

**ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ЯДЕРНЫХ ПРОТЕАСОМ
ПРИ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ K562.
II. ВОЗДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ДОКСОРУБИЦИНА**

© *А. С. Цимоха,* А. Г. Миттенберг, И. Н. Евтеева, В. А. Куличкова,
И. В. Кожухарова, Ю. Б. Ермолаева, И. М. Константинова*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
* электронный адрес: atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru*

Клетки человека линии K562, индуцированные к апоптозу при помощи доксорубина (ДР), были использованы в качестве модели для исследования изменений субъединичного состава, статуса фосфорилирования и ферментативных активностей ядерных протеасом. 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 ДР наблюдается изменение трипсин- и химотрипсин-подобных типов протеолитической активности протеасом, а также их эндорибонуклеазной активности по отношению к мРНК *p53*. Выявлено, что после индукции ДР апоптоза в клетках K562 наблюдается модифицирование ассоциированных с РНКазной активностью протеасомных субъединиц $\zeta/\alpha 5$ и $\iota/\alpha 6$. Полученные результаты свидетельствуют в пользу изменений субъединичного состава, ферментативных активностей и статуса фосфорилирования, а именно о перепрограммировании популяции ядерных протеасом при индукции апоптоза в клетках K562.

Ключевые слова: апоптоз, доксорубин, протеолитическая активность, тирозин, треонин, фосфорилирование, эндорибонуклеазная активность, ядерные протеасомы.

Принятые сокращения: ДЭМ — диэтилмалеат, ДР — доксорубин, ПААГ — полиакриламидный гель, СIAP — щелочная фосфатаза из кишечника телят, DTT — дитиотреитол, PMSF — фенилметилсульфонилфторид, EDTA — этилендиаминтетрауксусная кислота.

Программированная клеточная гибель, или апоптоз, является важнейшим механизмом контроля над качеством и численностью клеточной популяции в многоклеточном организме. Он обеспечивает равновесие в пролиферации клеток, элиминации поврежденных (например, радиацией), пораженных вирусом и неопластических клеток, а также селекцию лимфоцитов, при которой удаляются аутоиммунные клоны. Известно, что запуск программы, приводящей к смерти клетки, может осуществляться как специфическими сигналами (например, цитокинами или гормонами), так и неспецифическими, такими как радиация, повышение температуры или действие окислителей. Противоопухолевый препарат доксорубин (ДР) не является свободным радикалом, но он подавляет клеточный рост через взаимодействие с железом, приводящее к образованию цитотоксических активных форм кислорода, что вызывает апоптоз через инициацию каспазного каскада (Kwok, Richardson, 2004).

Белкам и пептидам принадлежит центральная роль в восприятии и передаче клеткой сигналов, а также в регуляции механизмов, направленных на поддержание клеточного гомеостаза, и на уничтожение поврежденных клеток. При апоптозе, например, происходит активация целого каскада протеаз. Скорее всего, различные протеа-

зы «вступают» на разных стадиях апоптоза и в различных частях клетки. Возможно, однако, что в ответ на апоптотический сигнал некоторые протеазы «запускаются» одновременно, но независимо друг от друга. Кроме того, не исключено, что во время выполнения апоптотической программы активация более поздних протеаз находится в зависимости от их ранних предшественников (Le et al., 1995). И таким образом, одна из возможностей предотвратить гибель клетки — это ингибировать протеазы с самого начала инициации этого процесса (Sarin et al., 1993), и наоборот, можно усилить апоптоз, применяя экзогенные протеазы или способствуя активации эндогенных протеаз.

В настоящее время широко изучается участие в апоптозе протеасом, осуществляющих основную программируемую протеолиз и процессинг различных регуляторных белков в клетке. Однако некоторые вопросы, в частности изменения субъединичного состава и фосфорилированности протеасом, а также РНКазная активность последних при апоптозе, до сих пор мало исследованы.

Клеточная гибель обусловлена серией определенных метаболических изменений. Однако феноменология биохимических изменений столь разнообразна, что непонят-

но, какие факторы стремительно развивающегося процесса являются общими для клеток всех типов, а какие индивидуальными. До сих пор неясно, связаны ли различия вариантов клеточной гибели с различными механизмами их реализации или с различной природой клеток.

Ранее мы показали, что при индукции апоптоза глутатионистощающим агентом диэтилмалеатом (ДЭМ) в клетках K562 изменяются ферментативные активности как цитоплазматических (Токтарова и др., 2004; Цимоха и др., 2006; Миттенберг и др., 2007), так и ядерных 26S протеасом (Токтарова и др., 2004; Цимоха 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 субъединиц α -типа ($\alpha 5$ и $\alpha 6$), ассоциированных с РНКазной активностью протеасом (Цимоха и др., 2006, 2007). Кроме того, после воздействия ДЭМ на клетки K562 наблюдались изменения и в статусе фосфорилирования протеасом по тирозину и треонину (Цимоха и др., 2006, 2007). Возникает вопрос о том, существует ли разница в функциональных изменениях протеасом при воздействии различных индукторов апоптоза на клетки K562.

Поэтому задачей настоящей работы явилось продолжение исследования специфических изменений субъединичного состава и статуса фосфорилирования протеасом из ядер клеток проэритролейкемии человека линии K562 при индукции программированной клеточной гибели. Апоптоз вызывали при помощи ДР. Кроме того, проводилось сравнение того, как изменяются состав и статус фосфорилирования протеасом после воздействия на клетки K562 индукторов апоптоза ДР и ДЭМ. Также, опираясь на недавние данные о влиянии ДЭМ на протеолитическую активность протеасом (Цимоха и др., 2006, 2007), мы оценивали влияние противоопухолевого агента ДР на трипсин- и хомотрипсин-подобные типы пептидазной активности ядерных протеасом и нуклеолиз этими частицами индивидуальной мРНК (*p53*). Дефосфорилирование протеасом избирательно изменяет специфичность протеолитической и РНКазной активностей протеасом как до, так и после индукции апоптоза ДЭМ в клетках K562 (Токтарова и др., 2004; Цимоха и др., 2006, 2007; Миттенберг и др., 2007). В настоящей работе мы также продолжили исследование влияния щелочной фосфатазы на ферментативные активности ядерных протеасом клеток K562.

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 программированной клеточной гибели в культуральную жидкость добавляли ДР до конечной концентрации 4 мкМ (Chuang, Chuang, 1979) и инкубировали клетки в течение 24 ч.

Индукцию апоптоза оценивали по изменению морфологии ядер и по межнуклеосомной фрагментации ДНК. Для анализа изменения ядерной морфологии клетки K562, выращенные на покровных стеклах, про-

мывали фосфатно-солевым буфером (PBS), фиксировали 2%-ным параформальдегидом в течение 10 мин и окрашивали красителем Hoechst 33258 (1 мкМ) в течение 30 мин. Препараты просматривали во флуоресцентном микроскопе Zeiss (Германия) и фотографировали с помощью CD-камеры (рис. 1, а). 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. 1, б).

Транскрипция *in vitro* мРНК *p53* была получена в результате транскрипции в бесклеточной системе вектора Bluescript KS(-), в который была вставлена кДНК *p53* по сайту рестрикции EcoRI. Для получения смысловой последовательности плазмиду линейаризовали с помощью рестриктазы SmaI и транскрибировали РНК полимеразой фага Т3 согласно инструкциям фирмы-изготовителя (MBI Fermentas, Литва). Транскрипцию вели в присутствии [α -³²P] ЦТФ в течение 2 ч при 30 °C. Транскрибированную РНК обрабатывали ДНКазой I и очищали депротенинизацией с помощью смеси фенол—хлороформ. Плазида была любезно предоставлена д-ром П. М. Чумаковым.

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

Выделяли ядерные 26S-протеасомы из ядерных экстрактов (Digman et al., 1983) с помощью центрифугирования 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), хомотрипсин-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 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 1 мМ DTT и 5 мМ АТР. Реакцию останавливали, добавляя равный объем смеси 70 мМ уксусной кислоты, 100 мМ Na-хлор-ацетата и 30 мМ 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 нм соответственно (Barret, 1980).

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

Двухмерный электрофорез белков протеасом проводили в соответствии с описанной методикой (O'Farrell, 1975). В первом направлении ПААГ содержал амфолины рН 3—10. Во втором направлении (после изофокусирования) протеасомы фракционировали на белковые субъединицы в денатурирующем 12%-ном ПААГ (Laemmli, 1970).

Вестерн-блоттинг белков протеасом с применением вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, выполняли, следуя рекомендациям фирмы Sigma (США). Пероксидазу выявляли с помощью реактивов ECL (ICN Pharmaceutics, США). Протеасомы

фракционировали на белковые субъединицы в денатурирующем ПААГ (10 и 12 %) (Laemmli, 1970), полученные фракции электрофоретически переносили на нитроцеллюлозные фильтры (Hybond C extra, Amersham) в буфере Т (25 мМ Трис-НСl, 190 мМ глицина, 0.05 % додецилсульфата натрия и 20 % метанола, рН 7.3). Мембрану отмывали в буфере ТBS (10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, и 150 мМ NaCl) и блокировали центры неспецифического связывания антител 5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина или обезжиренного молока в этом же буфере. Избыток блокирующего агента отмывали буфером ТBS и мембрану инкубировали с поликлональными антителами против фосфотреонина (Cell Signaling, США), с моноклональными антителами против фосфотирозина (Cell Signaling, США) или со специфическими антителами против субъединиц 20S-протеасомы $\alpha 5$ (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 этидий и Hoechst 33258 (Serva, Германия); фенол, хлороформ, Na-хлорацетат, метанол, этанол, уксусную кислоту, глицерин KCl, H₂O₂, NaOH и ортофосфорную кислоту (Россия); люминол, кумаровую кислоту, акрил-амид, дитиотреитол, Трис-гидроксиэтилметиламинометан, глицин, MgCl₂, АТФ, додецилсульфат натрия, β -меркаптоэтанол, ортованадат натрия и Isolyte 3—10 (MP Biomedicals, США); метилен-бис-акриламид, ЭДТА, фенилметилсульфонилфторид, ТЕМЕД, персульфат аммония, мочевины, борную кислоту, Tween-20, ацетат магния, бычий сывороточный альбумин, козьи антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с перокси-

дазой хрена, и козьи антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США); NaCl и ацетат натрия (Merck, Германия); доксорубин (Лэнс, Фарма, Россия).

Результаты

В настоящей работе апоптоз в клетках линии K562 запускали противоопухолевым препаратом доксорубицином (ДР). Через 24 ч воздействия он вызывает фрагментацию ядер в клетках, выявляемую при окрашивании Hoechst 33258 (рис. 1, а), и олигонуклеосомную фрагментацию хроматина, которая подтверждается с помощью электрофореза ДНК (рис. 1, б).

Чтобы исследовать влияние апоптотического индуктора ДР на субъединичный состав и статус фосфорилирования ядерных протеасом, а также их ферментативные активности, частицы выделяли из необработанных (контрольных) клеток K562 и из клеток, обработанных ДР.

Для анализа изменения субъединичного состава протеасом под действием ДР препараты очищенных 26S протеасом, выделенных из ядер клеток K562, фракционировали при помощи метода двухмерного электрофореза белков. Как видно на рис. 2, а (белые стрелки), после воздействия на клетку ДР количество некоторых субъединиц в популяции протеасом, мигрирующих в электрофорезе с подвижностью, соответствующей белкам в области мол. масс 30—33, 35—45, 62 и 90—97 кДа, увеличивается, а содержание некоторых других субъединиц с относительными мол. массами 27, 30—35 и 45—60 кДа, напротив, уменьшается (рис. 2, а, черные стрелки). Такие данные свидетельствуют в пользу существования

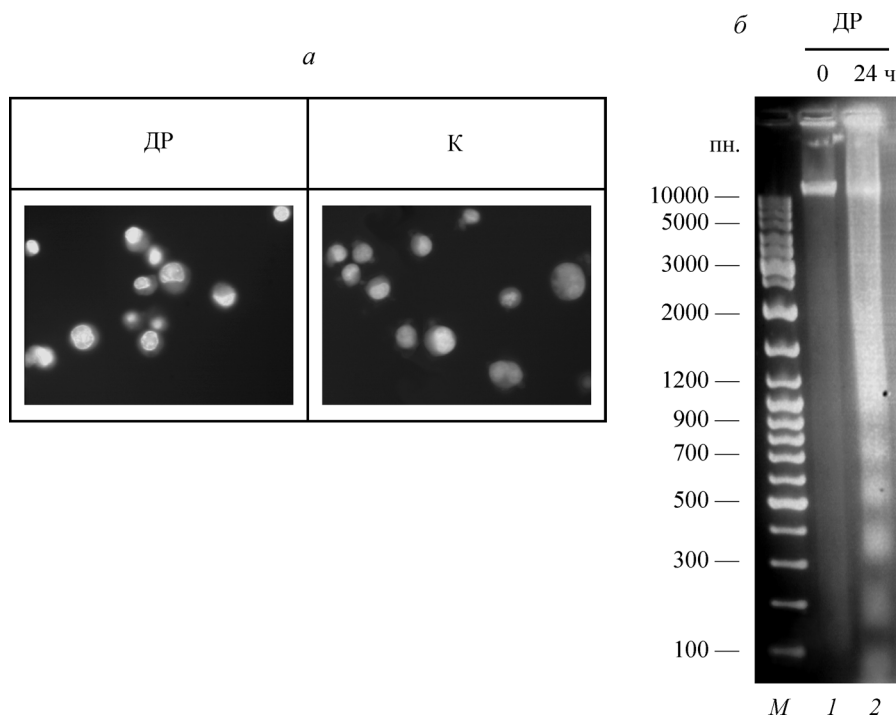


Рис. 1. Ядерная и олигонуклеосомная фрагментация ДНК проэритролейкемических клеток человека K562 при действии доксорубина (ДР).

а — клетки обрабатывали ДР и через 24 ч окрашивали раствором Hoechst 33258; видна типичная картина фрагментации ядер; К — контроль. б — олигонуклеосомальная фрагментация ДНК; М — маркеры ДНК (Fermentas Life Sciences, Литва), пары нуклеотидов (п. н.); 1 — ДНК контрольных клеток, 2 — ДНК из клеток, подвергнутых действию ДР.

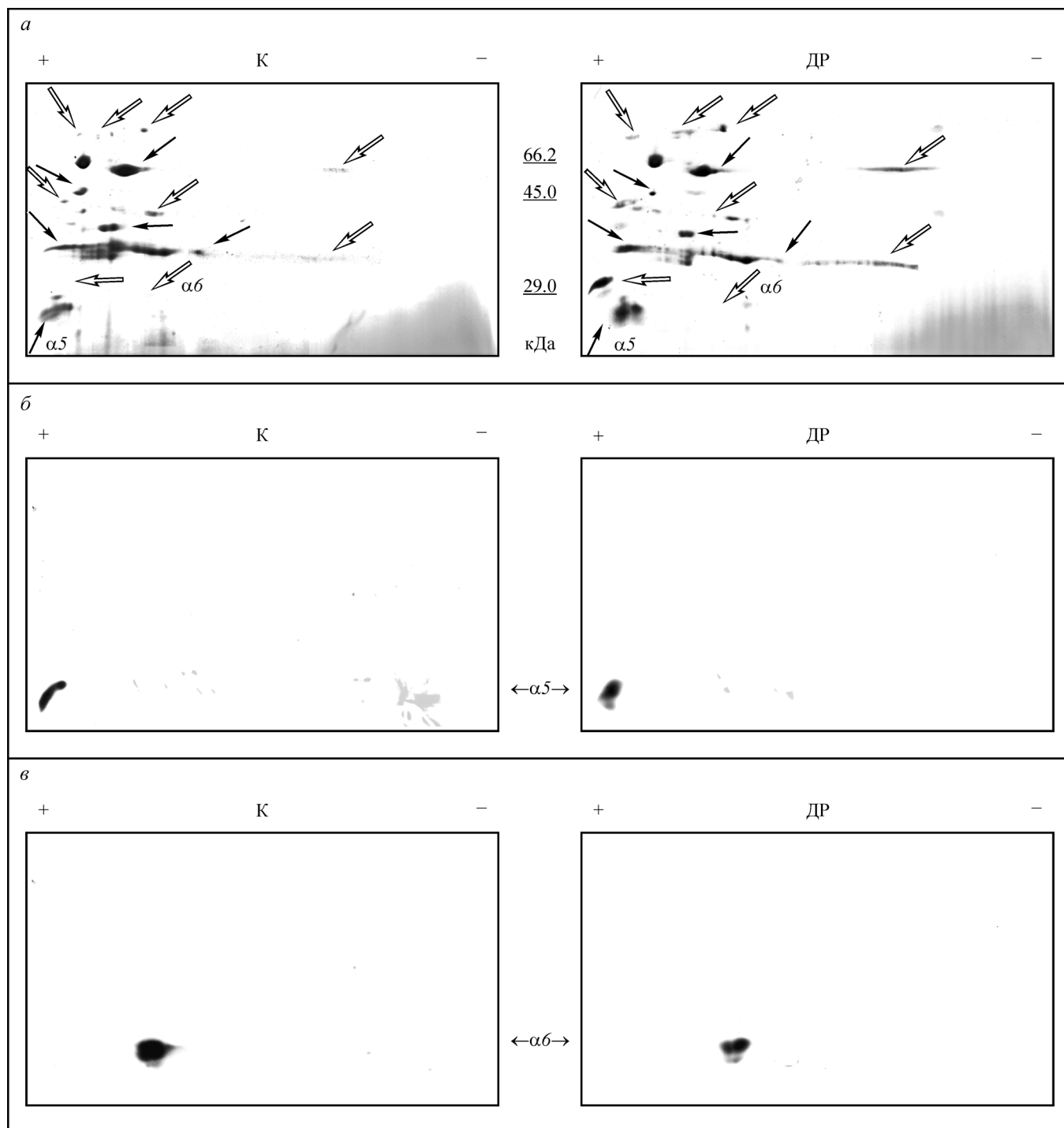


Рис. 2. Двухмерное электрофоретическое разделение субъединиц 26S протеасом, выделенных из ядер контрольных (слева, К) и обработанных ДР (справа, ДР) клеток K562.

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 zeta/ $\alpha 5$ и iota/ $\alpha 6$. *b* — иммунохимическое выявление zeta/ $\alpha 5$ -субъединицы протеасом ($\alpha 5$) из контрольных и обработанных ДР клеток. *c* — иммунохимическое выявление iota/ $\alpha 6$ — субъединицы протеасом ($\alpha 6$) из контрольных и обработанных ДР клеток.

специфической (или специфических) субпопуляции протеасом, вовлеченной в реализацию программы клеточной гибели.

Чтобы продолжить изучение изменений в протеасомах после индукции апоптоза, мы оценивали изменения в фосфорилировании протеасомных субъединиц после

индукции апоптоза ДР с помощью иммуноблотинга с применением поликлональных антител против фосфотреонина (рис. 3, б) и моноклональных антител против фосфотирозина (рис. 3, в). Видно, что под действием ДР наблюдаются количественное снижение степени фосфорилированности по тирозину двух субъединиц с относи-

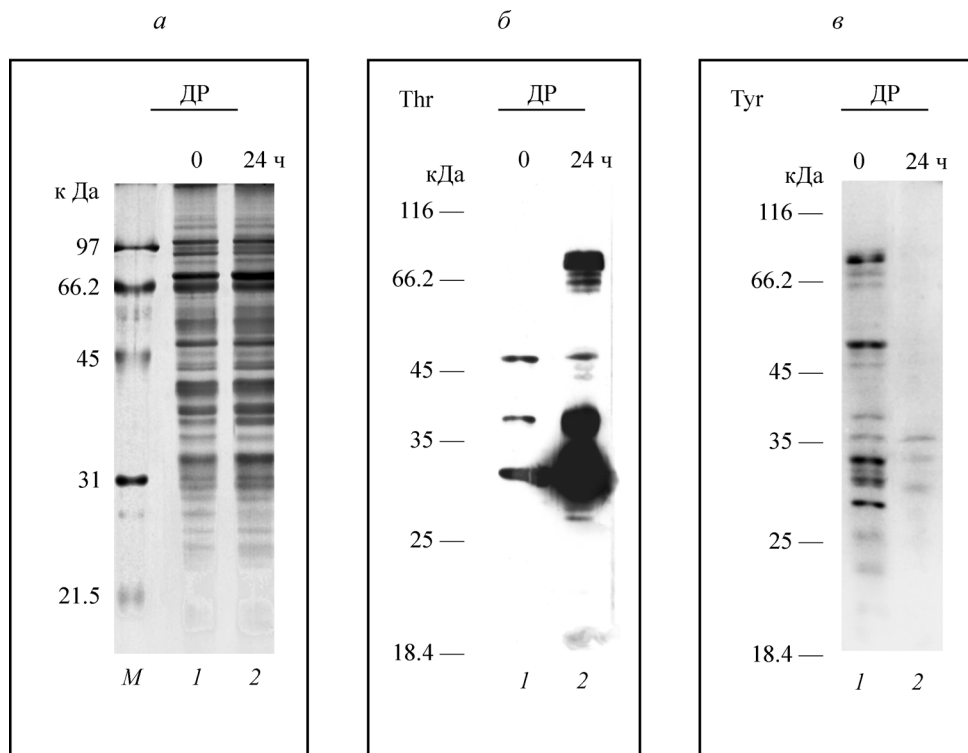


Рис. 3. Электрофоретическое разделение субъединиц 26S протеасом, выделенных из ядер контрольных (дорожка 1) и обработанных ДР (дорожка 2) клеток K562. Сравнительный анализ субъединиц этих протеасом, фосфорилированных по треонину (б) и тирозину (в).

а — 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. М — маркеры молекулярных масс (МВІ Fermentas).

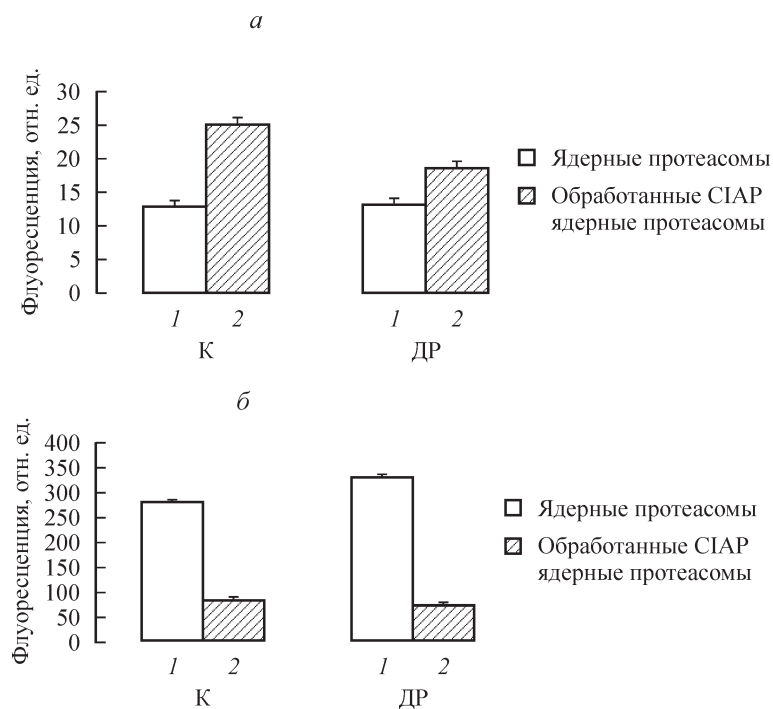


Рис. 4. Влияние ДР на протеолитическую активность ядерных 26S протеасом из клеток линии K562.

а, б — соответственно трипсин- и химотрипсин-подобные типы пептидазной активности протеасом; 1 — активность интактных протеасом, 2 — активность дефосфорилированных щелочной фосфатазой (СИАР) протеасом. Приведены средние значения и их стандартные отклонения для 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 5 мкг.

тельными мол. массами соответственно порядка 28—30 и 26—27 кДа и полное дефосфорилирование субъединиц с мол. массами около 68, 62—65, 55—60, 47—48, 46, 44, 37, 34, 30—33 и 29—30 кДа. В случае фосфорилирования по треонину ДР, напротив, вызывает гиперфосфорилирование ядерных протеасом.

И мы, и другие авторы ранее показали, что при апоптозе изменяется протеолитическая активность протеасом (Beyette et al., 1998; Цимоха и др., 2006, 2007), что совершенно неудивительно при всей сложности и масштабности апоптогического процесса, в котором синтезируется и (или) активируется много новых белков и пептидов. Но имеются ли различия в активности протеасом при запуске апоптоза разными индукторами? Чтобы ответить на этот вопрос, мы исследовали трипсин- и химотрипсин-подобные типы пептидазной активности очищенных ядерных 26S протеасом из контрольных и обработанных ДР клеток K562. Как следует из данных рис. 4, обработка клеток ДР не изменяет трипсиновый, но усиливает на 15 % химотрипсиновый тип протеолитической активности 26S протеасом из ядер клеток K562, тогда как воздействие ДЭМ на эти клетки приводило к усилению этих типов активности (Цимоха и др., 2007).

Ранее нами было исследовано влияние ДР на эндорибонуклеазную активность 26S-протеасом по отношению к рибосомным высокомолекулярным РНК клеток K562 (Токтарова и др., 2004). Для дальнейшего анализа влияния этого индуктора на РНКазу протеасом мы использовали в качестве субстрата индивидуальную мРНК *p53*. Деградация онкосупрессорного белка *p53* в клетках происходит по убиквитинзависимому протеасомному пути (Lopes et al., 1997). Несмотря на то что в клетке синтезируется нормальное количество мРНК *p53* и собственно белка, уровень *p53* очень низок при ряде злокачественных заболеваний, вызванных, например, онкогенным штаммом папиллома-вируса человека HPV. Такое снижение количества белка *p53* является следствием его ассоциации с присутствующим в клетке белком Е6-АР и HPV-кодируемым онкобелком Е6. Это взаимодействие дает сигнал для убиквитинирования и ускоренной деградации *p53* протеасомой, вследствие чего нарушается равновесие между процессами роста и апоптоза в зараженных клетках, что в конечном счете приводит к злокачественному перерождению (Chen et al., 2000).

Электрофоретический анализ показал, что воздействие на клетки ДР вызывает некоторое повышение способности протеасом к нуклеолизу этой мРНК (рис. 5, дорожки 2, 4), а именно наблюдается появление большего количества низкомолекулярных продуктов гидролиза. Поскольку с рибонуклеазной активностью протеасом связывают две их субъединицы α -типа — ζ / $\alpha 5$ и ι / $\alpha 6$ (Petit et al., 1997), вероятно, при индукции апоптоза эти субъединицы модифицируются, обеспечивая таким образом специфичность РНКазной активности. И действительно, при индукции апоптоза ДР обе эти субъединицы претерпевают некоторые модификации (рис. 2, б, в). Однако и природа, и характер таких модификаций еще неизвестны.

Ранее было исследовано влияние дефосфорилирования протеасом на их активность в клетках K562 до и после индукции апоптоза ДЭМ (Цимоха и др., 2006, 2007). В данной работе индуктором апоптоза выступает ДР, поэтому мы снова оценивали влияние дефосфорилирования субъединиц ядерных протеасом на их ферментативную активность. Результаты, представленные на

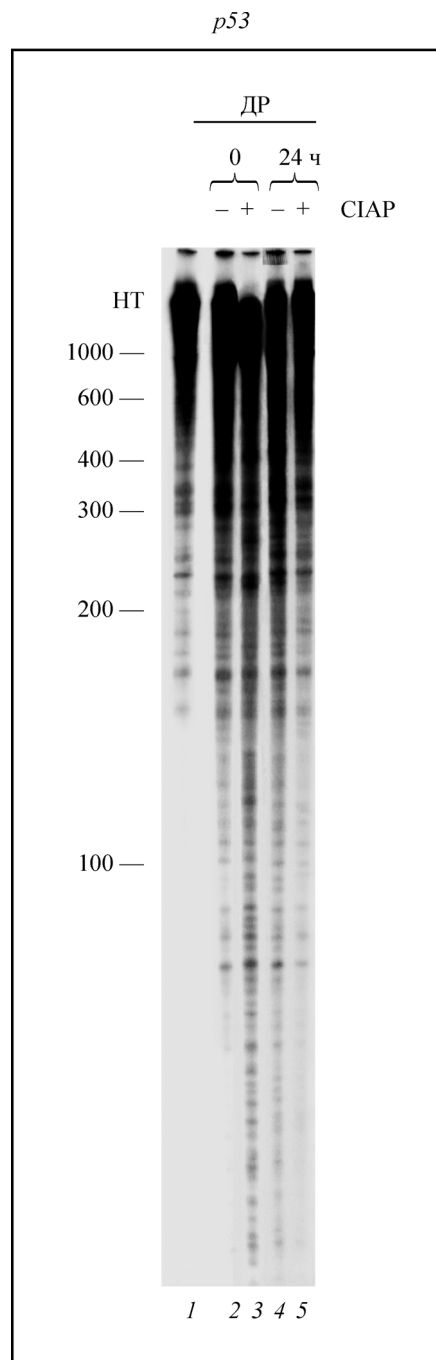


Рис. 5. Радиоавтограф электрофореграммы транскрибированной *in vitro* мРНК *p53*, меченной [α - 32 P] ЦТФ, обработанной 26S-протеасомами, очищенными из ядер контрольных и обработанных ДР клеток K562.

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

рис. 4, а, демонстрируют значительное подавление химотрипсин-подобной протеолитической активности в контрольных и индуцированных к апоптозу клетках на 70 и 78 % соответственно. После обработки ядерных протеасом щелочной фосфатазой происходит также изменение и их трипсин-подобной активности (рис. 4, б).

Так, дефосфорилирование субъединиц протеасом приводит к повышению этой активности на 38 % в индуцированных клетках и на 92 % в контрольных. Полученные данные свидетельствуют о селективном влиянии статуса фосфорилирования протеасом на разные типы их протеолитической активности.

Обработка щелочной фосфатазой ядерных протеасом также оказывает влияние и на их РНКазную активность по отношению к индивидуальной мРНК *p53*. Более того, такое дефосфорилирование активирует РНКазу ядерных протеасом в контрольных клетках, но ингибирует в обработанных ДР клетках K562 (рис. 4, дорожки 3, 5). Эти данные свидетельствуют о том, что фосфорилирование субъединицы протеасом оказывает селективное влияние и на протеолитические, и на рибонуклеазные центры протеасом, а изменение фосфорилирования субъединиц может являться механизмом контроля протеасомной деградации белков, участвующих в процессе выполнения апоптоза, а также в деградации кодирующих их мРНК.

Обсуждение

Ранее, для того чтобы выяснить, какие изменения происходят с протеасомами при индукции апоптоза в клетках проэритролейкемии человека K562, мы индуцировали проаграммированную гибель клеток хорошо известным индуктором — глутатионистощающим агентом ДЭМ (Токтарова и др., 2004; Цимоха и др., 2006, 2007). В настоящей работе мы инициировали апоптоз в клетках K562 противоопухолевым препаратом ДР.

Как и в случае индукции апоптоза в клетках K562 ДЭМ, после действия на клетки ДР ядерные 26S комплексы особым образом изменяются. В настоящее время еще нет ответа на вопрос о том, каким образом происходят наблюдаемые изменения в субъединичном составе протеасом — благодаря модификациям протеасомных субъединиц или же изменениям их экспрессии после воздействия индуктора апоптоза.

Известно, что протеасомы в клетке фосфорилированы, причем фосфорилированность протеасомных субъединиц изменяется в зависимости от функционального состояния клетки (Iwafune et al., 2002; Bardag-Gorce et al., 2004; Цимоха и др., 2006, 2007; Миттенберг и др., 2007). Ранее нами было исследовано влияние запуска программы гибели клеток на изменение фосфорилированности протеасом, однако в качестве индуктора апоптоза использовали ДЭМ (Цимоха и др., 2006, 2007). И если при ДЭМ- и ДР-индуцированном апоптозе картина фосфорилирования по тирозину сходная, то по треонину нет: после воздействия на клетки ДЭМ в отличие от ДР некоторые субъединицы ядерных протеасом дефосфорилированы (Цимоха и др., 2007). Такая разница в фосфорилированности по треонину может свидетельствовать о различных путях выполнения апоптотической программы при действии этих двух индукторов. Однако можно также предположить, что фосфорилирование именно по тирозину участвует в механизмах реализации апоптоза, а фосфорилирование по треонину определяет функционирование протеасом в клетке и не связано напрямую с апоптозом. Так, например, гиперфосфорилирование по треонину может служить сигналом ядерной локализации протеасом в клетке, так как из литературы известно, что при поступлении ДР в клетку он связывается с протеасо-

мой и переносится из цитоплазмы в ядро (Kiyomiya et al., 2001). Так или иначе, очень вероятно, что статус фосфорилирования протеасом определяет их функциональную активность в клетке и что механизм выполнения программы апоптоза независимо от индуктора включает в себя фосфорилирование и дефосфорилирование протеасомных субъединиц.

Ранее было показано, что в индуцированных ДЭМ апоптотических клетках K562 трипсин- и химотрипсин-подобные активности ядерных протеасом усиливаются (Цимоха и др., 2007). Однако мы обнаружили в настоящей работе увеличение только химотрипсин-подобного типа протеолитической активности ядерных протеасом, трипсин-подобная же активность при индукции апоптоза ДР не изменилась. Наблюдаемые отличия в протеолитической активности протеасом при индукции апоптоза ДЭМ (Цимоха и др., 2007) или ДР возможно объяснить различными апоптотическими путями. Однако поскольку популяция протеасом в клетке гетерогенна, увеличение активности общего количества очищенных протеасом совсем не исключает возможности снижения активности какой-либо отдельной популяции протеасом после воздействия индуктора апоптоза. Так, например, учитывая, что при воздействии ДР на клетки в ядро привлекаются протеасомы из цитоплазмы, можно предположить, что изменение активности обусловлено не влиянием индуктора, а изменением общего количества очищенных протеасом, содержащего различные протеасомные субпопуляции с отличной протеолитической активностью.

В настоящее время тот факт, что статус фосфорилирования протеасом регулирует их функционирование в клетке, считается общепризнанным (Bose et al., 1999; Rivett et al., 2001; Fernandez Murray et al., 2002; Iwafune et al., 2002; Bardag-Gorce et al., 2004; Миттенберг и др., 2007). Опираясь на этот факт, мы исследовали влияние дефосфорилирования субъединиц протеасом на ферментативную активность изучаемых частиц при воздействии на клетки различных индукторов апоптоза. И что интересно, характер изменения протеолитической активности ядерных протеасом из клеток K562 после неспецифического дефосфорилирования субъединиц частиц одинаков для двух разных индукторов апоптоза — ДЭМ (Цимоха и др., 2007) и ДР.

В настоящей работе впервые обнаружено, что при использовании различных индукторов клеточной гибели (ДЭМ и ДР) статус фосфорилирования ядерных 26S протеасом по треонину и тирозину изменяется разным образом. Кроме того, и субъединичный состав, и активность ядерных 26S протеасом при воздействии на клетки K562 этих индукторов апоптоза (ДЭМ или ДР) меняются различным образом. Суммируя все представленные в данной работе результаты, можно говорить о перепрограммировании популяции ядерных протеасом при индукции апоптоза в клетках K562, а также высказать предположение об участии специфических видов этих частиц в событиях, происходящих в ядре при реализации программы клеточной гибели.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49606), фонда Президента РФ по поддержке ведущих научных школ (НШ-5332006.4) С.-Петербургского научного центра РАН (2006, 2007 гг.) и с использованием оборудования ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

Список литературы

- 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—147.
- Токтарова М. В., Куличкова В. А., Миттенберг А. Г., Кожухарова И. В., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Пешихонов 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 запрограммированной 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.
- Цимоха А. С., Миттенберг А. Г., Куличкова В. А., Ващукова Е. С., Ватажок Ю. Я., Моисеева Т. Н., Евтеева И. Н., Ермолаева Ю. Б., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2007. Перепрограммирование ядерных протеасом при индукции апоптоза в клетках K562. I. Воздействие глутатионистощающего агента диэтилмалеата. Цитология. 49 (6) : 451—459.
- Цимоха А. С., Миттенберг А. Г., 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.
- Beytte 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., Mason G. G., Rivett A. J. 1999. Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Mol. Biol. Rep. 26 : 11—14.
- Chen F., Chang D., Goh M., Klibanov S. A., Ljungmann M. 2000. Role p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposure to proteasome inhibitors. Cell Growth Differ. 11 : 239—246.
- Chuang C. Y., Chuang L. F. 1979. Inhibition of chicken myeloblastosis RNA polymerase activity by adriamycin. Biochemistry. 18 : 2069—2073.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kiyomiya K., Matsuo S., Kurebe M. 2001. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. Cancer Res. 61 : 2467—2471.
- Kwok J. C., Richardson D. R. 2004. Examination of the mechanism(s) involved in doxorubicin-mediated iron accumulation in ferritin: studies using metabolic inhibitors, protein synthesis inhibitors, and lysosomotropic agents. Mol. Pharmacol. 65 : 181—195.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Le P. T., Maecker H. T., Cook J. E. 1995. In situ detection and characterization of apoptotic thymocytes in human thymus. Expression of bcl-2 in vivo does not prevent apoptosis. J. Immunol. 154 : 4371—4378.
- Lopes U. G., Erhardt P., Yao R., Cooper G. M. 1997. p-53 dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. J. Biol. Chem. 272 : 12 893—12 896.
- 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.
- 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.
- O'Farrell P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250 : 4007—4021.
- 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.
- Rivett A. J., Bose S., Brooks P., Broadfoot K. I. 2001. Regulation of proteasome complexes by gamma-interferon and phosphorylation. Biochimie. 83 : 363—366.
- Sarin A., Adams D. H., Henkart P. A. 1993. Protease inhibitors selectively block T cell receptor-triggered programmed cell death in a murine T cell hybridoma and activated peripheral T cells. J. Exp. Med. 178 : 1693—1700.

Поступила 29 XI 2006

REPROGRAMMING OF NUCLEAR PROTEASOMES IN K562 CELLS UNDERGOING APOPTOSIS.
II. EFFECT OF ANTICANCER DRUG DOXORUBICINA. S. Tsimokha,* A. G. Mittenberg, I. N. Evteeva, V. A. Kulichkova,
I. V. Kojukharova, J. B. Ermolaeva, I. M. KonstantinovaInstitute of Cytology RAS, St. Petersburg,
* e-mail: atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru

The induction of apoptosis in K562 cells by doxorubicin (DR) was used as a model to investigate changes in the subunit composition, phosphorylation state and enzymatic activities of 26S proteasomes in cells undergoing the programmed death. Here we have shown for the first time that proteasomes isolated from the nuclei of control and induced 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 trypsin- and chymotrypsin-like, and the endoribonuclease activities of nuclear 26S proteasomes are affected under influence of DR on K562 cells. Treatment of K562 cells with DR leads to modification of zeta/ $\alpha 5$ and iota/ $\alpha 6$ proteasomal subunits associated with RNase activity of proteasomes. These findings confirm our hypothesis about so-called reprogramming of nuclear proteasomes population in undergoing apoptosis K562 cells which is manifested by changes in proteasomal composition, phosphorylation state, and enzymatic activities during the programmed cell death.

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