

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИЗМЕНЕНИЙ В ПРОТЕАСОМАХ КЛЕТОК K562 ПРИ АПОПТОЗЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ ДИЭТИЛМАЛЕАТОМ

© А. С. Цимоха,^{1,*} А. Г. Миттенберг,¹ В. А. Куличкова,¹ И. Н. Евтеева,¹
Ю. Я. Ватажок,¹ Т. Н. Моисеева,¹ Ю. Б. Ермолаева,¹ Е. С. Вашукова,¹ И. В. Волкова,¹
И. В. Кожухарова,¹ Л. Н. Гаузе,² И. М. Константинова¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; и

² Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва;

* электронный адрес: atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru

В настоящее время широко изучается участие протеасом в программируемой клеточной гибели. Причем при использовании ингибиторов протеасом были выявлены как проапоптотические, так и антиапоптотические функции протеасом. Такая противоположная функциональность протеасом, по-видимому, определяется пролиферативным статусом клетки. Индуцированный при помощи диэтилмалеата апоптоз в клетках линии K562 мы использовали в качестве модели для исследования субъединичного состава, фосфорилирования субъединиц и ферментативных активностей 26S-протеасом. Нами показано, что протеасомы, выделенные из цитоплазмы контрольных и индуцированных клеток K562, различаются по субъединичному составу, а также по фосфорилированию субъединиц по треонину и тирозину. Наблюдается снижение протеолитической и изменение эндорибонуклеазной активности протеасом по отношению к мРНК *c-fos* под действием диэтилмалеата. Выявлено, что при индукции апоптоза в клетках K562 модифицируется субъединица протеасом ($\zeta/\alpha 5$), ассоциированная с РНКазной активностью. Полученные результаты свидетельствуют в пользу изменения состава и активности протеасом при индукции апоптоза в клетках K562 и участия специфических видов протеасом в реализации программы гибели этих клеток.

Ключевые слова: апоптоз, диэтилмалеат, протеасомы, рибонуклеазы, стабильность информационных РНК, тирозин, треонин, фосфорилирование.

Принятые сокращения: ДЭМ — диэтилмалеат, ПААГ — полиакриламидный гель, ДТТ — дитиотреитол, EDTA — этилендиаминтетрауксусная кислота, HEPES — [2-гидроксиэтил] пиперазин-N'-[2-этансульфоновая кислота], PMSF — фенилметилсульфонилфторид.

Апоптоз, или программируемая клеточная гибель, — сложно регулируемый клеточный процесс, который принято подразделять на две стадии — запуск и выполнение программы (Earnshaw, 1995). Молекулярные механизмы, задействованные в этом процессе, до сих пор окончательно не исследованы. Неспособность клеток претерпевать апоптоз — это один из ключевых моментов в опухолеобразовании. Стадия выполнения инициируется активацией каспаз (семейство цитоплазматических цистеиновых протеаз), которые деградируют специфические клеточные белки, такие как поли-(АДФ-рибоза)-полимераза (PARP) (Martin, Green, 1995). Это приводит к морфологическим изменениям, характерным для апоптоза (например, ядерной фрагментации).

Протеасомы осуществляют программированный протеолиз и процессинг различных регуляторных белков в клетке и, таким образом, играют ключевую роль в различных клеточных процессах, таких как регуляция транскрипции, продвижение клетки по клеточному циклу, проведение сигнала, иммунный ответ и апоптоз. В последнее время при использовании ингибиторов протеасом обнаружили как проапоптотное, так и антиапоптотное функционирование протеасом (Grimm et al., 1996; Lopes et al.,

1997; Dou et al., 1999). Такие противоположные роли протеасом в регуляции апоптоза, по-видимому, обусловлены пролиферативным статусом клетки (Naujokat, Hoffmann, 2002; Wojcik, DeMartino, 2003; Chen, Lin, 2004).

26S протеасома состоит из 20S-каталитической коровой частицы и двух ассоциированных с ней 19S регуляторных комплексов и осуществляет основной нелизосомальный протеолитический путь в клетке. 20S протеасом (700 кДа) представляет собой полый цилиндр, состоящий из четырех лежащих друг на друге колец, каждое из которых образовано семью α - или β -субъединицами (Coux et al., 1996; Groll et al., 1997; Bajorek, Glickman, 2004). Эукариотические 20S-протеасомы проявляют по крайней мере пептидилглутамин-гидролазную, трипсин- и химотрипсин-подобные активности (Coux et al., 1996). 19S-регуляторный комплекс состоит из шести АТФазных и не меньше чем одиннадцати не-АТФазных субъединиц (Glickman et al., 1998).

Помимо протеолитической 20S протеасома обладает еще и эндорибонуклеазной активностью (Petit et al., 1997a, 1997b; Jarrousse et al., 1999; Ballut et al., 2003). Нами была обнаружена специфическая эндорибонуклеазная активность 26S протеасом (Евтеева и др., 2000) и

исследована регуляция этой активности, специфичной по отношению к рибосомным РНК при проведении сигнала от рецептора ЭФР в клетках линии A431 (Евтеева и др., 2003). Кроме того, мы показали наличие РНКазной активности у 26S-протеасом из клеток линии K562, индуцированных к апоптозу (Токтарова и др., 2004), а также к дифференцировке по эритроидному типу (Миттенберг и др., 2002а, 2002б). Известно, что одной из основных стадий регуляции экспрессии генов является контроль стабильности РНК в эукариотической клетке (Tourgiere et al., 2002). Причем регуляция стабильности информационных РНК также наблюдается и в апоптотических клетках (Shchors et al., 2002).

Для осуществления столь разнообразных функций в клетке протеасомы должны быть подвержены строгому регуляторному контролю. Фосфорилирование по сериновым, треониновым или тирозиновым аминокислотам регуляторных белков (например, киназ) является ключевым моментом в передаче сигнала, продвижении клетки по клеточному циклу и в апоптозе (Bandyopadhyay et al., 2004; Sabatini et al., 2004; Contri et al., 2005; Jin et al., 2005; Wang et al., 2005). Фосфорилирование субстратов и ферментов также играет важную роль в убиквитин-протеасомном пути (Glickman, Ciechanover, 2002; Wojcik, DeMartino, 2003). Известно также, что 26S-протеасомы посттрансляционно модифицируются в различных случаях как фосфорилированием, так и ацетилизацией (Bose et al., 1999, 2004; Kimura et al., 2000; Claverol et al., 2002; Fernandez Murray et al., 2002).

Обнаружены сайты потенциального фосфорилирования на субъединицах 20S протеасомы и 19S-регуляторных комплексов и исходя из этого выдвинуто предположение о возможном контроле ферментативных активностей протеасом посредством фосфорилирования (Bose et al., 1999; Fernandez Murray et al., 2002). Так, например, дефосфорилирование $\alpha 3$ и $\alpha 7$ субъединиц протеасом приводило к снижению двух пептидазных активностей протеасом (Mason et al., 1996). Кроме того, фосфорилирование субъединиц протеасом ответственно за ассоциацию 20S протеасомы и 19S-регуляторных комплексов (Rivett et al., 2001).

Известно, что различные клеточные сигналы вызывают изменения в фосфорилированности субъединиц протеасом (Bose et al., 2001; Rivett et al., 2001; Vardag-Gorce et al., 2004). Однако влияние индукторов апоптоза на фосфорилирование и(или) дефосфорилирование протеасом не исследовалось. Кроме того, еще не было исследовано и изменение субъединичного состава протеасом в клетках опухолевого происхождения.

Задачей настоящей работы явилось исследование специфических изменений субъединичного состава и статуса фосфорилирования протеасом из цитоплазмы клеток проэритролейкемии человека линии K562 под действием индуктора апоптоза — диэтилмалеата (ДЭМ). Также мы анализировали влияние данного агента на протеолитическую активность протеасом и нуклеолиз этими частицами индивидуальной мРНК (*c-fos*). Кроме того, с целью изучения механизмов регуляции ферментативных активностей протеасом нами было исследовано влияние на них дефосфорилирования протеасомных субъединиц.

Материал и методика

Клетки проэритролейкемии человека линии K562, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН), культивировали при

37 °С в среде RPMI 1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, в присутствии 0.004 % гентамицина. Для индукции запрограммированной клеточной гибели в культуральную жидкость добавляли ДЭМ до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали клетки в течение 24 ч (Castelli et al., 1998).

Индукцию апоптоза оценивали по изменению морфологии ядер и по межнуклеосомной фрагментации ДНК. Для анализа изменения ядерной морфологии клетки K562, выращенные на покровных стеклах, промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), фиксировали 2%-ным параформальдегидом в течение 10 мин и окрашивали красителем Хёхстом 33258 (Hoehst 33258; 1 мкМ) в течение 30 мин. Препараты просматривали во флуоресцентном микроскопе Zeiss (Германия) и фотографировали с помощью CD-камеры (рис. 1). Препараты ДНК для анализа межнуклеосомной фрагментации ДНК выделяли в соответствии с описанной в литературе методикой (Miller et al., 1988) и разделяли электрофоретически в 2%-ном агарозном геле (Maniatis et al., 1982) (рис. 2).

Транскрипция *in vitro*. Последовательность, содержащая 3'-нетранслируемую область мРНК *c-fos* человека, меченная [α - 32 P] ЦТФ, была синтезирована с помощью транскрипции *in vitro* плазмиды рGEM-3'-*c-fos*, в которую по сайтам *HincII* вставлена 3'-нетранслируемая последовательность мРНК *c-fos* человека. Плазмиду расщепляли рестриктазами для превращения в линейную форму, после чего транскрибировали РНК-полимеразой SP6 согласно инструкциям фирмы-изготовителя (MBI Fermentas, Литва). Транскрибированную РНК обрабатывали ДНКазой I и очищали депротейнизацией с помощью смеси фенол—хлороформ.

Электрофорез РНК проводили в 5%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины в Трис-боратном буферном растворе ТВЕ: 45 мМ Трис-HCl, 45 мМ борной кислоты, 0.5 мМ ЭДТА, pH 8.3 (Maniatis et al., 1975).

Выделение протеасом. Цитоплазматические 26S-протеасомы выделяли и очищали из постмитохондриального супернатанта цитозоля клеток с помощью ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахарозы (15—30 %) и ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 (Hough et al., 1987; Галкин и др., 1998).

Пептидазную активность протеасом пептидил-глютаминилгидролазного типа определяли по гидролизу флуорогенного пептида — Bz-Ala-Ala-Phe-AMC. Для этого 0.5 мМ субстрата инкубировали с 3 мкг протеасом в течение 45 мин при 37 °С в буферном растворе, содержащем 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 1 мМ DTT и 5 мМ АТФ. Реакцию останавливали, добавляя равный объем смеси 70 мМ уксусной кислоты, 100 мМ Na-хлорацетата и 30 мМ ацетата натрия (Barret, 1980). Концентрацию продукта гидролиза (7-амино-4-метилкумарина) определяли на флуориметре собственного изготовления (Туроверов и др., 1998), измеряя экстинкцию при длине волны 365 нм и эмиссию при 440 нм (Barret, 1980).

Для дефосфорилирования протеасом их обрабатывали щелочной фосфатазой кишечника телянка (Fermentas Life Sciences, Литва) в количестве 2 ед. на 1 мкг белка в течение 1 ч при 37 °С в 10 мМ Трис-HCl-буферном растворе, pH 7.5, содержащем 10 мМ MgCl₂.

Обработку РНК с помощью протеасом проводили в течение 30 мин при 37 °С в буферном растворе, содержащем 20 мМ HEPES, pH 7.6, 50 мМ KCl, 0.1 мМ

ЭДТА, 10 % глицерина, 1 мМ АТФ, 0.5 мМ PMSF и 2 мМ DTT.

Двухмерный электрофорез белков протеасом проводили в соответствии с известной методикой (O'Farrell, 1975). В первом направлении ПААГ содержал амфолины рН 3—10. Во втором направлении (после изофокусирования) субъединицы протеасом фракционировали по молекулярным массам в денатурирующем 10%-ном ПААГ (Laemmli, 1970).

Вестерн-блоттинг белков протеасом с применением вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, выполняли, следуя рекомендациям фирмы Sigma. Пероксидазу выявляли с помощью реактивов ECL (ICN Pharmaceuticals). Протеасомы фракционировали на белковые субъединицы в денатурирующем 10%-ном или 12%-ном ПААГ (Laemmli, 1970). Полученные фракции электрофоретически переносили на нитроцеллюлозные фильтры (Hybond C extra, Amersham) в буферном растворе Т (25 мМ Трис-НСl, 190 мМ глицин, 0.05%-ный додецилсульфат натрия и 20%-ный метанол, рН 7.3). Мембрану отмывали в буферном растворе ТBS (10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 150 мМ NaCl) и блокировали центры неспецифического связывания антител 5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в этом же буферном растворе. Избыток BSA отмывали ТBS и мембрану инкубировали с поликлональными ан-

тителами против фосфотреонина (Cell Signaling), с моноклональными антителами против фосфотирозина (Cell Signaling) или против zeta/α5 субъединицы протеасом (Affiniti, UK).

Р е а к т и в ы. В работе использовали среду RPMI 1640, глутамин, эмбриональную телячью сыворотку и сыворотку крови крупного рогатого скота («БиолоТ», Россия); гентамицин (КРКА, Югославия); бромистый этидий и Hoechst 33258 (Serva, Германия); фенол, хлороформ, NaH₂PO₄, Na-хлорацетат, метанол, этанол, уксусную кислоту, глицерин, KCl, H₂O₂, NaOH и ортофосфорную кислоту (Россия); люминол, кумаровую кислоту, акриламид, дитиотреитол, Трис-гидроксиметиламинометан, глицин, MgCl₂, АТФ, додецилсульфат натрия, β-меркаптоэтанол, ортованадат натрия и Isolyte 3-10 (MP Biomedicals, США); диэтилмалеат, метилен-бис-акриламид, NaF, ЭДТА, аprotинин, леупептин, пепстатин, фенолметилсульфонилфторид, ТЕМЕД, персульфат аммония, мочевины, борную кислоту, tween-20, ацетат магния, бычий сывороточный альбумин, козьи антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, и козьи антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США); NaCl, ацетат натрия и β-глицерофосфат натрия (Merck, Германия); HEPES (Biochrom KG, Германия).

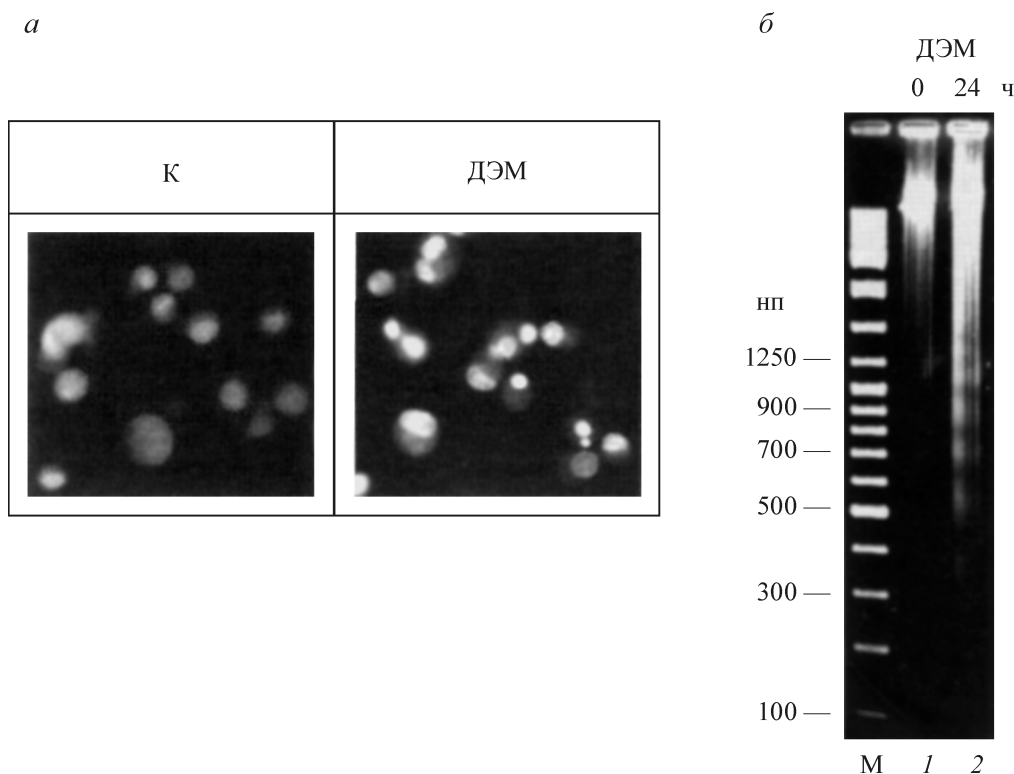


Рис. 1. Ядерная фрагментация и олигонуклеосомная фрагментация ДНК при действии диэтилмалеата (ДЭМ) на проэритролейкемические клетки человека K562.

Клетки (К) обрабатывали ДЭМ и через 24 ч окрашивали раствором Хёхста 33258, получали типичную картину фрагментации ядер (а); б — олигонуклеосомальная фрагментация ДНК. М — маркеры ДНК (Fermentas Life Sciences, Литва). 1 — ДНК контрольных клеток, 2 — ДНК из клеток, подвергнутых действию ДЭМ.

Fig. 1. Diethylmaleate induces apoptosis in K562 human chronic myelogenous leukemia cells. Fluorescent microscopy of K562 cell nuclei. а — nuclear staining assay. K562 cells were treated with 1 mM diethylmaleate (DEM) for 24 h, followed by measuring apoptotic nuclear changes (see «Materials and Methods»). б — DNA fragmentation assay. Exponentially grown K562 cells (0 h) were treated with 1 mM DEM for 24 h, followed by measuring apoptotic DNA ladder formation. M — molecular masses of DNA markers (Fermentas Life Sciences, Lithuania).

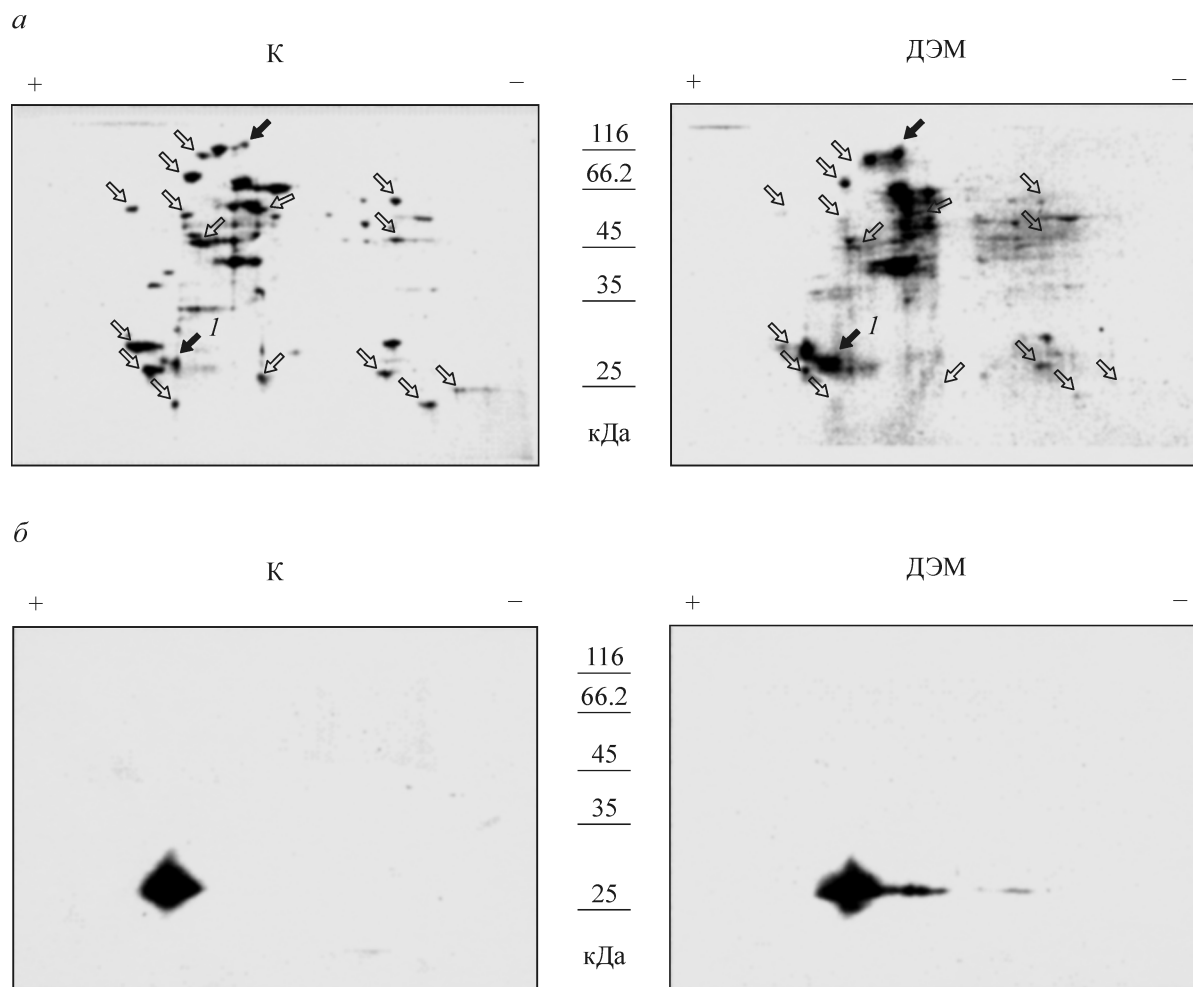


Рис. 2. Двухмерное электрофоретическое разделение субъединиц 26S протеасом, очищенных из цитоплазмы контрольных (К, слева) и обработанных ДЭМ (справа) клеток K562.

а — окраска геля Кумасси G-250. Черными стрелками указаны положения субъединиц протеасом, общее содержание которых увеличивается; белыми стрелками — субъединицы протеасом, содержание которых уменьшается. Положение zeta/ α 5-субъединицы протеасом обозначено черной стрелкой с цифрой 1. б — иммунохимическое выявление zeta/ α 5-субъединицы протеасом из контрольных и обработанных ДЭМ клеток.

Fig. 2. Isolated 26S proteasomes from the control K562 cells (to the left), and DEM treated K562 cells (to the right).

а — two-dimensional PAGE of 26S proteasomes purified from the cytoplasm of Coomassie blue stained K562 cells. Black arrows — position of subunits, whose contents increased, white arrows — position of subunits, whose contents were reduced. Markers of molecular weight of MBI Fermentas were used. б — Western blot of 26S proteasomes purified from the cytoplasm of K562 cells and probed with anti-zeta proteasomal subunit. Black arrow with number 1 — position of zeta subunit.

Результаты и обсуждение

Клетки проэритролейкемии человека линии K562, использованные нами в качестве модели, представляют собой прекрасную мишень для индуктора апоптоза диэтилмалеата (ДЭМ). Он вызывает фрагментацию ядер, которую наблюдали в клетках, окрашенных Hoechst 33258 (рис. 1, а). Олигонуклеосомную фрагментацию хроматина подтвердили с помощью электрофореза ДНК (рис. 1, б).

Для выяснения вопроса о том, происходят ли изменения субъединичного состава протеасом, их фосфорилирования и ферментативных активностей при индукции программированной гибели клеток K562, частицы выделяли из необработанных (контрольных) клеток K562 и из клеток, обработанных ДЭМ.

Для анализа изменения субъединичного состава протеасом под действием индуктора апоптоза препараты очищенных 26S-протеасом, выделенные из цитоплазмы

клеток K562, фракционировали при помощи метода двухмерного электрофореза белков. Как видно на рис. 2, а, после воздействия на клетки ДЭМ количество некоторых субъединиц в популяции протеасом, мигрирующих в электрофорезе с подвижностью, соответствующей белкам с мол. массами 20—30 и 45—80 кДа, значительно уменьшается (на рисунке отмечены черными стрелками), а содержание некоторых других субъединиц с относительными мол. массами 27, 40 и 90 кДа, напротив, увеличивается (на рисунке отмечены прозрачными стрелками). Полученные данные свидетельствуют о том, что протеасомы особым образом изменяются под действием индуктора апоптоза и что есть специфические субпопуляции протеасом, вовлеченные в реализацию программы клеточной гибели. Изолированный из данной клеточной линии (или ткани) материал очищенных протеасом всегда содержит в себе протеасомы различных субпопуляций. Гетерогенность субъединичного состава протеасом

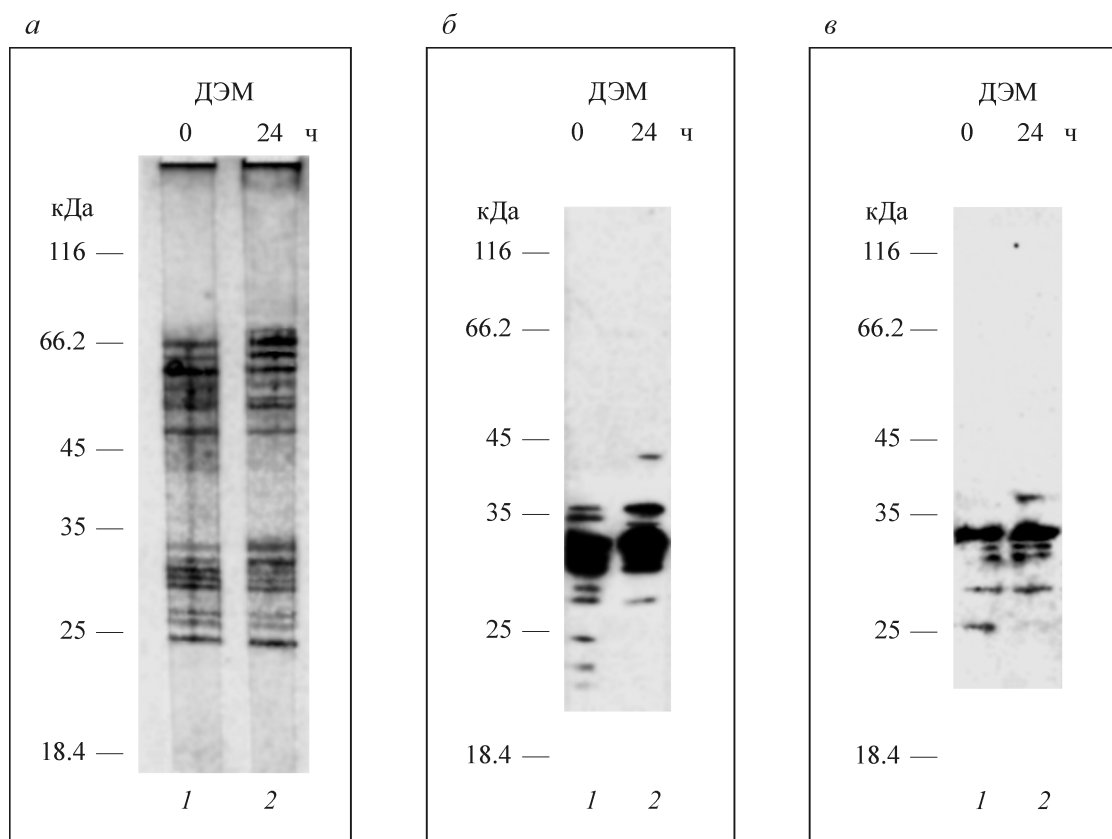


Рис. 3. Электрофоретическое разделение субъединиц 26S протеасом, очищенных из цитоплазмы контрольных (1) и обработанных ДЭМ (2) клеток K562, и сравнительный анализ субъединиц этих протеасом, фосфорилированных по треонину и тирозину.

Маркеры молекулярных масс были получены от MBI Fermentas (Литва). *а* — окраска геля Кумасси G-250; *б* — иммунохимическое выявление фосфорилированных по треонину субъединиц в составе очищенных цитоплазматических 26S протеасом; *в* — иммунохимическое выявление фосфорилированных по тирозину субъединиц в составе очищенных цитоплазматических 26S протеасом.

Fig. 3. PAGE of 26S proteasomes purified from the cytoplasm of control and apoptotic K562 cells, and Western blotting with anti-phosphothreonine and anti-phosphotyrosine antibodies. 26S proteasomes were isolated from control K562 cells (1) and from DEM treated K562 cells (2).

а — SDS-PAGE separation of 26S proteasomes, and Coomassie blue staining. *б* — Western blot of 26S proteasomes, and phosphothreonine staining. *On the left* — markers of molecular weight (Fermentas Life Sciences, Lithuania). *в* — Western blot of 26S proteasomes, and phosphotyrosine staining. *On the left* — markers of molecular weight (Fermentas Life Sciences, Lithuania).

в клетке обусловлена, например, замещением конститутивных субъединиц на индуцибельные под действием γ -интерферона с формированием «иммунопротеасомы» (Stohwasser et al., 2000; Rivett et al., 2001; Bose et al., 2004; Rivett, Hearn, 2004) или замещением на изоформы субъединиц в результате альтернативного сплайсинга (Dahlmann et al., 2001; Gille et al., 2003; Merforth et al., 2003; Wojcik, DeMartino, 2003). Кроме замещения субъединиц протеасомы могут модифицироваться и посттрансляционно, например путем фосфорилирования субъединиц (Mason et al., 1996; Bose et al., 1999, 2001, 2004; Iwafune et al., 2002; Bardag-Gorce et al., 2004; Fernandez Murtagy et al., 2004). Однако вопрос о том, происходят ли наблюдаемые изменения в субъединичном составе протеасом под действием индуктора апоптоза благодаря модификациям или изменениям экспрессии протеасомных субъединиц, еще подлежит дальнейшему исследованию.

Известно, что фосфорилирование субъединиц протеасом регулируется при изменении функционального состояния клеток (Bardag-Gorce et al., 2004). Для того чтобы оценить возможные изменения в фосфорилировании протеасомных субъединиц после индукции апоптоза,

протеасомы разделяли при помощи электрофореза и анализировали с помощью иммуноблоттинга с применением поликлональных антител против фосфотреонина и моноклональных антител против фосфотирозина. Как видно на рис. 3, в случае треонина ДЭМ вызывает дефосфорилирование некоторых субъединиц протеасом с мол. массами около 30, 29, 28, 27 и 25 кДа, что свидетельствует в пользу участия специфических фосфатаз в этом процессе. С другой стороны, наблюдаемое увеличение под действием ДЭМ степени фосфорилирования субъединиц по треонину с мол. массами около 33, 36 и 43 кДа предполагает вовлечение в процесс определенных протеинкиназ. Кроме того, степень фосфорилирования субъединиц протеасом с мол. массами в области 31—33 кДа не изменяется, и, вероятно, фосфорилирование или дефосфорилирование их не вовлечено в ДЭМ-индуцированный апоптоз клеток K562. Некоторые фосфорилированные по треонину субъединицы протеасом также фосфорилированы и по тирозину. Функциональный смысл этого явления еще предстоит исследовать. Так, наблюдаются фосфорилированные по тирозину несколько субъединиц в области 31—33 кДа и субъединица с мол. массой около

**Влияние диэтилмалеата (ДЭМ)
на протеолитическую активность 26S протеасом клеток
линии K562**

Субстрат	Гидролиз субстрата (ед. флуоресценции)		
	26S-протеасомы		26S-протеасомы, обработанные СIAP
	из контрольных клеток	из ДЭМ-индуцированных клеток	из контрольных клеток
Bz-Ala-Ala-Phe-NH-Mec	70.8±4.3	49.5±2.9	59.3±3.1

Примечание. Приведены средние значения и стандартные отклонения трех независимых определений флуоресценции освобожденного (7-амино)-4-метилкумарина. 100 ед. Флуоресценции соответствуют освобождению 50 пмоль продукта ((7-амино)-4-метилкумарина). Концентрация протеасом во всех пробах составляет 3 мкг.

27 кДа, причем степень их фосфорилированности под действием ДЭМ не изменяется. Кроме того, происходит дефосфорилирование субъединицы с мол. массой около 25 кДа и фосфорилирование субъединицы 37 кДа. Полученные нами данные об изменении фосфорилирования протеасом указывают на то, что такая модификация субъединиц определяет специфичность функций протеасом в апоптотических клетках K562.

Вызывая изменения в субъединичном составе и степени фосфорилирования цитоплазматических протеасом, ДЭМ, вероятно, определяет и их ферментативные активности. Было показано (Beyette et al., 1998), что в индуцированных дексаметазоном апоптотических тимочитах протеолитическая активность протеасом падает. Чтобы оценить влияние ДЭМ на протеолитическую активность протеасом, исследовали пептидил-глутамил-гидролазный тип пептидазной активности очищенных цитоплазматических 26S-протеасом. Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что при действии на клетки ДЭМ наблюдается снижение протеолитической активности протеасом. Однако в связи с гетерогенностью популяции протеасом в клетке уменьшенные активности суммарного количества выделенных протеасом не исключает увеличения активности какой-либо отдельной популяции протеасом после воздействия индуктора апоптоза.

Ранее нами было исследовано влияние ДЭМ на эндорибонуклеазную активность 26S-протеасом по отношению к рибосомным высокомолекулярным РНК клеток K562 (Токтарова и др., 2004). Для дальнейшего анализа влияния индуктора апоптоза на эндорибонуклеазную активность протеасом мы использовали в качестве субстрата индивидуальную информационную РНК *c-fos*. Для этого мРНК инкубировали с исследуемыми частицами. Электрофоретический анализ свидетельствует о том, что воздействие на клетки ДЭМ приводит к ингибированию РНКазной активности протеасом по отношению к мРНК *c-fos* (рис. 4). Это позволяет сделать предположение о вовлечении протеасом в регуляцию стабильности специфических информационных РНК в индуцированных к апоптозу клетках K562.

Из литературных источников (Petit et al., 1997b) известно, что две субъединицы α -типа в составе протеасом

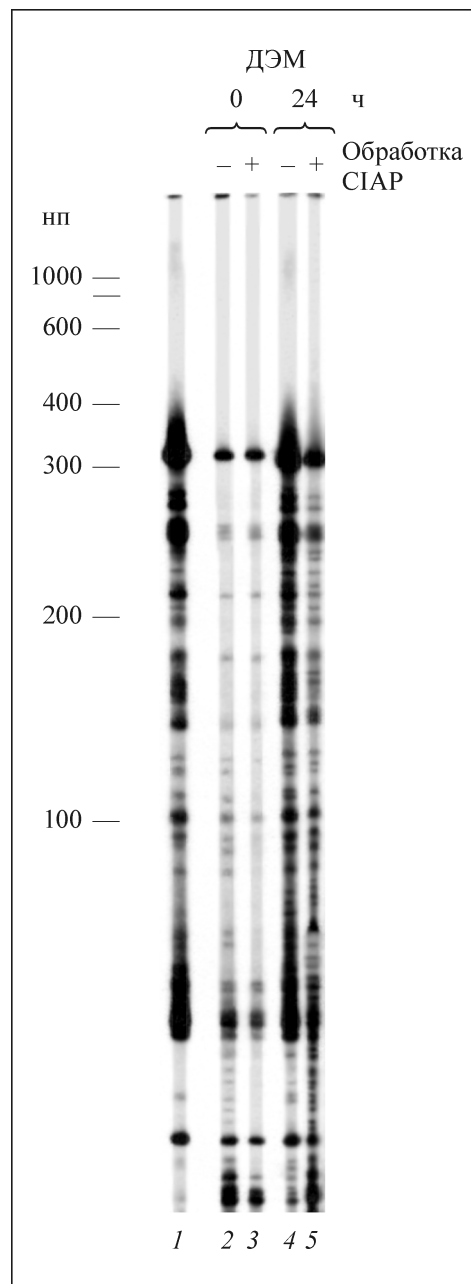


Рис. 4. Радиоавтографы электрофореграмм транскрибированной *in vitro* мРНК *c-fos*, меченной [α - 32 P] ЦТФ, обработанной 26S-протеасомами, очищенными из цитоплазмы контрольных и обработанных ДЭМ клеток K562.

1 — необработанная РНК; 2 — РНК, обработанная протеасомами из контрольных клеток; 3 — РНК, обработанная протеасомами из контрольных клеток, но предварительно дефосфорилированными щелочной фосфатазой; 4 — РНК, обработанная протеасомами из обработанных ДЭМ клеток; 5 — РНК, обработанная протеасомами из обработанных ДЭМ клеток, но предварительно дефосфорилированными щелочной фосфатазой.

Fig. 4. Electrophoregrams of [α - 32 P] CTP-labeled *in vitro* transcribed mRNAs (3'UTR of *c-fos*) treated with 26S proteasomes purified from the cytoplasm of control and apoptotic K562 cells.

In order to assay the specificity of RNase activity of 26S proteasomes and the effect of the inductor of apoptosis on this activity, [α - 32 P] CTP-labeled 3'UTR *c-fos* mRNA fragment was incubated with 26S proteasomes and separated by 5% PAGE. The *in vitro* transcribed mRNA, incubated under the same conditions, was used as a control (1). The *in vitro* transcribed mRNA was incubated with 26S proteasomes isolated from control K562 (2), with the same proteasomes pretreated with CIAP (3), with 26S proteasomes isolated from DEM treated K562 cells (4), and with the same proteasomes pretreated with CIAP (5).

ответственны за их рибонуклеазную активность. Причем одна из этих двух субъединиц — zeta/ α 5. Нами было показано выше (рис. 4) и ранее (Токтарова и др., 2004), что индукция апоптоза ДЭМ избирательно изменяла РНКазную активность протеасом, и, возможно, один из механизмов контроля нуклеазной активности протеасом заключается именно в модификации субъединиц, ассоциированных с этой активностью. Результат иммуноблоттинга показал, что протеасомная субъединица zeta/ α 5 претерпевает значительные модификации после воздействия ДЭМ на клетки K562 (рис. 2, б). Однако природу и характер таких модификаций еще предстоит исследовать.

Для решения вопроса о возможных механизмах регуляции эндорибонуклеазной активности протеасом мы исследовали влияние дефосфорилирования субъединиц протеасом на их активность. В ряде работ (Mason et al., 1996; Iwafune et al., 2002) уже было показано, что дефосфорилирование протеасомных субъединиц приводит к изменению их пептидазных активностей. Результаты, представленные в таблице, подтверждают этот факт и демонстрируют снижение пептидазной активности протеасом, выделенных из контрольных клеток, после обработки их с помощью щелочной фосфатазы из кишечника теленка. Более того, нами было показано влияние дефосфорилирования протеасом на их РНКазную активность по отношению к высокомолекулярной рибосомной РНК (Токтарова и др., 2004). В настоящей работе мы также исследовали этот вопрос, но уже по отношению к индивидуальной мРНК. Оказалось, что предварительная обработка протеасом щелочной фосфатазой не оказывает влияния на РНКазную активность протеасом из контрольных клеток K562 по отношению к мРНК *c-fos*, но стимулирует нуклеолиз этой РНК (*c-fos*) протеасомами из индуцированных клеток (рис. 4). Исходя из этого можно предположить, что фосфорилирование определенных субъединиц протеасом под действием ДЭМ может ингибировать нуклеолиз некоторых молекул РНК (как в случае с *c-fos*). Эти результаты свидетельствуют о том, что степень фосфорилирования субъединиц протеасом оказывает влияние на рибонуклеазные центры протеасом и что изменение фосфорилирования субъединиц может являться механизмом контроля деградации РНК протеасомами при индукции апоптоза.

Ранее делались попытки исследовать протеасомы при индукции апоптоза, однако такие исследования касались только изучения изменений субъединичного состава и протеолитической активности протеасом и только в нормальных (а не быстро пролиферирующих) клетках (Beyette et al., 1998; Low et al., 2000, 2001). В настоящей работе впервые обнаружены изменения фосфорилирования субъединиц протеасом при индукции программированной клеточной гибели. Кроме того, впервые получены результаты, свидетельствующие об изменении состава и активностей протеасом в индуцированных к апоптозу клетках опухолевого происхождения.

Авторы выражают глубокую признательность научным сотрудникам Института цитологии РАН К. К. Туроверову и И. М. Кузнецовой за измерения флуоресценции на оборудовании Центра коллективного пользования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Росийского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-49606 и 2231.2003.4) и С.-Петербургского научного центра (2005 г.).

Список литературы

- Галкин В. Э., Туроверова Л. В., Константинова И. М., Пинаев Г. П. 1998. 26S-комплекс (26S-протеасома) непосредственно взаимодействует с фибриллярным актином. Цитология. 40 (7) : 618—626.
- Евтеева И. Н., Куличкова В. А., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Миттенберг А. Г., Тесленко Л. В., Обухова А. Д., Пенныйнен В. А., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2000. Новая эндорибонуклеазная активность 26S-протеасом из клеток линии А-241. Цитология. 42 (7) : 675—680.
- Евтеева И. Н., Куличкова В. А., Обухова А. Д., Миттенберг А. Г., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Токтарова М. В., Тесленко Л. В., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2003. Регуляция ЭФР эндорибонуклеазной активности 26S-протеасом в клетках линии А-431: возможное участие протеасом в контроле над стабильностью РНК эпидермальным фактором роста. Цитология. 45 (5) : 488—492.
- Миттенберг А. Г., Куличкова В. А., Медведева Н. Д., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Константинова И. М. 2002а. Характеристики эндорибонуклеазной активности протеасом из клеток линии K562. II. Анализ нуклеолиза специфических мРНК протеасомами. Цитология. 44 (4) : 357—363.
- Миттенберг А. Г., Куличкова В. А., Медведева Н. Д., Пенныйнен В. А., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2002б. Характеристики эндорибонуклеазной активности протеасом из клеток линии K562. I. Зависимость РНКазной активности протеасом и α -РНП от условий реакции эндонуклеолиза. Цитология. 44 (2) : 181—187.
- Токтарова М. В., Куличкова В. А., Миттенберг А. Г., Кожухарова И. В., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Пешехонов А. В., Игнатова Т. Н., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2004. Дифференциальная регуляция эндорибонуклеазной активности 26S-протеасом и α -РНП частот при действии индукторов апоптоза на клетки линии K562: участие α -РНП-частиц и протеасом в контроле над стабильностью РНК при программированной клеточной гибели. Цитология. 46 (3) : 283—290.
- Туроверов К. К., Бикташев А. Г., Дорофенюк А. В., Кузнецова И. М. 1998. Комплекс аппаратных и программных средств для измерения спектральных и поляризационных кинетических характеристик флуоресценции в растворе. Цитология. 40 (8/9) : 806—814.
- Bajorek M., Glickman M. H. 2004. Keepers at the final gates: regulatory complexes and gating of the proteasome channel. Cell Mol. Life Sci. 61 : 1579—1588.
- Ballut L., Petit F., Mouzeeyar S., Le Gall O., Candresse T., Schmid P., Nicolas P., Badaoui S. 2003. Biochemical identification of proteasome-associated endonuclease activity in sunflower. Biochim. biophys. acta. 1645 : 30—39.
- Bandyopadhyay G., Biswas T., Roy K. C., Mandal S., Mandal C., Pal B. C., Bhattacharya S., Rakshit S., Bhattacharya D. K., Chaudhuri U., Konar A., Bandyopadhyay S. 2004. Chlorogenic acid inhibits Bcr-Abl tyrosine kinase and triggers p38 mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in chronic myelogenous leukemic cells. Blood. 104 : 2514—2522.
- Bardag-Gorce F., Venkatesh R., Li J., French B. A., French S. W. 2004. Hyperphosphorylation of rat liver proteasome subunits: the effects of ethanol and okadaic acid are compared. Life Sci. 75 : 585—597.
- Barret A. J. 1980. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. Biochem. J. 187 : 909—912.
- Beyette J., Mason G., Murray R., Cohen G., Rivett J. 1998. Proteasome activities decrease during dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes. Biochem. J. 332 : 315—320.
- Bose S., Brooks P., Mason G. G., Rivett A. J. 2001. α -Interferon decreases the level of 26S proteasomes and changes the pattern of phosphorylation. Biochem. J. 353 : 291—297.
- Bose S., Mason G. G., Rivett A. J. 1999. Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Mol. Biol. Rep. 26 : 11—14.
- Bose S., Stratford F. L., Broadfoot K. I., Mason G. G., Rivett A. J. 2004. Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit

- C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem. J.* 378 : 177—184.
- Castelli J. C., Hassel B. A., Maran A., Paranjape J., Hewitt J. A., Li X. L., Hsu Y. T., Silverman R. H., Youle R. J. 1998. The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ.* 5 : 313—320.
- Chen W. J., Lin J. K. 2004. Induction of G1 arrest and apoptosis in human Jurkat T cells by pentagalloylglucose through inhibiting proteasome activity and elevating p27Kip1, p21Cip1/WAF1, and Bax proteins. *J. Biol. Chem.* 279 : 13 496—13 505.
- Claverol S., Burlet-Schiltz O., Girbal-Neuhausser E., Gairrin J. E., Monsarrat B. 2002. Mapping and structural dissection of human 20S proteasome using proteomic approaches. *Mol. Cell Proteomics.* 1 : 567—578.
- Contri A., Brunati A. M., Trentin L., Cabrelle A., Miorin M., Cesaro L., Pinna L. A., Zambello R., Semenzato G., Donella-Deana A. 2005. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J. Clin. Invest.* 115 : 369—378.
- Coux O., Tanaka K., Goldberg A. L. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65 : 801—847.
- Dahlmann B., Ruppert T., Kloetzel P. M., Kuehn L. 2001. Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie.* 83 : 295—299.
- Dou Q. P., McGuire T. F., Peng Y., An B. 1999. Proteasome inhibition leads to significant reduction of Bcr-Abl expression and subsequent induction of apoptosis in K562 human chronic myelogenous leukemia cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289 : 781—790.
- Earnshaw W. C. 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 : 337—343.
- Fernandez Murray P., Biscoglio M. J., Passeron S. 2002. *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of *Candida albicans* 20S proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 404 : 116—125.
- Gille C., Goede A., Schloetelburg C., Preissner R., Kloetzel P. M., Gobel U. B., Frommel C. 2003. A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. *J. Mol. Biol.* 326 : 1437—1448.
- Glickman M. H., Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82 : 273—428.
- Glickman M. H., Rubin D. W., Fried V. A., Finley D. 1998. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 18 : 3149—3162.
- Grimm L. M., Goldberg A. L., Poirier G. G., Schwartz L. M., Osborne B. A. 1996. Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* 15 : 3835—3844.
- Groll M., Ditzel L., Lowe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H. D., Huber R. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 386 : 463—471.
- Hough R., Pratt G., Rechsteiner M. 1987. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 262 : 8303—8313.
- Iwafune Y., Kawasaki H., Hirano H. 2002. Electrophoretic analysis of phosphorylation of the yeast 20S proteasome. *Electrophoresis.* 23 : 329—338.
- Jarrousse A. S., Petit F., Kreutzer-Schmid K., Gaedigk R., Schmid H. P. 1999. Possible involvement of proteasomes (prosome) in AUUUA-mediated mRNA decay. *J. Biol. Chem.* 274 : 22 023—22 028.
- Jin Z. H., Kurosu T., Yamaguchi M., Arai A., Miura O. 2005. Hematopoietic cytokines enhance Chk1-dependent G2/M checkpoint activation by etoposide through the Akt/GSK3 pathway to inhibit apoptosis. *Oncogene.* 24 : 1973—1981.
- Kimura Y., Takaoka M., Tanaka S. et al. 2000. N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20S proteasome. *J. Biol. Chem.* 275 : 4635—4639.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.
- Lopes U. G., Erhardt P., Yao R., Cooper G. M. 1997. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J. Biol. Chem.* 272 : 12 893—12 896.
- Low P., Hastings R. A., Dawson S. P., Sass M., Billett M. A., Mayer R. J., Reynolds S. E. 2000. Localisation of 26S proteasomes with different subunit composition in insect muscles undergoing programmed cell death. *Cell Death Differ.* 7 : 1210—1217.
- Low P., Reynolds S. E., Sass M. 2001. Proteolytic activity of 26S proteasomes isolated from muscles of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: differences between surviving muscles and those undergoing developmentally programmed cell death. *Acta Biol. Hung.* 52 : 435—442.
- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. In: Gel electrophoresis. New York: Cold Spring Harbor Lab. 150—162.
- Maniatis T., Jeffrey A., van deSande H. 1975. Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry.* 14 : 3787—3794.
- Martin S. J., Green D. R. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell.* 82 : 349—352.
- Mason G. G., Hendil K. B., Rivett A. J. 1996. Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Identification of two phosphorylated subunits and the effect of phosphorylation on activity. *Eur. J. Biochem.* 238 : 453—462.
- Merforth S., Kuehn L., Osmers A., Dahlmann B. 2003. Alteration of 20S proteasome-subtypes and proteasome activator PA28 in skeletal muscle of rat after induction of diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 : 740—748.
- Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 16 : 1215—1219.
- Naujokat C., Hoffmann S. 2002. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab. Invest.* 82 : 965—980.
- O'Farrell P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 : 4007—4021.
- Petit F., Jarrousse A. S., Boissonnet G., Dadet M. H., Buri J., Briand Y., Schmid H. P. 1997a. Proteasome (prosome) associated endonuclease activity. *Mol. Biol. Rep.* 24 : 113—117.
- Petit F., Jarrousse A. S., Dahlmann B., Sobek A., Hendil K. B., Buri J., Briand Y., Schmid H. P. 1997b. Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation. *Biochem. J.* 325 : 93—98.
- Rivett A. J., Bose S., Brooks P., Broadfoot K. I. 2001. Regulation of proteasome complexes by gamma-interferon and phosphorylation. *Biochimie.* 83 : 363—366.
- Rivett A. J., Hearn A. R. 2004. Proteasome function in antigen presentation: immunoproteasome complexes, peptide production, and interactions with viral proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5 : 153—161.
- Sabatini N., Di Pietro R., Rapino M., Sancilio S., Comani S., Cataldi A. 2004. PI-3-kinase/NE-kappaB mediated response of Jurkat T leukemic cells to two different chemotherapeutic drugs, etoposide and TRAIL. *J. Cell Biochem.* 93 : 301—311.
- Shchors K., Yehiely F., Kular R. K., Kotlo K. U., Brewer G., Deiss L. P. 2002. Cell death inhibiting RNA (CDIR) derived from a 3'-untranslated region binds. AUF1 and heat shock protein 27. *J. Biol. Chem.* 277 : 47 061—47 072.
- Stohwasser R., Giesebrecht J., Kraft R., Muller E. C., Hausler K. G., Kettenmann H., Hanisch U. K., Kloetzel P. M. 2000. Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia: induction of immunoproteasomes by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Glia.* 29 : 355—365.
- Tourriere H., Chebli K., Tazi J. 2002. mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie.* 84 : 821—837.
- Wang L., Chen L., Benincosa J., Fortney J., Gibson L. F. 2005. VEGF-induced phosphorylation of Bcl-2 influences B lineage leukemic cell response to apoptotic stimuli. *Leukemia.* 19 : 344—353.
- Wojcik C., DeMartino G. N. 2003. Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 : 579—589.

SPECIFICITY OF CHANGES IN PROTEASOME PROPERTIES
IN DIETHYLMALEATE-INDUCED K562 CELLS

A. S. Tsimokha,¹ * A. G. Mittenberg,¹ V. A. Kulichkova,¹ I. N. Evteeva,¹ Yu. Ya. Vatazhok,¹ T. N. Moiseeva,¹
Yu. B. Ermolaeva,¹ E. S. Vashukova,¹ I. V. Volkova,¹ I. V. Kojukharova,¹ L. N. Gause,² I. M. Konstantinova¹

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and
² Koltsov Institute of Development Biology RAS, Moscow;
* e-mail: atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru

The participation of proteasome in the programmed cells death is now extensively investigated. Studies using selective inhibitors of proteasomes have provided a direct evidence of both pro- and anti-apoptotic functions of proteasomes. Such opposite roles of 26S proteasomes in regulation of apoptosis may be defined by the proliferative state of cell. The induction of apoptosis in K562 cells by diethylmaleate was used as a model to investigate changes in the subunit composition, phosphorylation state and enzymatic activities of 26S proteasomes undergoing the programmed cell death. Here we have shown that proteasomes isolated from the cytoplasm of control and diethylmaleate treated K562 cells differ in their subunit patterns, as well as in the phosphorylation state of subunits on threonine and tyrosine residues. It has been shown for the first time that proteolytic activity of 26S proteasomes is decreased, and endoribonuclease activity of 26S proteasomes is affected under diethylmaleate action on K562 cells. Treatment of K562 cells with an inducer of apoptosis — diethylmaleate — leads to modification of a proteasomal subunit ($\zeta/\alpha 5$) associated with RNase activity of proteasomes. These data suggest the subunit composition and enzymatic activities of 26S proteasomes to be changed in K562 cells undergoing apoptosis, and that specific subtypes of 26S proteasomes participate in execution of programmed death of these cells.

Key words: apoptosis, diethylmaleate, K562 cells, mRNA stability, phosphorylation, proteasomes, ribonucleases, threonine, tyrosine.