

ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ЯДЕРНЫХ ПРОТЕАСОМ ПРИ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ K562. I. ВОЗДЕЙСТВИЕ ГЛУТАТИОНИСТОЩАЮЩЕГО АГЕНТА ДИЭТИЛМАЛЕАТА

© A. С. Цимоха,^{1,*} A. Г. Миттенберг,¹ В. А. Куличкова,¹ Ю. Я. Ватажок,¹ Т. Н. Моисеева,¹
И. Н. Евтеева,¹ Ю. Б. Ермолаева,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 настоящей работе рассмотрены изменения субъединичного состава ядерных 26S-протеасом, их статуса фосфорилирования, а также ферментативных активностей, происходящие при индукции программируемой клеточной гибели. Апоптоз в клетках линии K562 индуцировали глутатионистощающим агентом диэтилмалеатом. Показано, что протеасомы, выделенные из ядер контрольных и индуцированных клеток K562, различаются по субъединичному составу, а также по фосфорилированию субъединиц по треонину и тирозину. Обнаружено, что под действием диэтилмалеата наблюдается изменение соотношения трипсин- и химотрипсин-подобных типов протеолитической активности протеасом. Кроме того, после воздействия на клетки этого индуктора апоптоза изменяется эндогенонуклеазная активность протеасом по отношению к мРНК *c-fos* и *c-myc*. Нами выявлено, что индукция диэтилмалеатом апоптоза в клетках K562 вызывает модификации ассоциированных с РНКазой активностью протеасомных субъединиц *zeta/alpha5* и *iota/alpha6*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу изменений субъединичного состава, ферментативных активностей и статуса фосфорилирования, т. е. о перепрограммировании популяции ядерных протеасом при индукции апоптоза в клетках K562.

Ключевые слова: апоптоз, диэтилмалеат, ядерные протеасомы, протеолитическая активность, эндогенонуклеазная активность, тирозин, треонин, фосфорилирование.

Принятые сокращения: ДЭМ — диэтилмалеат, ПААГ — полиакриламидный гель, СИАР — щелочная фосфатаза из кишечника теленка, DTT — дитиотреитол, EDTA — этилендиаминтетрауксусная кислота, PMSF — фенилметилсульфонилфторид.

Ликвидируя отдельные клетки ради спасения всего организма, апоптоз контролирует надлежащее развитие организма (предотвращая появление аутоиммунных клонов Т-клеток и пролиферацию клеток с поврежденной ДНК) и составляет одну из первых линий обороны в борьбе с канцерогенезом. Молекулярные механизмы, действующие в этом процессе, до сих пор окончательно не выявлены, однако за последние 10 лет исследования апоптотических путей сильно продвинулись. Несмотря на изобилие разнообразных проапоптотических стимулов, выполнение программы клеточной гибели включает в себя общую стадию, состоящую в активации каспаз (семейство цитоплазматических цистеиновых протеаз, которые расщепляют белковый субстрат после остатков аспартата). Протеолиз, обеспеченный действием каспаз, выборочно инактивируя одни белки, в то же время активирует другие, что в свою очередь приводит к фенотипическим изменениям, характерным для апоптотических клеток. Поэтому апоптоз можно отнести к биохимическим путям, запускаемым в клетке специфическим цитоплазматическим протеолизом (Wojcik, 2002).

Регулируемый (нелизосомный) цитоплазматический протеолиз влияет на множественные биохимические пути в клетке (Mayer, 2000). Причем каспазы составляют, скорее, исключение из правил, так как в основном регулируемый протеолиз в цитоплазме осуществляется 26S-протеасомой, огромным мультикаталитическим комплексом, который некоторые авторы по ошибке считают органеллой (Rubin, Finley, 1995). Протеасомы участвуют во множестве клеточных процессов, селективно деградируя специфические регуляторные белки (Rock et al., 1994). Мутации дрожжей, приводящие к потере функций протеасом, летальны (Hochstrasser et al., 1999), что в принципе весьма ожидаемо, учитывая всю значимость убиквитин- и протеасомависимого протеолитических путей. Элиминация активности протеасом у млекопитающих достигается с помощью различных протеасомных ингибиторов. Однако дальнейшие исследования с использованием таких ингибиторов указывают на тот поразительный факт, что при некоторых обстоятельствах подавление активности протеасом в клетках млекопитающих, напротив, может привести к полностью противоположному эффекту, т. е. генерированию сигнала выжи-

вания клетки (Grimm, Osborne, 1999). Такое проапоптозное и антиапоптозное функционирование протеасом, по-видимому, обусловлено пролиферативным статусом клетки (Naujokat, Hoffmann, 2002; Wojcik, DeMartino, 2003).

В настоящее время известно, что в клетке популяция протеасом гетерогенна (Merforth et al., 2003). Множественность видов протеасом, по-видимому, определяется широким спектром клеточных процессов, протекающих с их участием. Предположив, что при выполнении апоптотической программы в клетке действуют специфические субпопуляции протеасом, мы исследовали изменения, происходящие с цитоплазматическими протеасомами при индукции апоптоза в клетках K562 диэтилмалеатом (ДЭМ) (Токтарова и др., 2004; Цимоха и др., 2006; Миттенберг и др., 2007). Оказалось, что при воздействии этого индуктора ингибируются РНКазная активность цитоплазматических протеасом по отношению к суммарной клеточной РНК и их химотрипсин-подобная протеолитическая активность. Кроме того, индуцированный ДЭМ каскад апоптотических событий оказывает дифференциальное влияние на способность протеасом к нуклеолизу различных видов мРНК (*c-fos*, *c-myc* и *p53*), т. е. на специфичность РНКазной активности (Цимоха и др., 2006; Миттенберг и др., 2007). Предполагается, что эти изменения обусловлены изменением субъединичного состава протеасом и(или) модификациями тех субъединиц, которые ответственны за ту или иную активность. Так, мы выявили, что при ДЭМ-индуцированном апоптозе происходит модификация субъединицы протеасом $\alpha 5$, ассоциированной с РНКазной активностью (Цимоха и др., 2006). Однако исследований в отношении ядерных протеасом при апоптозе еще не проводили.

Поэтому задачей настоящей работы являлось исследование изменений субъединичного состава и статуса фосфорилирования протеасом под действием индуктора апоптоза ДЭМ. Объектом служили протеасомы, выделенные из ядер клеток проэритролейкемии человека линии K562. Мы также оценивали влияние данного агента на трипсин- и химотрипсин-подобные типы протеолитической активности протеасом и нуклеолиз этими частями индивидуальных мРНК (*c-fos* и *c-myc*). Кроме того, предполагая возможность регуляции активностей протеасом при помощи фосфорилирования (дефосфорилирования) их субъединиц, мы проанализировали влияние неспецифической фосфатазы на ферментативные активности исследуемых комплексов.

Материал и методика

Клетки проэритролейкемии человека линии K562, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН), культивировали при 37 °C в среде RPMI 1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, в присутствии 0.004 % гентамицина. Для индукции программирующей клеточной гибели в культуральную жидкость добавляли ДЭМ до конечной концентрации 1 mM и инкубировали клетки в течение 24 ч (Castelli et al., 1998). Индукцию апоптоза оценивали по изменению морфологии ядер и по межнуклеосомной фрагментации ДНК (Miller et al., 1988).

Транскрипция *in vitro*. Фрагмент 3'-нетранслируемой области мРНК *c-myc* был получен в результате

транскрипции *in vitro* в системе вектора pGEM, в который была вставлена 3'-нетранслируемая последовательность мРНК *c-myc* человека. Для получения смысловой последовательности плазмиду линеаризовали с помощью рестриктазы BamHI и транскрибировали РНК-полимеразой фага SP6 согласно инструкциям фирмы-изготовителя (Fermentas Life Sciences, Литва). Транскрипцию вели в присутствии [α^{32} P] ЦТФ в течение 2 ч при 37 °C. Последовательность, содержащую 3'-нетранслируемую область мРНК *c-fos*, получали в результате транскрипции *in vitro* в системе вектора pGEM с использованием рестриктазы EcoRI и РНК-полимеразы фага SP6. Транскрибированную РНК обрабатывали ДНКазой I и очищали депротеинизацией с помощью смеси фенол—хлороформ.

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

Ядерные 26S-протеасомы выделяли из ядерных экстрактов (Digman et al., 1983) с помощью ультраконцентрифугирования в градиенте концентрации сахарозы (15—30 %) и ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 (Hough et al., 1987).

Пептидазную активность протеасом трипсин-подобного типа определяли по гидролизу флуорогенного пептида Bz-DL-Arg-AMC (Bachem, Швейцария), а химотрипсин-подобного типа — по Bz-Ala-Ala-Phe-AMC (Bachem, Швейцария). Для этого 0.05 мкмоль субстрата инкубировали с 5 мкг протеасом в течение 45 мин при 37 °C в буферном растворе, содержащем 50 mM Трис-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM DTT и 5 mM АТФ. Реакцию останавливали, добавляя равный объем смеси 70 mM уксусной кислоты, 100 mM хлорacetата натрия и 30 mM ацетата натрия (Barret, 1980). Концентрацию продукта гидролиза (7-амино-4-метилкумарина) определяли на флуориметре (Туроверов и др., 1998), измеряя экстинкцию и эмиссию при длинах волн 365 и 440 nm соответственно (Barret, 1980).

Для дефосфорилирования протеасомы обрабатывали щелочной фосфатазой кишечника теленка (CIAP; Fermentas Life Sciences, Латвия): 2 ед. на 1 мкг белка в течение 1 ч при 37 °C в 10 mM Трис-HCl-буферном растворе, pH 7.5, содержащем 10 mM MgCl₂.

Обработку РНК с помощью протеасом проводили в течение 30 мин при 37 °C в буферном растворе, содержащем 20 mM HEPES, pH 7.6, 50 mM KCl, 0.1 mM ЭДТА, 10 % глицерина, 1 mM АТФ, 0.5 mM PMSF и 2 mM DTT.

Двухмерный электрофорез белков протеасом проводили в соответствии с описанной методикой (O'Farrell, 1975). В первом направлении ПААГ содержал амфолины pH 3—10. Во втором направлении (после изоэлектрического фокусирования) субъединицы протеасом фракционировали по молекулярным массам в денатурирующем 12%-ном ПААГ (Laemmli, 1970).

Вестерн-блотинг белков протеасом с применением вторичных антител, коньюгированных с пероксидазой хрена, выполняли, следуя рекомендациям фирмы Sigma (США). Пероксидазу выявляли с помощью реактивов ECL (ICN, США). Протеасомы фракционировали на белковые субъединицы в денатурирующем 10 или 12%-ном ПААГ (Laemmli, 1970). Полученные фракции электрофоретически переносили на нитроцеллюлозные фильтры (Hybond C extra, Amersham) в буферном рас-

творе Т (25 мМ Трис-HCl, 190 мМ глицина, 0.05 % додецилсульфата натрия и 20 % метанола, pH 7.3). Мембрану отмывали в буферном растворе TBS (10 мМ Трис-HCl, pH 7.5 и 150 мМ NaCl) и блокировали центры неспецифического связывания антител 5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина или обезжиренного молока в этом же буферном растворе. Избыток блокирующего агента отмывали TBS и мембрану инкубировали с поликлональными антителами против фосфотреонина (Cell Signaling, США), с моноклональными антителами против фосфотирозина (Cell Signaling, США) или с антителами против субъединиц протеасом $\alpha 5$ (zeta) и $\alpha 6$ (iota) (Biomol International LP, Англия).

Реактивы. В работе использовали среду RPMI 1640, глутамин, эмбриональную телячью сыворотку и сыворотку крови крупного рогатого скота (БиоЛоТ, Россия); гентамицин (КРКА, Югославия); бромистый этийд и краситель Hoechst 33258 (Serva, Германия); фенол, хлороформ, Na-хлорацетат, метanol, 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, ЭДТА, фенилметилсульфонилфторид, ТЕМЕД, персульфат аммония, мочевину, борную кислоту, Tween-20, ацетат магния, бычий сывороточный альбумин, козы антитела против иммуноглобулинов мыши, коньюгированные с пероксидазой хрена, и козы антитела против иммуноглобулинов кролика, коньюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США); NaCl и ацетат натрия (Merck, Германия).

Результаты

В настоящей работе была использована модель индукции апоптоза в клетках проэрритролейкемии человека линии K562 с помощью ДЭМ, поскольку ранее мы уже показали, что эта клеточная линия представляет собой прекрасную мишень для индукторов апоптоза (Токтарова и др., 2004; Цимоха и др., 2006).

При индукции программируемой клеточной гибели ДЭМ в клетках K562 цитоплазматические 26S-протеасомы претерпевают ряд изменений, которые, в частности, затрагивают их субъединичный состав и ферментативные функции (Цимоха и др., 2006). Чтобы исследовать возможные изменения субъединичного состава ядерных 26S-протеасом, их фосфорилирования и ферментативных активностей при индукции апоптоза в клетках K562, частицы выделяли из необработанных (контрольных) клеток K562 и из клеток, обработанных ДЭМ. Как видно на рис. 1, *a* (черные стрелки), после воздействия на клетки ДЭМ количество некоторых субъединиц в популяции протеасом, мигрирующих в электрофорезе с по-движностью, соответствующей белкам в области мол. масс 25—28 и 45—95 кДа, уменьшается, а содержание некоторых других субъединиц с относительными мол. массами 29, 33, 40, 43 и 95—100 кДа, напротив, увеличивается (рис. 1, *a*, белые стрелки). Наблюдая изменения субъединичного состава протеасом, можно предположить, что в процесс выполнения программы клеточной гибели вовлечена специфическая субпопуляция протеасом.

Поскольку ферментативная активность протеасом регулируется как конформационными изменениями комплексов, так и заменой и модификациями самих субъединиц, ответственных за эту активность, наблюдаемые различия в субъединичном составе ядерных протеасом при действии на клетки ДЭМ позволяют считать, что в ответ на индукцию апоптоза в клетке происходит изменение и ферментативных активностей 26S-комплексов.

Мы исследовали влияние ДЭМ на трипсин- и химотрипсин-подобные типы протеолитической активности ядерных протеасом из клеток K562. Как видно на рис. 2, обработка клеток ДЭМ приводит к пятикратной активации трипсиновой и усилиению на 38 % химотрипсиновой активности 26S-протеасом из ядер клеток K562.

Ранее нами было исследовано влияние ДЭМ на эндорибонуклеазную активность 26S-протеасом по отношению к рибосомным высокомолекулярным РНК клеток K562 (Токтарова и др., 2004). Кроме того, есть данные о селективном влиянии ДЭМ на нуклеолиз индивидуальных информационных РНК *c-fos*, *c-myc* и *p53* цитоплазматическими протеасомами (Цимоха и др., 2006; Миттенберг и др., 2007). Для выяснения вопроса о том, изменяется ли специфичность РНКазной активности ядерных 26S-протеасом при индукции программированной гибели клеток K562, исследовали нуклеолиз транскрибированных *in vitro* индивидуальных информационных РНК *c-fos* и *c-myc*. При использовании ингибиторов протеасом было показано, что продуктыprotoонкогенов *c-fos* и *c-myc*, транскрипционные факторы c-Fos и c-Myc, разрушаются по убиквитин-протеасомному пути (Cohen, Curran, 1989; Salghetti et al., 1999; Wojcik, 2002). Выбор нами этих субстратов был обусловлен также и тем, что они содержат AU-богатые последовательности, а из литературы известно, что AUUUA-повторы являются сигналом для деградации РНК протеасомами (Jarrousse et al., 1999; Gautier-Bert et al., 2003).

Электрофоретический анализ показал, что после воздействия ДЭМ на клетки происходит ингибирование РНКазной активности протеасом по отношению к мРНК *c-fos* (рис. 3, *b*, 2, 4), в то время как в случае расщепления протеасомами мРНК *c-myc* наблюдается обратный эффект (рис. 3, *a*, 2, 4). Итак, при индукции апоптоза ДЭМ изменяется специфичность эндорибонуклеазной активности не только цитоплазматических 26S-протеасом, как показано ранее (Миттенберг и др., 2007), но и ядерных по отношению к мРНК *c-fos* и *c-myc*. По-видимому, наблюдаемые изменения специфичности РНКазы протеасом связаны с дифференциальной регуляцией активности разных ферментативных центров исследуемых частиц.

Известно, что за эндорибонуклеазную активность протеасом ответственны две субъединицы α -типа, а именно ζ (zeta, или $\alpha 5$) и ι (iota, или $\alpha 6$) (Petit et al., 1997). Ранее нами было показано, что при индукции апоптоза ДЭМ происходит изменение эндорибонуклеазной активности протеасом как по отношению к суммарной клеточной РНК (Токтарова и др., 2004), так и по отношению к индивидуальным специфическим мРНК *c-fos*, *c-myc* и *p53* (Цимоха и др., 2006; Миттенберг и др., 2007). Можно предположить, что один из механизмов регуляции РНКазы протеасом заключается в модификации субъединиц, ассоциированных с эндорибонуклеазной активностью 26S-комплексов. В пользу данного предположения говорят выявленные нами методом иммуноблотинга изменения субъединичного состава проте-

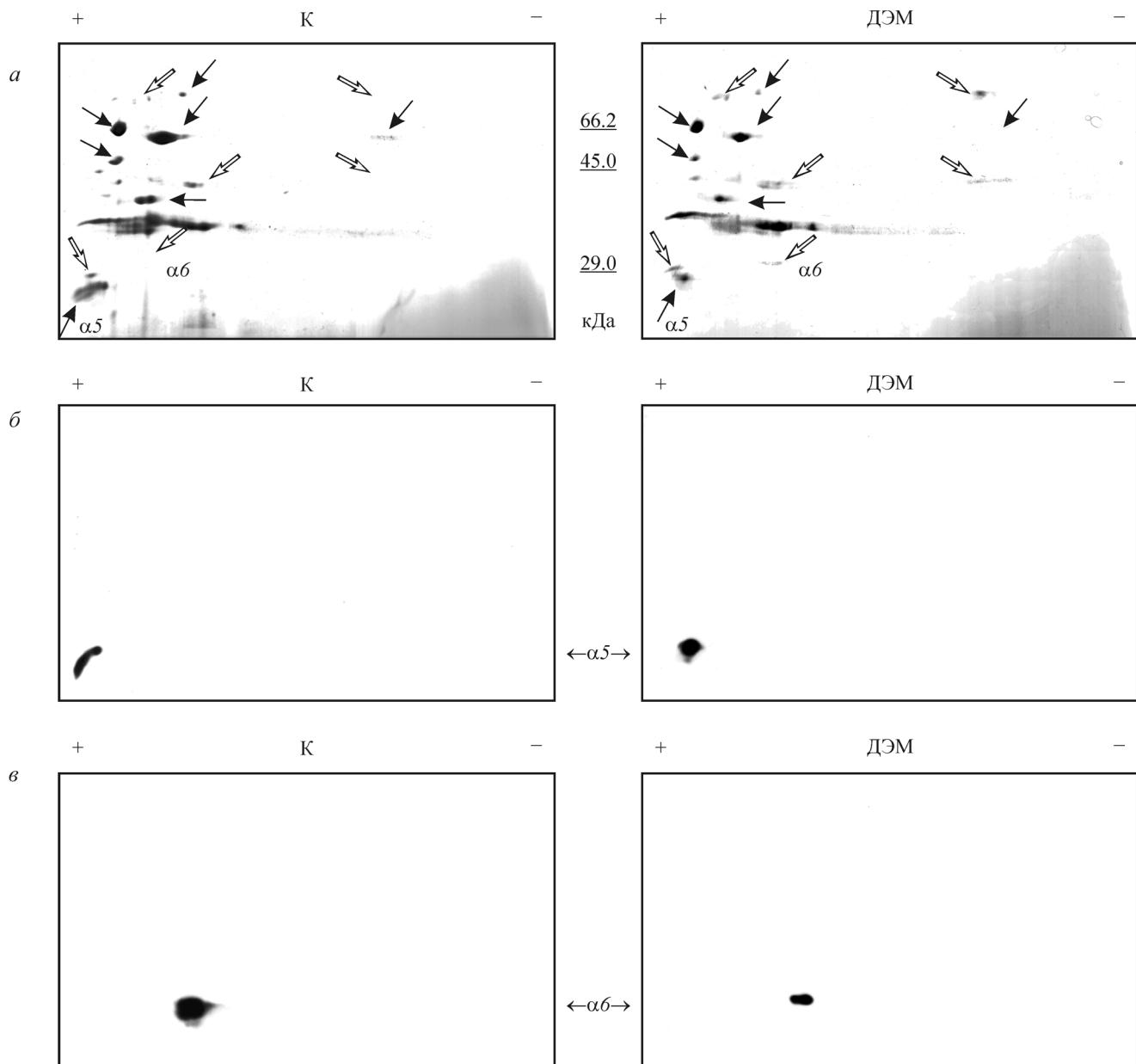


Рис. 1. Двухмерное электрофоретическое разделение субъединиц 26S-протеасом, выделенных из ядер контрольных (слева) и обработанных ДЭМ (справа) клеток К562.

a — окраска геля Кумасси G-250; черными стрелками указаны положения субъединиц протеасом, общее содержание которых увеличивается; белыми стрелками — субъединицы протеасом, содержание которых уменьшается; $\alpha 5$ и $\alpha 6$ — соответственно субъединицы протеасом $\text{zeta}/\alpha 5$ и $\text{iota}/\alpha 6$. *б* — иммунохимическое выявление $\text{zeta}/\alpha 5$ -субъединицы протеасом ($\alpha 5$) из контрольных и обработанных ДЭМ клеток. *в* — иммунохимическое выявление $\text{iota}/\alpha 6$ -субъединицы протеасом ($\alpha 6$) из контрольных и обработанных ДЭМ клеток.

асом (в частности, затрагивающие субъединицы $\text{zeta}/\alpha 5$ и $\text{iota}/\alpha 6$) после воздействия ДЭМ на клетки К562 (рис. 1, *б*, *в*). Однако природу, характер и причины возникновения модификаций протеасомных субъединиц при индукции программируемой клеточной гибели еще предстоит исследовать.

В настоящее время можно предположить, что гликазилирование или алкилирование 4-гидрокси-2-неноном приводят к увеличению массы белка и соответственно к сдвигу его положения вверх на двухмерном электрофорезе. Кроме того, при фосфорилировании или N-ацетилировании белка происходит еще и изменение его изоэлектрической точки, что приводит к смещению

белка на двухмерной электрофореграмме в область более низких значений pH. Так, после воздействия ДЭМ на клетки происходит смещение субъединицы $\alpha 5$ в сторону щелочных значений pH (рис. 1, *б*), и это может свидетельствовать о дефосфорилировании или о деацетилировании этой субъединицы при ДЭМ-индуцированном апоптозе. Таким образом, изменение активности РНКазы протеасом при индукции апоптоза может быть обусловлено в том числе специфическими модификациями субъединиц 26S-протеасом, ассоциированных с этой активностью. Например, одним из способов модификации белков в клетке и, в частности субъединиц протеасом, может быть их фосфорилирование или дефосфо-

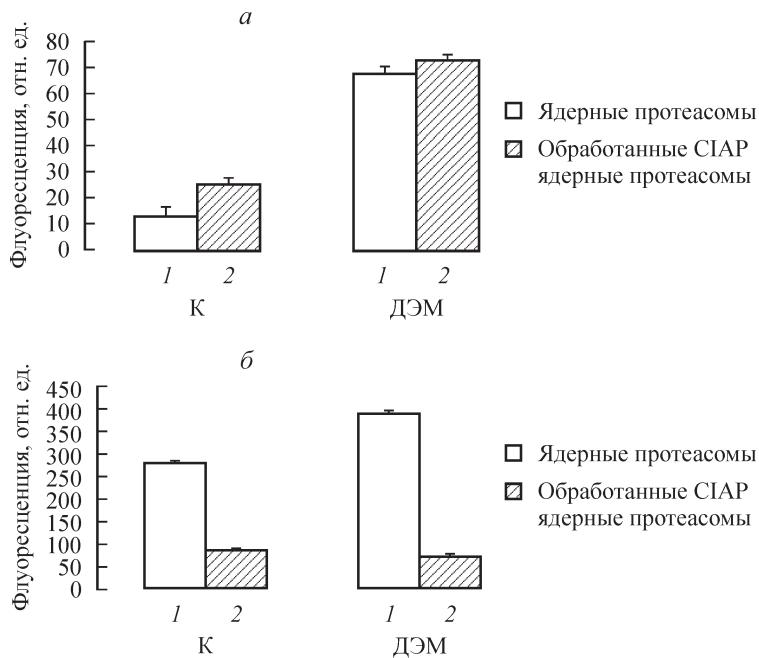


Рис. 2. Влияние ДЭМ на протеолитическую активность ядерных 26S-протеасом из клеток линии K562.

Приведены средние значения и их стандартные отклонения для трех независимых определений флуоресценции освобожденного (7-амино)-4-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 5 мкг. а, б — соответственно трипсин- и химотрипсин-подобные типы пептидазной активности протеасом; 1 — активность интактных протеасом, 2 — активность дефосфорилированных щелочной фосфатазой (CIAP) протеасом.

рилирование специфическими киназами и фосфатазами.

Известно, что в зависимости от физиологического состояния клетки статус фосфорилирования протеасомных субъединиц меняется (Umeda et al., 1997; Iwafune et al., 2002; Bardag-Gorce et al., 2004). Для исследования изменения статуса фосфорилирования субъединиц протеасом при индукции апоптоза использовали метод иммуноблотинга с применением моноклональных антител против фосфотреонина и поликлональных антител против фосфотирозина. Как видно на рис. 4, в случае треонина ДЭМ вызывает дефосфорилирование двух субъединиц ядерных 26S-протеасом с мол. массами около 47—48 и 37—38 кДа, что свидетельствует в пользу участия специфических фосфатаз в этом процессе. Кроме того, степень фосфорилирования субъединицы протеасом с мол. массой в области 30—33 кДа не изменяется, и, вероятно, фосфорилирование или дефосфорилирование ее не вовлечено в ДЭМ-индукционный апоптоз клеток K562. Фосфорилированные по треонину субъединицы протеасом (с электрофоретической подвижностью, соответствующей мол. массам около 47—48 и 30—33 кДа), вероятно, также фосфорилированы и по тирозину. Функциональный смысл этого явления еще предстоит исследовать. Кроме того, под действием ДЭМ наблюдается, во-первых, количественное снижение степени фосфорилированности по тирозину субъединиц с мол. массами порядка 30—33, 26—27 и 28—29 кДа, а во-вторых, дефосфорилирование субъединиц с мол. массами около 68, 62—65, 55—60, 47—48, 46, 44, 37, 34 и 29—30 кДа. Полученные нами данные о дефосфорилировании ядерных 26S-протеасом при действии ДЭМ на клетки указывают на то, что такая модификация субъединиц действительно может определять специфич-

ность функций протеасом в апоптотических клетках K562.

В течение последних лет появилось несколько работ, посвященных влиянию степени фосфорилирования субъединиц цитоплазматических 26S-протеасом на их протеолитическую активность (Mason et al., 1996; Iwafune et al., 2002; Куличкова и др., 2004; Цимоха и др., 2006). Более того, нами было показано селективное влияние дефосфорилирования цитоплазматических 26S-протеасом на их РНКазную активность по отношению к высокомолекулярной рибосомной РНК и мРНК *c-fos*, *c-myc* и *p53* (Токтарова и др., 2004; Цимоха и др., 2006; Миттенберг и др., 2007). Однако изменения ферментативных активностей ядерных протеасом после воздействия на последние фосфатазой ранее не исследовали. Оказалось, что дефосфорилирование ядерных протеасом вызывает значительное подавление химотрипсин-подобной протеолитической активности и в контрольных, и в индуцированных к апоптозу клетках (рис. 2, а) на 70 и 82 % соответственно. При дефосфорилировании субъединиц ядерных протеасом из контрольных и обработанных ДЭМ клеток происходит также изменение и их трипсин-подобной активности (рис. 2, б). Так, обработка частиц щелочной фосфатазой приводит к повышению этой активности всего на 7 % в индуцированных клетках и на 91 % в контрольных. Полученные данные свидетельствуют о селективном влиянии статуса фосфорилирования протеасом на разные типы их протеолитической активности.

В случае индивидуальной информационной мРНК *c-fos* обработка щелочной фосфатазой ядерных протеасом и из контрольных, и из индуцированных к апоптозу клеток стимулировала их эндогеную активность (рис. 3, б). В случае с мРНК *c-myc* предварительное дефосфорилирование активирует РНКазу ядерных

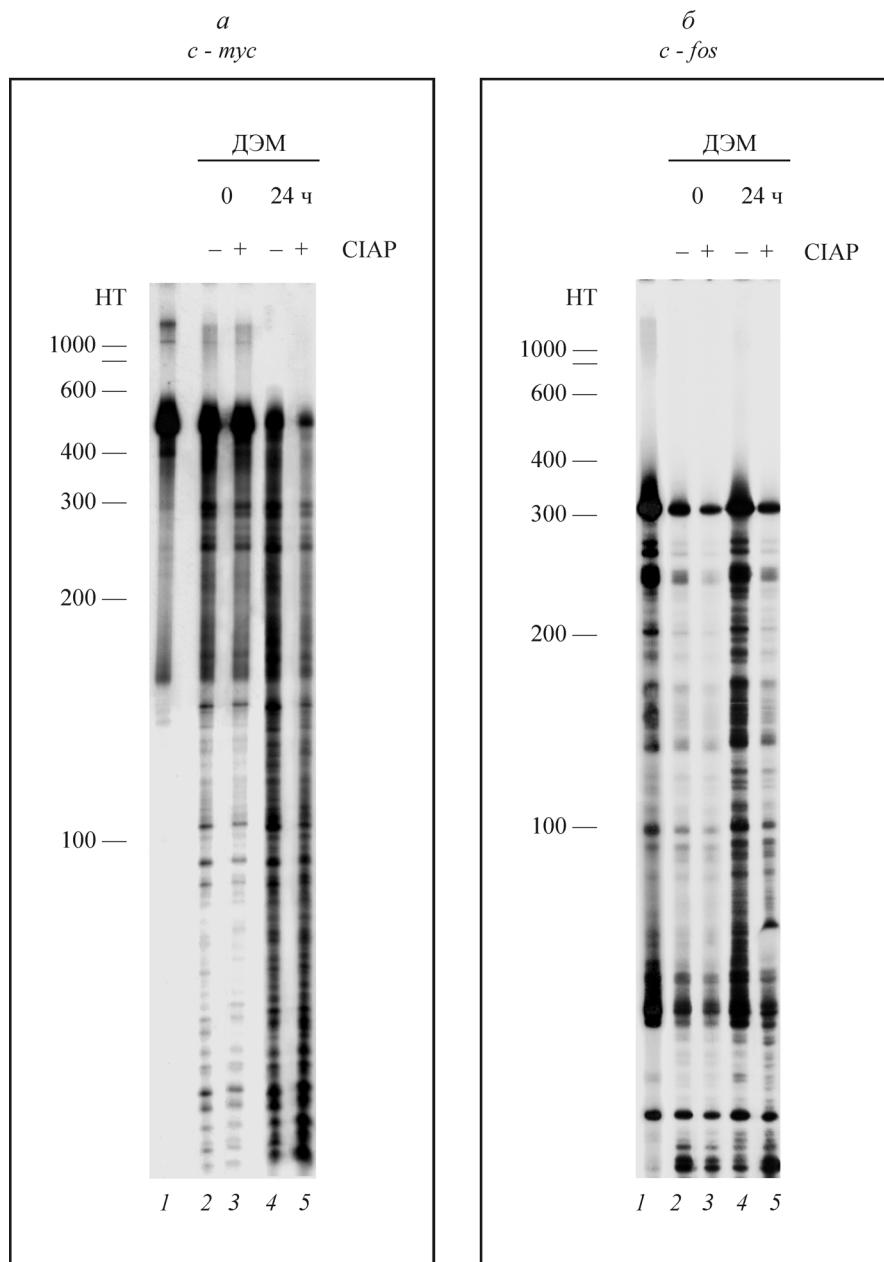


Рис. 3. Радиоавтографы электрофореграмм транскрибированных *in vitro* мРНК *c-myos* (*а*) и *c-fos* (*б*), меченных [α -³²P] ЦТФ, обработанных 26S-протеасомами, выделенными из ядер контрольных и обработанных ДЭМ клеток K562.

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

протеасом в ДЭМ-индуцированных клетках и не оказывает влияния на РНКазную активность протеасом из контрольных клеток K562 (рис. 3, *a*). Полученные результаты в очередной раз свидетельствуют о том, что степень фосфорилирования субъединиц протеасом оказывает влияние на ферментативные (протеолитические и эндо-рибонуклеазные) центры протеасом.

Обсуждение

Участие протеасом в апоптозе было обстоятельно изучено в многочисленных моделях с применением разнообразных индукторов апоптоза и ингибиторов протеа-

сом (Grimm, Osborne, 1999; Naujokat, Hoffmann, 2002; Wojcik, DeMartino, 2003). Однако изменения в протеасомах, а именно их субъединичного состава, статуса фосфорилирования и ферментативных активностей, при индукции апоптоза в раковых клетках до сих пор изучены не были.

Чтобы выяснить, какие изменения происходят с протеасомами при апоптозе, вызванном действием хорошо известного индуктора ДЭМ, мы выбрали клетки прозритролейкемии человека K562. Результаты двухмерного электрофоретического разделения белковых субъединиц протеасом свидетельствуют о том, что под действием ДЭМ ядерные 26S-комплексы особым образом изменяются, однако вопрос о том, объясняются ли такие разли-

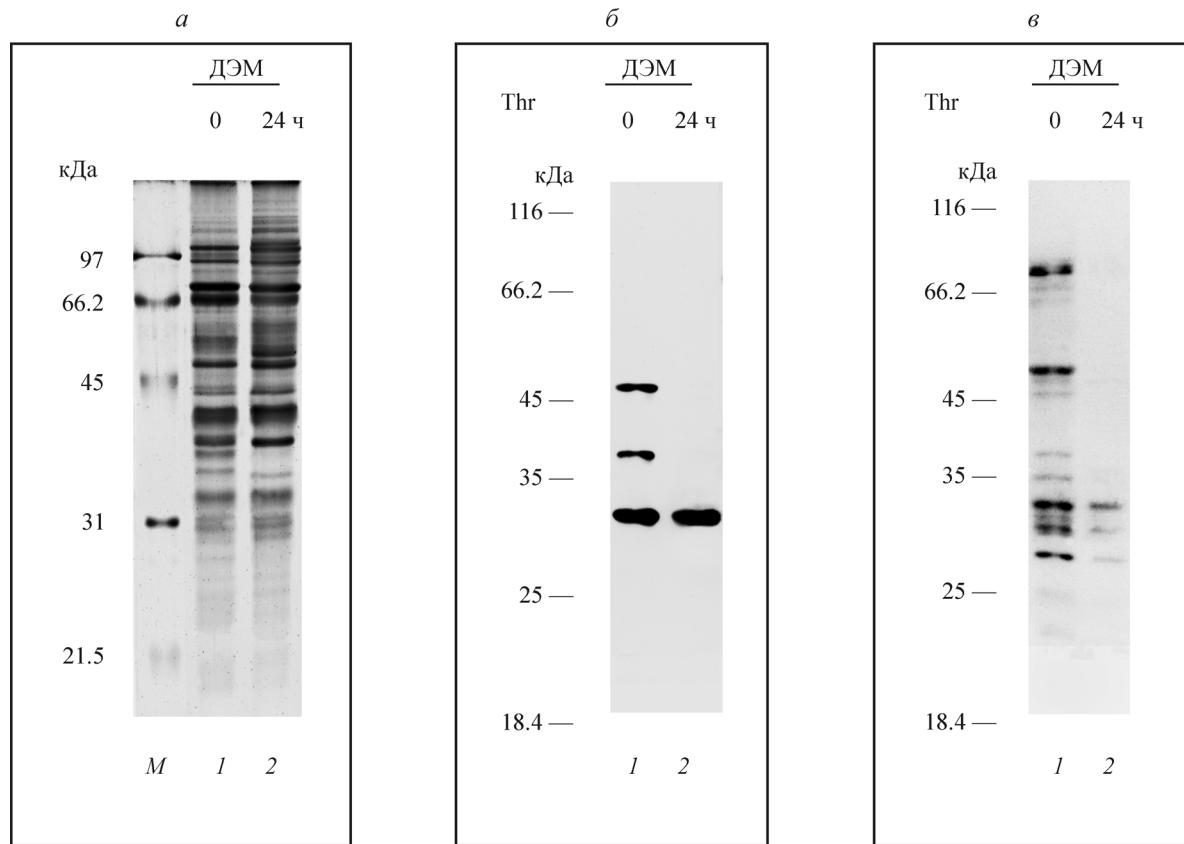


Рис. 4. Электрофоретическое разделение субъединиц 26S-протеасом, очищенных из ядер контрольных (дорожка 1) и обработанных ДЭМ (дорожка 2) клеток K562, и сравнительный анализ субъединиц этих протеасом, фосфорилированных по треонину и тирозину.

a — окраска геля Кумасси G-250; *б* — иммунохимическое выявление фосфорилированных по треонину субъединиц в составе очищенных ядерных 26S-протеасом; *в* — иммунохимическое выявление фосфорилированных по тирозину субъединиц в составе очищенных ядерных 26S-протеасом, *M* — маркеры молекулярных масс (MBI Fermentas).

чия только лишь посттрансляционными модификациями субъединиц, еще предстоит исследовать.

Ранее было показано, что в индуцированных дексаметазоном апоптотических тимоцитах трипсин-, химотрипсин-подобные и постглутамилгидролазная активности цитоплазматических протеасом снижаются (Beyette et al., 1998). Кроме того, при индукции апоптоза ДЭМ в клетках линии K562 также происходит ингибирование химотрипсин-подобной активности 26S-протеасом (Цимоха и др., 2006). Однако мы обнаружили в настоящей работе увеличение двух типов протеолитической активности ядерных протеасом. Известно, что протеасомы обладают по крайней мере пятью типами протеолитической активности — трипсин-, химотрипсин-подобными и пептидилглутамилгидролазной активностями. Кроме того, выявлена способность протеасом к разрезанию белков в участках после аминокислот с разветвленной цепью и между небольшими нейтральными аминокислотами (Orlowski et al., 1993). Поэтому возможно, что в клетке при индукции апоптоза одновременно могут происходить активация одних (в данном случае двух исследуемых) пептидаз протеасом и ингибирование других. Кроме того, в связи с уже обсуждавшейся гетерогенностью популяции протеасом в клетке увеличение активности общего количества очищенных протеасом совсем не исключает возможности снижения активности какой-либо отдельной популяции протеасом после воздействия ин-

дуктора апоптоза. Так например, наблюдаемое при индукции апоптоза ДЭМ снижение активности химотрипсиновой пептидазы цитоплазматических 26S-протеасом (Цимоха и др., 2006) по сравнению с ядерными протеасомами может свидетельствовать о передислокации из цитоплазмы в ядро определенной специфической субпопуляции протеасом, участвующей в выполнении апоптотической программы.

Одним из этапов регуляции экспрессии генов в клетках эукариот является регуляция стабильности молекул информационных РНК. И действительно, в клетке молекулы РНК могут подвергаться эндонуклеолизу на разных этапах, а при индукции апоптоза, вероятно, может возникнуть необходимость в деградации РНК и в ядре на стадии пре-мРНК, и в цитоплазме на этапах, предшествующих трансляции. Так например, 26S-частицы, с помощью убиквитинзависимого протеолиза могут контролировать уровень проапоптотических и антиапоптотических белков, а посредством специфического эндонуклеолиза регулировать содержание в клетке кодирующих их мРНК. И таким образом, с помощью протеасом клетка может наиболее быстро и эффективно инактивировать антиапоптотические и(или), наоборот, активировать проапоптотические гены во время реализации программы своей гибели.

До сих пор исследования состава и активностей протеасом проводили только на цитоплазматических части-

цах. Ранее мы тоже исследовали только цитоплазматические протеасомы при индукции апоптоза ДЭМ в клетках K562 (Цимоха и др., 2006; Миттенберг и др., 2007). В настоящей работе мы впервые обнаружили, что при индукции апоптоза изменяется статус фосфорилирования ряда субъединиц ядерных 26S-протеасом по треонину и тирозину. Кроме того, впервые получены результаты, свидетельствующие об изменении состава и активностей ядерных 26S-протеасом в индуцированных к апоптозу клетках K562, а также о том, что фосфорилирование определенных протеасомных субъединиц при действии на клетки ДЭМ может являться одним из путей регуляции протеасомзависимой деградации белков, участвующих в выполнении программы гибели клетки, а также в нуклеолизе кодирующих их специфических мРНК. Суммируя все вышеизложенное, можно заключить, что полученные данные свидетельствуют о перепрограммировании популяции протеасом при индукции апоптоза и позволяют высказать предположение об участии специфических видов этих частиц в событиях, происходящих в ядре при реализации программы гибели клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49606), С.-Петербургского научного центра (2006 г.), Программы ведущих научных школ (НШ-523.2006.4) и с использованием оборудования ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

Список литературы

- Куличкова В. А., Миттенберг А. Г., Ермолаева Ю. Б., Цимоха А. С., Волкова И. В., Кожухарова И. В., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2004. Специфичность популяции протеасом, экскретируемых из клеток в культуральную среду. Докл. РАН. 399 (5) : 503—506.
- Миттенберг А. Г., Моисеева Т. Н., Пугачева И. В., Куличкова В. А., Цимоха А. С., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2007. Регуляция специфичности эндорибонуклеазной активности протеасом при действии индукторов дифференцировки и апоптоза на клетки линии K562. Цитология. 49 (2) : 142—148.
- 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-частиц при действии индукторов апоптоза на клетки линии K562: участие α-РНП-частиц и протеасом в контроле над стабильностью РНК при программирующей клеточной гибели. Цитология. 46 (3) : 283—290.
- Туроверов К. К., Бикташев А. Г., Дорофеенок 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.
- Цимоха А. С., Куличкова В. А., Евтеева И. Н., Ватажок Ю. Я., Моисеева Т. Н., Ермолаева Ю. Б., Ващукова Е. С., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2006. Специфичность изменений в протеасомах клеток K562 при апоптозе, индуцированном диэтилмалеатом. Цитология. 48 (2) : 133—141.
- 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.
- 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.
- Cohen D. R., Curran T. 1989. The structure and function of the fos protooncogene. Crit. Rev. Oncogen. 1 : 65—88.
- Digman J. D., Lebovitz R. M., Roeder R. G. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucl. Acids Res. 11 : 1475—1489.
- Gautier-Bert K., Murol B., Jarrousse A. S., Ballut L., Badaoui S., Petit F., Schmid H. P. 2003. Substrate affinity and substrate specificity of proteasomes with RNase activity. Mol. Biol. Rep. 30 : 1—7.
- Grimm L. M., Osborne B. A. 1999. Apoptosis and the proteasome. Results Probl. Cell Differ. 23 : 209—228.
- He H., Qi X. M., Grossmann J., Distelhorst C. W. 1998. c-Fos degradation by the proteasome. J. Biol. Chem. 273 : 25 015—25 019.
- Hochstrasser M., Johnson P. R., Arendt C. S., Amerik A. Y., Swaminathan S., Swanson R., Li S. J., Laney J., Pals-Rylaarsdam R., Nowak J., Connerly P. L. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-proteasome system. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 354 : 1513—1522.
- 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.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Maniatis T., Jeffrey A., van de Sande H. 1975. Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemistry. 14 : 3787—3794.
- 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.
- Mayer R. J. 2000. The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1 : 145—148.
- 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.
- Orlowski M., Cardozo C., Michaud C. 1993. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. Biochemistry. 32 : 1563—1572.
- Petit F., Jarrousse A. S., Dahlman B., Sobek A., Hendil K. B., Buri J., Briand Y., Schmid H. P. 1997. Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation. Biochem. J. 325 : 93—98.
- Rock K. L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A. L. 1994. Inhibitors of the proteas-

me block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 78 : 761—771.

Rubin D. M., Finley D. 1995. Proteolysis. The proteasome: a protein-degrading organelle? *Curr. Biol.* 5 : 854—858.

Salghetti S. E., Kim S. Y., Tansey W. P. 1999. Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J.* 18 : 717—726.

Umeda M., Manabe Y., Uchimiya H. 1997. Phosphorylation of the C2 subunit of the proteasome in rice. *FEBS Lett.* 403 : 313—317.

Wojcik C. 2002. Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J. Cell. Mol. Med.* 6 : 25—48.

Wojcik C., DeMartino G. N. 2003. Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 : 579—589.

Поступила 29 XI 2006

REPROGRAMMING OF NUCLEAR PROTEASOMES IN K562 CELLS UNDERGOING APOPTOSIS.

I. EFFECT OF GLUTATHIONE-DEPLETING AGENT, DIETHYLMALEATE

A. S. Tsimokha,^{1,} A. G. Mittenberg,¹ V. A. Kulichkova,¹ Yu. Ya. Vatajok,¹ T. N. Moiseeva,¹ I. N. Evteeva,¹ Yu. B. Ermolaeva,¹ L. N. Gause,² I. M. Konstantinova¹*

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

Here we have studied changes in the subunit composition, phosphorylation state and enzymatic activities of 26S proteasomes in cells undergoing the programmed cell death. Apoptosis in proerythroblastemic K562 cells was induced by glutathione-depleting agent, diethylmaleate (DEM). We have shown for the first time that proteasomes isolated from the nuclei of control and induces K562 cells differ in their subunit patterns, as well as in the phosphorylation state of subunits on threonine and tyrosine residues. We observed trypsin- and chymotrypsin-like activities on nuclear proteasomes and the specificity of proteasomal nucleolysis of several individual messenger RNAs (*c-fos* and *c-myc*) to be changed under effect of DEM on K562 cells. Treatment of K562 cells with DEM leads to modification of zeta/α5 and iota/α6 proteasomal subunits associated with RNase activity of proteasomes. These findings confirm our hypothesis about so-called reprogramming of nuclear proteasome population in undergoing apoptosis K562 cells which is manifested by the changes in proteasomal composition, phosphorylation state, and enzymatic activities during the programmed cell death.

Key words: apoptosis, diethylmaleate, nuclear proteasomes, phosphorylation, proteolytic activity, ribonucleases, threonine, tyrosine.