases, activated during progress of pathological demyelinating process, and by proteasome of different origin. The comparison of specificity of different studied biocatalysts gives reason to discuss the critical change in the set of myelin basic protein fragments capable to be presented by major histocompatibility complex class I during neurodegeneration, which can promote the progress of autoimmune pathological process.

*Key words:* myelin basic protein, proteases associated with multiple sclerosis, proteasome, experimental autoimmune encephalomyelitis, mass-spectrometry.