

ЭНДОРИБОНУКЛЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНЫХ АЛЬФА-СУБЪЕДИНИЦ ПРОТЕАСОМ

© О. А. Федорова,¹ Т. Н. Мусеева, А. Г. Миттенберг, Н. А. Барлев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
¹ электронный адрес: fedorovaolgand@mail.ru

Протеасома является мультикомпонентным белковым комплексом, состоящим из регуляторной частицы 19S и каталитической частицы 20S. Основной клеточной функцией протеасом является специфическое разрушение различных белков. Было обнаружено, что частица 20S помимо протеолитической активности, осуществляемой субъединицами β -типа, обладает также эндорибонуклеазной активностью, за которую отвечают две субъединицы β -типа ($\alpha 1$ и $\alpha 5$). В данной работе нами впервые показано, что все исследованные рекомбинантные субъединицы α -типа ($\alpha 1$ — $\alpha 5$ и $\alpha 7$) обладают эндорибонуклеазной активностью, которая зависит от используемого РНК-субстрата и присутствия в реакционной смеси двухвалентных катионов. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что эндорибонуклеазная активность протеасом может играть важную роль в клеточном метаболизме РНК.

Ключевые слова: мРНК, протеасома, протеасомные субъединицы α -типа, эндорибонуклеазная активность, *p53*, *c-myc*.

Принятые сокращения: ОТ-ПЦР — метод полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, РНКазная активность — эндорибонуклеазная активность, GST — глутатион-S-трансфераза.

Протеасомы, являющиеся АТФ-зависимыми протеазами, встречаются как в цитоплазме, так и в ядре клеток большинства организмов. Под словом «протеасома» обычно подразумевается 26S протеасома, состоящая из коровой частицы 20S и двух ассоциированных с ней регуляторных комплексов 19S. Основной функцией протеасом является деградация белков в клетке по убиквитинзависимому механизму. Коровая частица состоит из четырех гептамерных колец, каждое из которых образовано субъединицами одного из двух типов — α и β . Протеолитические центры протеасомы расположены на трех субъединицах β -типа — $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$. Субъединицы α -типа обеспечивают доступ субстрата в протеолитическую камеру протеасомы, а также присоединение регуляторных комплексов.

В 1987 г. помимо протеолитической активности впервые было обнаружено наличие у 20S протеасомы эндорибонуклеазной (РНКазной) активности по отношению к РНК вируса табачной мозаики (Akhaayat et al., 1987). Дальнейшие исследования показали, что и 26S-протеасомы также обладают РНКазной активностью (Евтеева и др., 2000, 2003; Миттенберг и др., 2002), причем субстратом для 26S-протеасомы могут выступать как рибосомные, так и информационные РНК (Евтеева и др., 2000; Миттенберг и др., 2002, 2007; Токтарова и др., 2004).

Экспериментально показано, что РНКазная активность протеасом зависит от присутствия в реакционной смеси двухвалентных катионов магния и (или) кальция (Миттенберг и др., 2002) и статуса фосфорилирования протеасом (Миттенберг и др., 2002; Евтеева и др., 2003). Данная активность протеасом также зависит от физиоло-

гического состояния клетки (Миттенберг и др., 2007; Tsimokha et al., 2007).

Иммунохимическими методами показано, что способностью к расщеплению РНК обладают две протеасомные субъединицы α -типа — $\alpha 5$ (зета) и $\alpha 1$ (йота) (Petit et al., 1997). Однако наличие таковой у других протеасомных субъединиц в литературе не описано. Поэтому задачей данной работы явился анализ субъединиц α -типа на способность гидролизовать информационные РНК.

Материал и методика

Клонирование ДНК. Последовательности кДНК протеасомных субъединиц α -типа ($\alpha 1$ — $\alpha 5$ и $\alpha 7$) были получены методом ОТ-ПЦР из тотальной мРНК клеток человека линии K562 с использованием специфических праймеров:

- $\alpha 1$ 5'-ATGCGGATCCGCATGTCCCGTGGTTCCAGCGCC-3'/
5'-CGGAGGATCCGTTAGTCTCTCTCTGCTAGAGCAAC-3',
 $\alpha 2$ 5'-ATGCGGATCCGCATGGCGGAGCGCGGGTAC-3'/
5'-CGGAGGATCCGTTATGCTATGGCAGCAA-3',
 $\alpha 3$ 5'-ATGCGGATCCGCATGTCTCGAAGATATGAC-3'/
5'-CGGAGGATCCGCTATTTATCSTTTTCTTT-3',
 $\alpha 4$ 5'-ATGCGGATCCGCATGAGCTACGACCGCGCC-3'/
5'-CGGAGGATCCGTCATGATGCTTTCTTTTGT-3',
 $\alpha 5$ 5'-ATGCAGATCTGCATGTTTCTTACCCGG-3'/
5'-TGCCAGATCTGAATGTCCTTGATAACCTCT-3',

$\alpha 7$ 5'-ATGCGGATCCGCATGAGCTCAATCGGC-3'/
5'-CGGAGGATCCGTTACATATTATCATC-3'.

Полученные продукты ПЦР были клонированы в экспрессионный вектор pGEX-5X-3, линейаризованный Bam-III, для последующей экспрессии химерных белков. Очистку белка проводили методом аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе (GENeHealth Care, США).

Транскрипция *in vitro*. Транскрипцию 3'-нетранслируемой области мРНК *c-myc* проводили с использованием [α - 32 P] ЦТФ и РНК-полимеразы фага SP6, мРНК *p53* синтезировали в присутствии [α - 32 P] ЦТФ и Т3 РНК-полимеразы.

Инкубацию РНК с химерными белками проводили в буфере, содержащем 20 мМ HEPES, pH 7.6, и 1 мМ АТФ, в течение 30 мин при 37 °С. Соотношение между белком и РНК составляло 1 : 1.

Электрофоретический анализ РНК-гидролизатов проводили в денатурирующих условиях в 5%-ном полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины, в Трис-боратном буфере (90 мМ Трис-борат и 2 мМ ЭДТА, pH 8.3).

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что две субъединицы α -типа ($\alpha 1$ и $\alpha 5$), выделенные из культуры клеток, обладают РНКазной активностью (Petit et al., 1997). Однако наличие таковой у других протеасомных субъединиц в литературе не описано. Более того, в описываемой работе используемые методы выделения индивидуальных субъединиц 20S комплекса (экстракция и последующая ренатурация белков из полиакриламидного геля) заключали в себе возможности контаминации препарата другими субъединицами протеасом, а также неполного восстановления нативной структуры белка. Поэтому в данной работе мы использовали методику получения индивидуальных субъединиц α -типа в гетерологической экспрессионной системе *E. coli*, которая исключала присутствие других протеасомных субъединиц и обеспечивала нативность получаемых препаратов. Использование аффинной хроматографии на основе взаимодействия глутатион-сефарозы с рекомбинантными химерными белками, содержащими фрагмент глутатион-S-трансферазы (GST), позволило существенно повысить степень чистоты исследуемых субъединиц.

Для исследования РНКазной активности очищенных субъединиц в качестве субстратов использовали транскрибированные *in vitro* мРНК *p53* и 3'-нетранслируемую область мРНК *c-myc*.

Чтобы исключить возможный эффект белка GST на РНКазную активность исследуемых химерных белков, в качестве контроля использовали фрагмент GST, выделенный в тех же условиях.

Электрофоретический анализ продуктов гидролиза 3'-нетранслируемой области мРНК *c-myc* (рис. 1) свидетельствует о том, что все исследуемые рекомбинантные белки способны гидролизовать данный РНК-субстрат, в то время как мРНК *p53* подвергалась эндонуклеолизу всеми исследуемыми субъединицами, за исключением $\alpha 3$ (рис. 2, блок $\alpha 3$ -GST). При этом РНКазная активность на обоих субстратах специфически зависела от присутствия в реакционной среде ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} . Также необходимо подчеркнуть, что сам по себе белок GST не проявлял РНКазной активности (рис. 1, 2, блок GST).

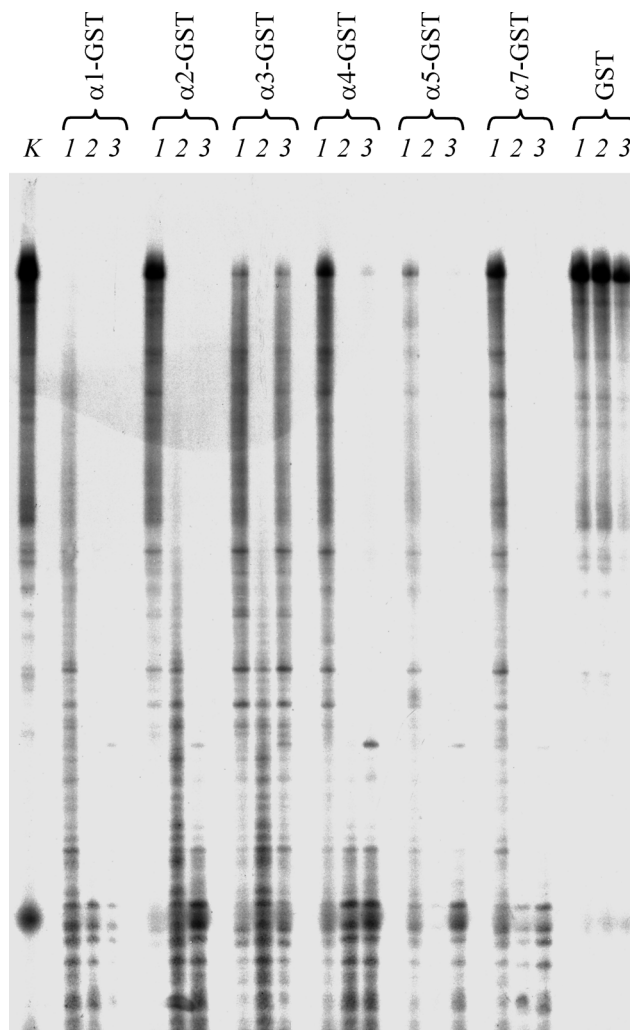


Рис. 1. Радиоавтограф электрофореграммы транскрибированной *in vitro* 3'-нетранслируемой области мРНК *c-myc*, обработанной рекомбинантными белками $\alpha 1$ -GST, $\alpha 2$ -GST, $\alpha 3$ -GST, $\alpha 4$ -GST, $\alpha 5$ -GST, $\alpha 7$ -GST и GST.

K — интактная РНК, 1 — РНК, обработанная рекомбинантными белками в отсутствие двухвалентных катионов, 2 — РНК, обработанная рекомбинантными белками в присутствии 10 мМ MgCl_2 , 3 — РНК, обработанная рекомбинантными белками в присутствии 10 мМ CaCl_2 .

Важно отметить, что в случае субстрата 3'-нетранслируемой области мРНК *c-myc* только рекомбинантные белки $\alpha 1$ и $\alpha 5$ проявляли РНКазную активность в отсутствие двухвалентных катионов (рис. 1, дорожка 1). Остальные исследуемые субъединицы были неактивны в отсутствие ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} (рис. 1, дорожки 2, 3). И если ионы Mg^{2+} во всех случаях активировали РНКазную активность (рис. 1, дорожка 2), то влияние ионов Ca^{2+} зависело от конкретной субъединицы (рис. 1, дорожка 3). Таким образом, можно сделать вывод о том, что все исследуемые нами рекомбинантные субъединицы способны гидролизовать 3'-нетранслируемую область мРНК *c-myc*, но их активность специфически зависела от двухвалентных катионов.

При использовании мРНК *p53* в качестве субстрата ни один из рекомбинантных белков не проявлял РНКазной активности в отсутствие двухвалентных катионов (рис. 2, дорожка 1). Как и в случае субстрата 3'-нетранслируемой области мРНК *c-myc*, ионы Mg^{2+} обладали сти-

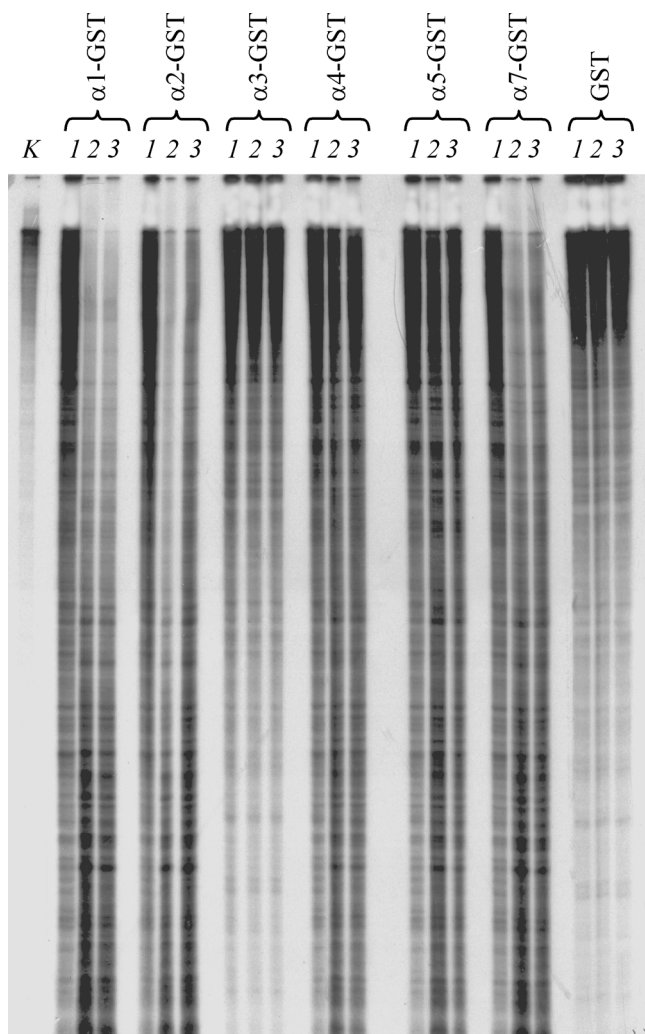


Рис. 2. Радиоавтограф электрофореграммы транскрибированной *in vitro* мРНК *p53*, обработанной рекомбинантными белками $\alpha 1$ -GST, $\alpha 2$ -GST, $\alpha 3$ -GST, $\alpha 4$ -GST, $\alpha 5$ -GST, $\alpha 7$ -GST и GST.

Обозначения те же, что и на рис. 1.

мулирующим эффектом (рис. 2, дорожка 2), влияние же ионов Ca^{2+} на РНКазную активность рекомбинантных субъединиц было избирательным (рис. 2, дорожка 3). При этом субъединица $\alpha 3$ не гидролизовала РНК даже в присутствии двухвалентных ионов (рис. 2, блок $\alpha 3$ -GST).

Результаты наших экспериментов показывают, что все аффинно-очищенные из *E. coli* субъединицы α -типа, слитые с фрагментом GST белка, обладали РНКазной активностью. Важно отметить тот факт, что активность отдельных субъединиц зависела от используемого субстрата и присутствия в реакционной смеси двухвалентных катионов.

Какой физиологический смысл РНКазной активности, ассоциированной с протеасомными субъединицами α -типа? Согласно литературным данным, протеасомы участвуют во множестве биологических процессов, включая регуляцию транскрипции (Mittenberg et al., 2008; Моисеева и др., 2010). Поэтому логично предположить, что участвуя в регуляции транскрипции протеасомы помимо

протеолитических активностей, проявляют и РНКазную активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 10-04-01234 и № 08-04-00834) и программы МКБ.

Список литературы

Евтеева И. Н., Куличкова В. А., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Миттенберг А. Г., Тесленко Л. В., Обухова А. Д., Пенныйнин В. А., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2000. Новая эндорибонуклеазная активность 26S-протеасом из клеток линии А431. 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 эндорибонуклеазной активности 26S-протеасом эпидермальным фактором роста в клетках линии А431: возможное участие протеасом в контроле над стабильностью РНК. Цитология. 45 (5) : 488—492.

Миттенберг А. Г., Куличкова В. А., Медведева Н. Д., Пенныйнин В. А., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2002. Характеристики эндорибонуклеазной активности протеасом из клеток линии К562. II. Анализ нуклеолиза специфических мРНК протеасомами. Цитология. 44 (4) : 357—363.

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 К562. Цитология. 49(2) : 142—148.

Моисеева Т. Н., Миттенберг А. Г., Барлев Н. А. 2010. Роль протеасом в регуляции транскрипции. Цитология. 52 (3) : 195—203.

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 26S-протеасомы и α -РНК-частиц при действии индукторов апоптоза на клетки линии К562: участие α -РНК-частиц и протеасом в контроле над стабильностью РНК при программированной клеточной гибели. Цитология. 46 (3) : 283—290.

Akhayat O., Infante A. A., Infante D., de Martins S. A. C., de Grossi S. A. M. F., Scherrer K. 1987. A new type of prosome-like particle, composed of small cytoplasmic RNA and multimers of a 21-kDa protein, inhibits protein synthesis *in vitro*. Eur. J. Biochem. 170 : 23—33.

Jarrousse A. S., Petit F., Kreuzer-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.

Mittenberg A. G., Moiseeva T. N., Barlev N. A. 2008. Role of proteasomes in transcription and their regulation by covalent modifications. Frontiers in Bioscience. 13 : 7184—7192.

Petit F., Jarrousse A. S., Dahlmann 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. 326 : 93—98.

Tsimokha A. S., Mittenberg A. G., Kulichkova V. A., Kozhukharova I. V., Gause L. N., Konstantinova I. M. 2007. Changes in composition and activities of 26S proteasomes under the action of doxorubicin-apoptosis inducer of erythroleukemic K562 cells. Cell Biol. Int. 31 : 338—348.

Поступила 1 VI 2010

RECOMBINANT PROTEASOMAL ALPHA-TYPE SUBUNITS EXHIBIT
ENDORIBONUCLEASE ACTIVITY

O. A. Fedorova,¹ T. N. Moiseeva, A. G. Mittenberg, N. A. Barlev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: fedorovaolgand@mail.ru

26S proteasome is a multi-subunit protein complex that consists of the regulatory 19S and the catalytic 20S subcomplexes. The major cellular function of the proteasome is protein degradation. It has been found recently that the 20S particle, besides its proteolytic activity, also possesses endoribonuclease activity. The latter is mediated by two α -type subunits ($\alpha 1$ and $\alpha 5$). In this report we have analyzed the remaining α -type subunits for their ability to hydrolyze RNA. We found that all of the recombinant subunits tested exhibited endoribonuclease activity which depended on the origin of RNA and the presence of bivalent ions in the reaction. These results indicate that the endoribonuclease activity of proteasomes may play an important role in cellular metabolism of RNA.

Key words: *c-myc*, endoribonuclease activity, mRNA, proteasomal α -type subunits, proteasome, *p53*.
