

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВНЕ- И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕАСОМ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ K562

© Ю. Я. Зайкова,¹ В. А. Куличкова,¹ Ю. Б. Ермолаева,¹ Л. Н. Гаузе,² А. С. Цимоха^{1,*}

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 проведен сравнительный анализ пептидазных активностей вне- и внутриклеточных протеасом клеток K562. Показано, что экстраклеточные протеасомы активнее по типу химотрипсина, а внутриклеточные — по типу трипсина. Выявлены посттрансляционные модификации (ПТМ) субъединиц 20S-протеасом методом иммуноблотинга. Наблюдается разница в спектре ПТМ ассоциированных с ферментативными активностями субъединиц у вне- и внутриклеточных протеасом ($\beta 2$, $\beta 5$ и $\alpha 5$). Богатым разнообразием ПТМ представлены субъединицы протеасом $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 7$ и $\beta 7$. Сравнение степени фосфорилирования экскретируемых и клеточных протеасом показало снижение уровня фосфорилирования протеасом при выходе их из клеток, что позволяет предположить участие фосфорилирования и дефосфорилирования в регуляции экскреции протеасом из клеток.

Ключевые слова: пептидазные активности, посттрансляционные модификации, серин, тирозин, треонин, фосфорилирование, экстраклеточные протеасомы.

Принятые сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель, ПТМ — посттрансляционные модификации.

Убиквитин-протеасомная система осуществляет программированный протеолиз и процессинг различных регуляторных белков, участвующих во множестве клеточных процессов, включая регуляцию транскрипции, репарацию ДНК, продвижение клетки по клеточному циклу, иммунный ответ и апоптоз (Konstantinova et al., 2008; Моисеева и др., 2010а; Цимоха, 2010). Протеолитическим «ядром» этой системы является белковый комплекс — 26S-протеасома, часто называемый просто протеасома.

Согласно современным представлениям, протеасомы в клетке вездесущи: находятся в ядре и в цитоплазме. В последнее время в литературе появились данные о присутствии протеасом во внеклеточном пространстве (Lavabre-Bertrand et al., 2001; Stoebner et al., 2005; Sixt et al., 2007, 2009; Sixt, Dahlmann, 2008; Albright et al., 2009; Henry et al., 2009; Sixt, Peters, 2010). Методом электронной микроскопии показано, что внеклеточные протеасомы имеют аналогичную клеточным частицам структуру (Zoeger et al., 2006). Биологические функции внеклеточных протеасом неясны, однако были выявлены различия в количестве экспортируемых из клеток в плазму протеасом при опухолевой трансформации клеток (Lavabre-Bertrand et al., 2001; Stoebner et al., 2005; Henry et al., 2009). Кроме того, также наблюдается увеличение концентрации протеасом во внеклеточном альвеолярном пространстве при дыхательной недостаточности и во время воспалительных процессов в легких (Sixt et al., 2007, 2009; Albright et al., 2009). Авторы предполагают, что накопление экстраклеточных протеасом связано прежде всего с необходимостью

стю «расчистки территории» — избавление от накапливающихся во внеклеточном пространстве белков и активация секретируемых клеткой белков-предшественников, а также процессинг антигенов.

Однако в рассмотренных выше исследованиях сделана оценка лишь количества и удельной протеолитической активности внеклеточных протеасом. Анализа самих экстраклеточных протеасом ни по присущим им ферментативным активностям, ни по присутствию специфических посттрансляционных модификаций (ПТМ) сделано не было. Недавно мы исследовали пептидазные и эндогенобонуклеазные активности протеасом, экскретируемых клетками линии A431 (Куличкова и др., 2004). Оказалось, что выделяемые в культуральную среду протеасомы отличаются от цитоплазматических частиц не только по удельной эндогенобонуклеазной активности, но и по ее зависимости от двухвалентных катионов. Опираясь на данные по пептидазным активностям протеасом, мы сделали вывод о возможной регуляции протеолитической активности убиквитин-протеасомной системы в клетке за счет избирательного выделения из клетки специфической субпопуляции протеасом.

Подводя итоги, можно сделать вывод о том, что причины экскреции протеасом клетками неизвестны и что существуют лишь гипотезы, которые пытаются дать объяснение этому явлению. Поэтому любые исследования внеклеточных протеасом являются крайне актуальными. В данной работе мы поставили перед собой задачу сравнить цитоплазматические и внеклеточные протеасомы по присутствию у протеасомных субъединиц ПТМ.

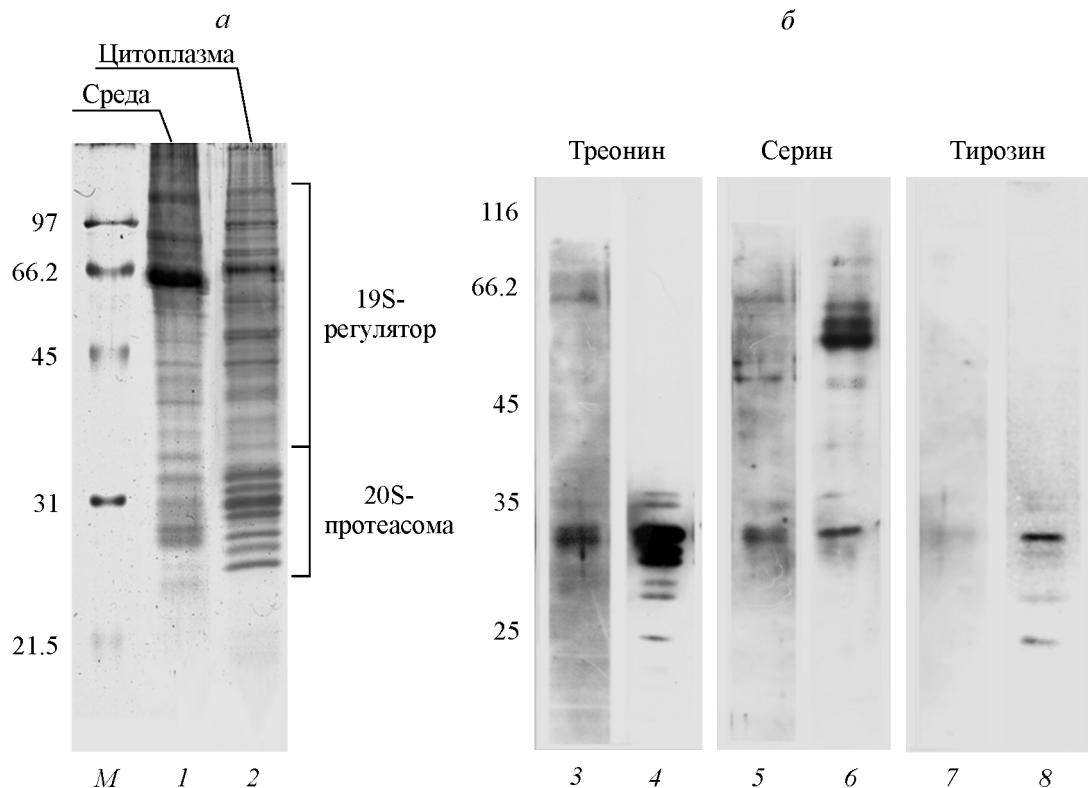


Рис. 1. Электрофоретическое разделение субъединиц 26S-протеасом, выделенных из кондиционированной клетками K562 среды (дорожки 1, 3, 5, 7) и цитоплазмы (дорожки 2, 4, 6, 8) клеток K562. Сравнительный анализ субъединиц этих протеасом, фосфорилированных по треонину, серину и тирозину.

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

Материал и методика

Клетки прозритролейкемии человека линии K562, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН), культивировали при 37 °C в среде RPMI 1640, содержащей 10 % эмбриональной тельчей сыворотки, в присутствии 0.004 % гентамицина.

Протеасомы выделяли из цитоплазмы и кондиционированной клетками ростовой среды с помощью центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы (15—30 %) и ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 (Hough et al., 1987).

Вестерн-блоттинг белков протеасом с применением вторичных антител, коньюгированных с пероксидазой хрена, выполняли, следуя рекомендациям фирмы (Sigma, США). Пероксидазу выявляли с помощью кита SuperSignal (Pierce, США). Протеасомы фракционировали на белковые субъединицы методом двумерного электрофореза белков, который проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя (GE Healthcare, США). В первом направлении ПААГ содержал амфолины pH 3—10. Во втором направлении (после изофокусирования) протеасомы фракционировали на белковые субъединицы в денатурирующем 12%-ном ПААГ (Laemmli, 1970). Полученные фракции электрофоретически переносили на нитроцеллюлозные фильтры (Hybond C extra, GE Healthcare) в буфере, содержащем 25 mM Трис-HCl, 190 mM глицина, 0.05 % додецилсульфата натрия и 20 % метанола, pH 7.3. Мембранны отмывали в буфере TBS (10 mM Трис-HCl, pH 7.5, и 150 mM 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 TPBS и мембранны инкубировали с поликлональными антителами против фосфотреонина (Cell Signaling, США), с моноклональными антителами против фосфотирозина (Cell Signaling, США) и фосфосерина (Sigma, США) или со специфическими антителами против субъединиц 20S-протеасомы (Biomol International LP, Англия).

Результаты и обсуждение

Для анализа степени очистки белковых комплексов препараты 26S-протеасом, выделенных из цитоплазмы клеток K562 и кондиционированной клетками среды, фракционировали при помощи метода одномерного электрофореза белков. Картина распределения белков, представленная на рис. 1, *a*, соответствует общепринятой картине распределения протеасомных белков в системе одномерного электрофореза (Leggett et al., 2005). Однако препараты внеклеточных протеасом обогащены сывороточными белками, что требует соответствующей коррекции при выравнивании концентрации белка между пробами цитоплазматических и экстраклеточных протеасом для двумерного электрофоретического разделения белков в исследовании ПТМ субъединиц протеасом, а также для измерения пептидазных активностей протеасом. Мы считали коэффициент поправки для пересчета концент-

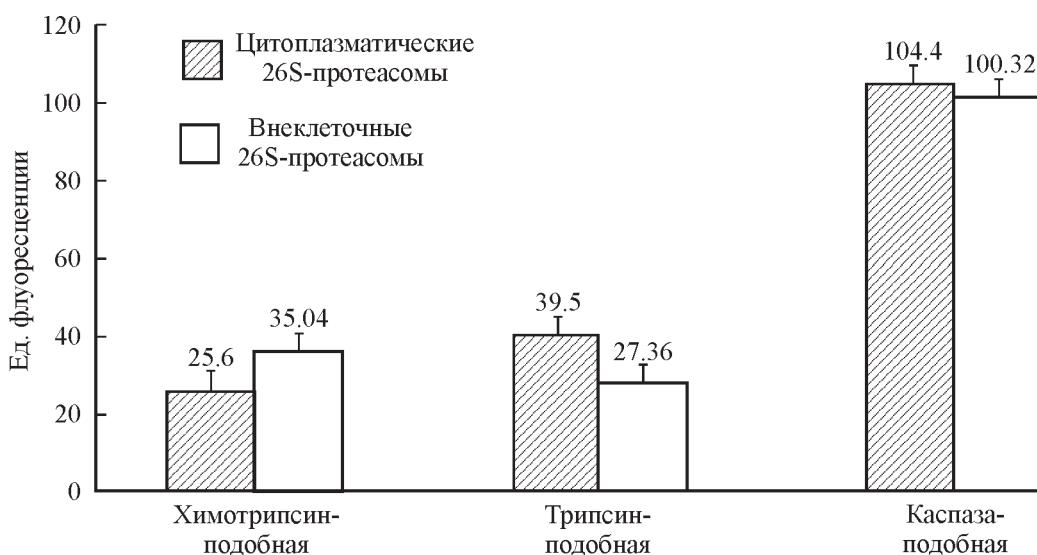


Рис. 2. Пептидазные активности вне- и внутриклеточных протеасом клеток линии K562.

Приведены средние значения и стандартные отклонения трех независимых определений флуоресценции освобожденного (7-амино)-4-метилкумарина; 100 ед. флуоресценции соответствует освобождению 50 пмоль продукта ((амино)-4-метилкумарины). Концентрация протеасом во всех пробах составляет 5 мкг.

активации внеклеточных протеасом, равный 1.6, используя программное обеспечение TotalLab v2.01 (TotalLab Limited, Великобритания).

Активность протеасом определяли по гидролизу флуорогенных олигопептидов, специфичных для протеолитических центров протеасом (трипсин-, химотрипсин- и каспаза-подобных). На рис. 2 представлена диаграмма сравнения активностей цитоплазматических и внеклеточных протеасом. Интересен тот факт, что внеклеточные протеасомы отличались от внутриклеточных по химотрипсин- и трипсин-подобным активностям, причем экстраклеточные протеасомы активнее по типу химотрипсина, а внутриклеточные — по типу трипсина.

Изменения активности протеасом в клетке принято связывать прежде всего с различными ПТМ протеасомных белков (Wang et al., 2007; Моисеева и др., 2010а). Мы фракционировали препараты очищенных протеасом при помощи метода двумерного электрофореза, после чего выявили ПТМ методом иммуноблоттинга со специфическими антителами к белкам 20S-протеасомы (рис. 3). Следует напомнить, что появление различных изоформ белков определяется не только наличием ПТМ, но также транскрипцией изоформ генов или альтернативным сплайсингом. Однако в настоящей работе мы для удобства будем использовать лишь термин ПТМ, анализируя данные, представленные на рис. 3.

Пептидазные активности протеасом ассоциированы с тремя субъединицами β -типа: трипсин-подобная осуществляется субъединицей β_2 , химотрипсин-подобная — β_5 , каспаза-подобная — β_1 . Как видно на рис. 3, а, субъединица β_2 цитоплазматических протеасом представлена большим разнообразием изоформ, в то время как эта субъединица у внеклеточных протеасом имеет лишь одну форму. Также можно заметить, что субъединица β_5 цитоплазматических и внеклеточных протеасом имеет две формы, однако мы наблюдаем некоторое перераспределение между количеством представленных изоформ субъединицы. Субъединица β_1 и у клеточных, и у внеклеточных протеасом окрашена на иммунограмме одним «пятном», что соответствует одинаковой активности по типу

каспазы у этих популяций протеасом (рис. 2). Субъединицы β_3 и β_7 также представлены различным спектром ПТМ у вне- и внутриклеточных протеасом, однако мы затрудняемся охарактеризовать функциональное значение данных ПТМ этих субъединиц.

Следует отметить тот факт, что активность протеасом в клетке определяется не только активными центрами на β -субъединицах, но и субъединицами α -типа, которые формируют «входное отверстие» в протеолитическую камеру 20S-протеасомы и обеспечивают взаимодействие 20S-протеасомы с регуляторными комплексами. Кроме того, активность протеасом определяется функционированием регуляторов протеасом (в частности, 19S-комплекса) и деятельностью убиквитин-связывающей системы.

Мы понимаем, что вероятность того, что различные ПТМ субъединиц протеасом α -типа оказывают прямое воздействие на каталитические центры протеасом, крайне мала, однако именно ПТМ α -белков протеасом могут регулировать доступ субстрата в протеолитическую камеру протеасомы и влиять на присоединение регуляторных комплексов, что также определяет протеасомную ферментативную активность.

Данные, представленные на рис. 3, б, демонстрируют авторадиограммы протеасомных субъединиц α -типа. Между вне- и внутриклеточными протеасомами наибольшие различия в количестве и картине распределения «пятен» на авторадиограмме мы наблюдали у субъединиц α_2 , α_4 , α_5 и α_6 . Согласно литературным данным (Petit et al., 1997; Dielen et al., 2011), с субъединицей α_5 ассоциирована эндорибонуклеазная активность протеасом. Следует отметить, что в ранней работе (Куличкова и др., 2004) мы показали различия в эндорибонуклеазной активности по отношению к высокомолекулярной клеточной РНК между внутри- и внеклеточными протеасомами. Так, экстраклеточные протеасомы были неактивны по отношению к суммарной РНК. Сравнивая ПТМ субъединицы α_5 , мы видим на рис. 3, б, что у внеклеточных протеасом данная субъединица представлена большим числом «пятен» на авторадиограмме. Напрашивается вывод о том, что появление различных ПТМ на данной субъединице протеа-

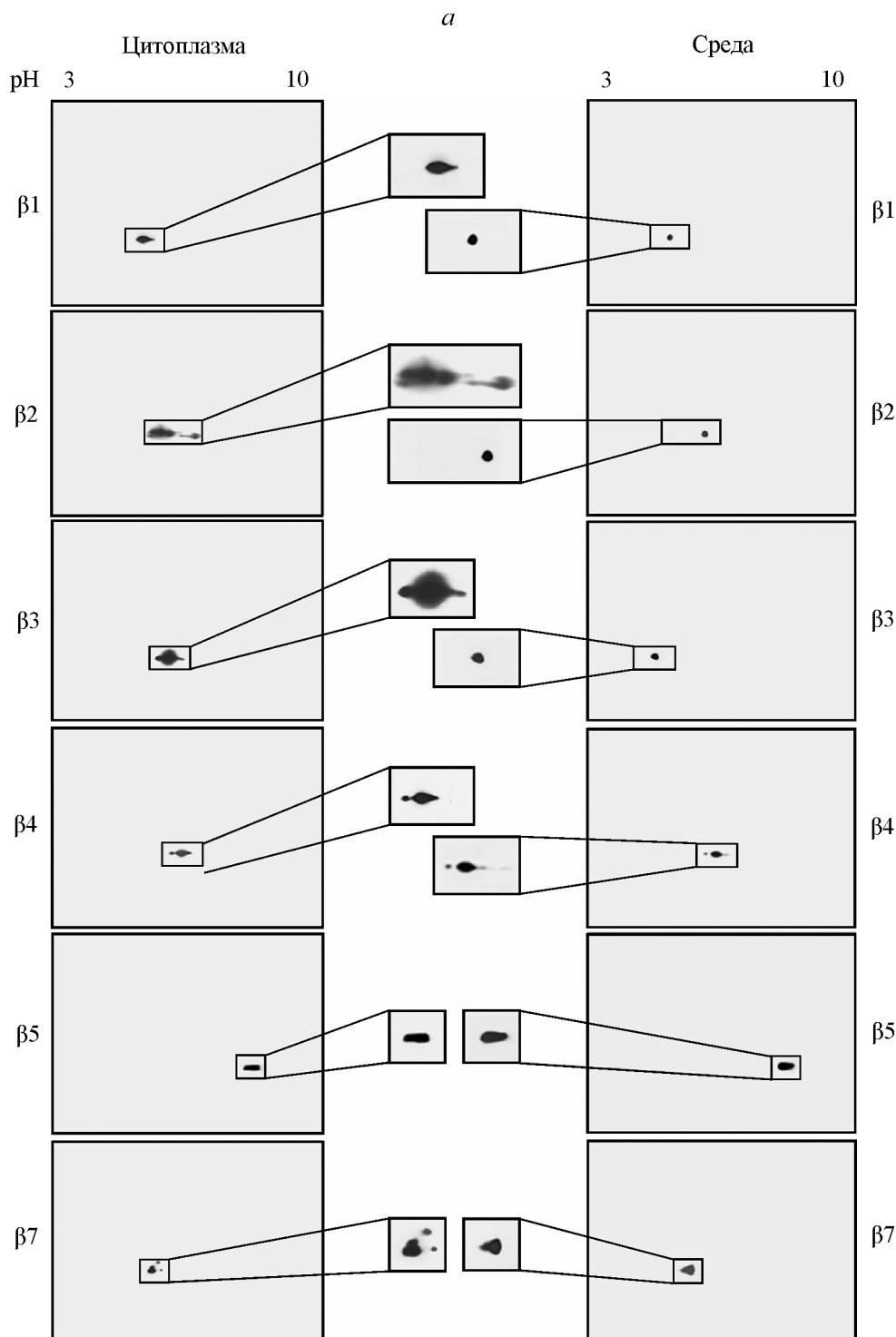


Рис. 3. Двумерное электрофоретическое разделение субъединиц 26S-протеасом, выделенных из цитоплазмы клеток K562 (слева, Цитоплазма) и среды, кондиционированной клетками K562 (справа, Среда).

a — иммунохимическое выявление субъединиц 20S-протеасомы β -типа; *b* — иммунохимическое выявление субъединиц 20S-протеасомы α -типа.

сом ингибирует эндорибонуклеазную активность по отношению к тотальной РНК. Однако в той же работе мы показали, что внеклеточные протеасомы активнее расщепляли транскрибированную *in vitro* 3'-нетранслируемую область мРНК *c-myc*, чем внутриклеточные частицы. Поэтому мы считаем, что модификация α -субъединицы изменяет специфичность данной протеасомной активности по отношению к субстрату.

Большим разнообразием ПТМ представлена субъединица α 4 (рис. 3, *b*). Согласно литературным данным (Archer et al., 2004; Hirano et al., 2005), субъединицы протеасом α 4, α 5 и α 7 инициируют сборку протеасомы, и появление ПТМ вполне может регулировать этот процесс. Кроме того, субъединица α 7 связывает потенциальные субстраты для убиквитин-независимой деградации протеасомой (Touitou et al., 2001) и субъединицу серин-треони-

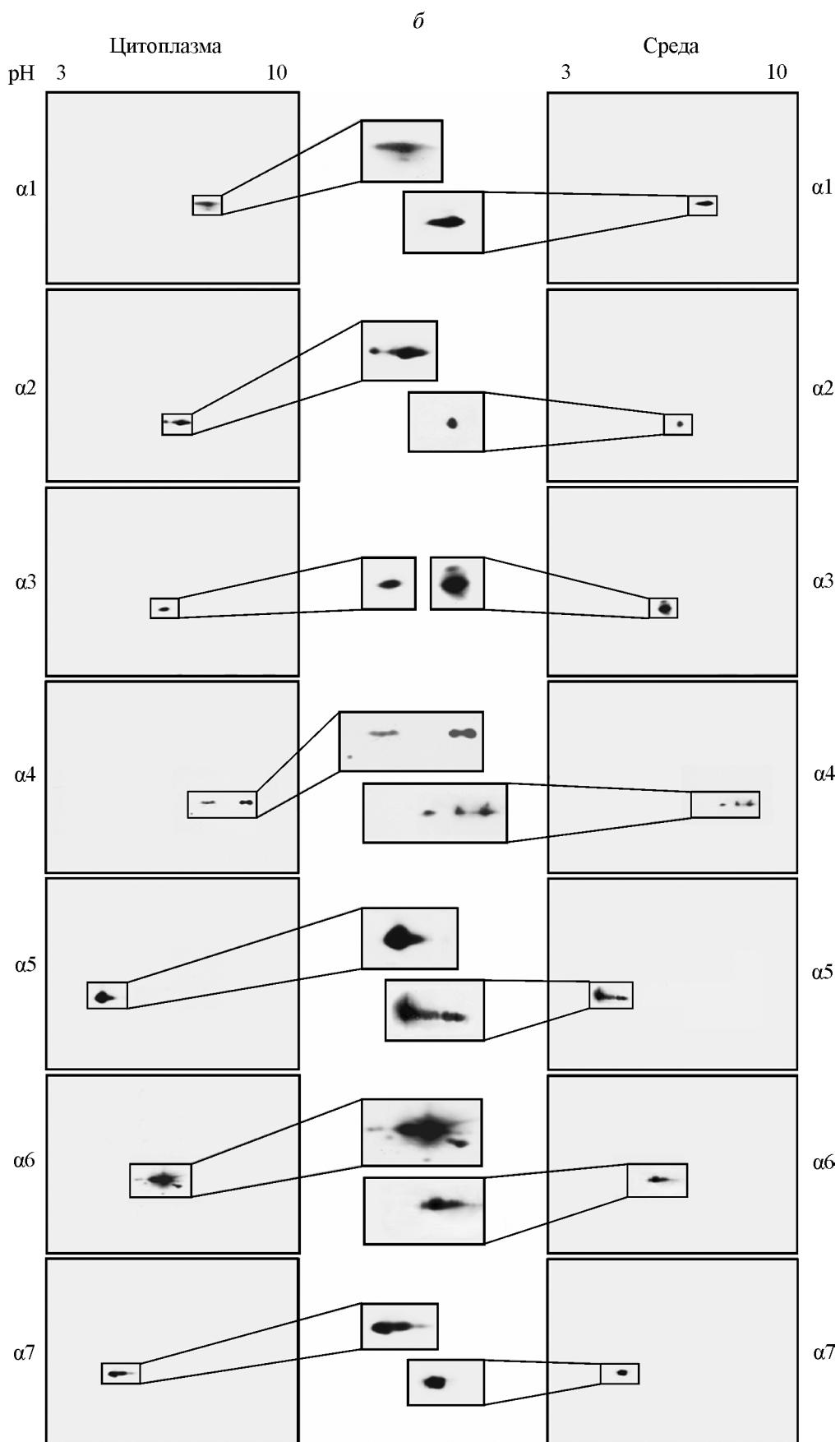


Рис. 3 (продолжение).

новой фосфатазы, которая модулирует уже саму протеасомную активность в клетке (Li et al., 2011). Мутация субъединицы α_4 , предотвращающая фосфорилирование тирозина, приводила к замедлению прохождения фаз G₁/S и S/G₂ клеточного цикла (Liu et al., 2006). В связи с отсутствием данных о функциональном значении ПТМ субъединиц α_2 и α_6 мы не можем объяснить различия в спектрах ПТМ этих субъединиц у вне- и внутриклеточных протеасом.

В попытке оценить вклад фосфорилирования в ПТМ протеасомных субъединиц мы сравнили уровни фосфорилирования субъединиц вне- и внутриклеточных протеасом с помощью иммуноблотинга с применением поликлональных антител против фосфотреонина и моноклональных антител против фосфoserина и фосфотирозина (рис. 1, б). Оказалось, что при выходе протеасом из клеток происходило количественное снижение степени фосфорилирования по всем трем аминокислотам.

Согласно данным нашей недавней работы (Моисеева и др., 2010б), у цитоплазматических протеасом из клеток K562 фосфорилирована субъединица α_7 по Ser-250, что соответствует представленным на рис. 1, б данным, где мы можем видеть полосу на авторадиограмме, соответствующую мол. массе 29 кДа.

В литературном обзоре Константиновой и соавторов (2008) представлена сводная таблица ПТМ субъединиц протеасом, в соответствии с которой у человека протеасомы фосфорилированы по субъединицам 20S (α_2 , α_3 , α_5 , α_7 ; β_2 , β_7) и 19S (Rpn1, 2, 6, 8, 10, 11; Rpt3, 5, 6) комплексов. Причем все эти субъединицы фосфорилированы по серину и тирозину, по треонину фосфорилированы лишь субъединицы 19S комплекса Rpn2 и 8 (мол. массы 105 и 37 кДа соответственно). Однако наши данные, представленные на рис. 1, б, указывают на фосфорилирование по треонину именно субъединиц цитоплазматической 20S-протеасомы. Такое несоответствие литературным данным мы объясняем тем фактом, что ПТМ белков выявляют методом масс-спектрометрии, который имеет определенные ограничения и недостатки. Так, наша попытка идентификации модификаций белков протеасом из клеток K562 при помощи tandemной масс-спектрометрии дала весьма ограниченный набор ПТМ (Моисеева и др., 2010б). Мы полагаем, что данная проблема состоит как в чувствительности метода масс-спектрометрии, так и в устойчивости самих ПТМ, которые в процессе выделения и очистки протеасом могут быть потеряны при воздействии различных клеточных ферментов. Так, например, выявленное убиквитинирование субъединиц α_6 , α_7 и β_1 никак не было отражено сдвигом субъединиц на электрофорограмме (Моисеева и др., 2010б). Тем не менее данную ПТМ выявляют по присутствию двух остатков глицина, появляющихся при обработке проб трипсином для дальнейших масс-спектрометрических исследований. Однако эти же два остатка глициновой аминокислоты оставляют и трипсин-подобные клеточные протеазы, отщепляя убиквитин во время клеточного лизиса, что не мешает их масс-спектрометрически детектировать и определять как убиквитинирование. В случае фосфорилирования, к сожалению, потеря фосфатов является критичной для масс-спектрометрической идентификации этих ПТМ белков.

Опираясь на литературные данные о ПТМ протеасомных белков (Konstantinova et al., 2008), мы знаем, что у человека обнаружено ацетилирование субъединиц α_4 , α_5 , α_6 , α_7 и β_3 , 4. Кроме того, протеасомные субъединицы α_6 , α_7 и β_1 убиквитинированы (Моисеева и др., 2010б).

Анализ данных настоящей работы не дает нам ответ на вопрос о том, какие ПТМ присутствуют у субъединиц протеасом, выделенных из клеток K562 и кондиционированной среды, для этого необходимо провести масс-спектрометрическое исследование. Однако в настоящей работе мы не ставили перед собой задачу идентифицировать ПТМ протеасом клеток K562, а сравнивали лишь спектры ПТМ вне- и внутриклеточных протеасом. В соответствии с этим мы показали, что внеклеточные протеасомы отличаются от клеточных по трипсин- и химотрипсин-подобным пептидазным активностям. Кроме того, субъединицы, с которыми ассоциированы данные активности, имеют различные ПТМ. Также мы показали, что вне- и внутриклеточные протеасомы имеют различные спектры ПТМ некоторых субъединиц. Мы попытались проанализировать функциональный смысл наблюдавшегося явления, однако выявить те ПТМ, которые могут определять сигнал экспорта протеасом из клеток, мы в настоящей работе не можем. Тем не менее общее снижение степени фосфорилирования протеасом при экскреции из клеток можно рассматривать как механизм выхода протеасом во внеклеточное пространство.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01234), Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (П1389) 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., Евтеева И. Н., Кожухарова И. В., Гаузе Л.Н., Константинова И. М. 2004. Специфичность популяции протеасом, экскретируемых из клеток в культуральную среду. Докл. АН. 399 (5) : 503—506.
- Моисеева Т. Н., Миттенберг А. Г., Барлев Н. А. 2010а. Протеасомы и их роль в регуляции транскрипции. Цитология. 52 (3) : 195—203.
- Моисеева Т. Н., Фёдорова О. А., Цимоха А. С., Миттенберг А. Г., Барлев Н. А. 2010б. Влияние убиквитинирования на пептидазные активности протеасом при генотоксическом стрессе. Докл. АН. 435 (2) : 267—271.
- Цимоха А. С. 2010. Протеасомы: участие в клеточных процессах. Цитология. 52 (4) : 277—300.
- Albright J. M., Romero J., Saini V., Sixt S. U., Bird M. D., Kovacs E. J., Gamelli R. L., Peters J., Majetschak M. 2009. Proteasomes in human bronchoalveolar lavage fluid after burn and inhalation injury. J. Burn. Care Res. 30 : 948—956.
- Apcher G. S., Maitland J., Dawson S., Sheppard P., Mayer R. J. 2004. The alpha₄ and alpha₇ subunits and assembly of the 20S proteasome. FEBS Lett. 569 : 211—216.
- Dielein A. S., Sasaki F. T., Walter J., Michon T., Ménard G., Pagny G., Krause-Sakate R., Maia Ide G., Badaoui S., Le Gall O., Candresse T., German-Retana S. 2011. The 20S proteasome α_5 subunit of *Arabidopsis thaliana* carries an RNase activity and interacts in planta with the Lettuce mosaic potyvirus HcPro protein. Mol. Plant Pathol. 12 : 137—150.
- Henry L., Lavabre-Bertrand T., Vercambre L., Ramos J., Carrillo S., Guiraud I., Pouderoux P., Bismuth M., Valats J. C., Demattei C., Duny Y., Chaze I., Funakoshi N., Bureau J. P., Daëres J. P., Blanc P. 2009. Plasma proteasome level is a reliable early marker of malignant transformation of liver cirrhosis. Gut. 58 : 833—838.
- Hirano Y., Hendil K. B., Yashiroda H., Iemura S., Nagane R., Hioki Y., Natsume T., Tanaka K., Murata S. 2005. A heterodimeric

- complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature.* 437 : 1381—1385.
- Hough R., Pratt G., Rechsteiner M. 1987. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 262 : 8303—8313.
- Konstantinova I. M., Tsimokha A. S., Mittenberg A. G. 2008. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 267 : 59—124.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.
- Lavabre-Bertrand T., Henry L., Carillo S., Guiraud I., Ouali A., Dutaud D., Aubry L., Rossi J. F., Bureau J. P. 2001. Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies. *Cancer.* 92 : 2493—2500.
- Leggett D. S., Glickman M. H., Finley D. 2005. Purification of proteasomes, proteasome subcomplexes, and proteasome-associated proteins from budding yeast. *Methods Mol. Biol.* 301 : 57—70.
- Li N., Zhang Z., Zhang W., Wei Q. 2011. Calcineurin B subunit interacts with proteasome subunit alpha type 7 and represses hypoxia-inducible factor—1 α activity via the proteasome pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405 : 468—472.
- Liu X., Huang W., Li C., Li P., Yuan J., Li X., Qiu X. B., Ma Q., Cao C. 2006. Interaction between c-Abl and Arg tyrosine kinases and proteasome subunit PSMA7 regulates proteasome degradation. *Mol. Cell.* 22 : 317—327.
- 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.
- Sixt S. U., Adamzik M., Spyrkova D., Saul B., Hakenbeck J., Wohlschlaeger J., Costabel U., Kloss A., Giesebeck J., Dahlmann B., Peters J. 2009. Alveolar extracellular 20S proteasome in patients with acute respiratory distress syndrome. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 179 : 1098—1106.
- Sixt S. U., Beiderlinden M., Jennissen H. P., Peters J. 2007. Extracellular proteasome in the human alveolar space: a new housekeeping enzyme? *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 292 : L1280—L1288.
- Sixt S. U., Dahlmann B. 2008. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin — incidence and relevance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1782 : 817—823.
- Sixt S. U., Peters J. 2010. Extracellular alveolar proteasome: possible role in lung injury and repair. *Proc. Amer. Thorac. Soc.* 7 : 91—96.
- Stoebner P. E., Lavabre-Bertrand T., Henry L., Guiraud I., Carillo S., Dandurand M., Joujoux J. M., Bureau J. P., Meunier L. 2005. High plasma proteasome levels are detected in patients with metastatic malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.* 152 : 948—953.
- Touitou R., Richardson J., Bose S., Nakanishi M., Rivett J., Allday M. J. 2001. A degradation signal located in the C-terminus of p21^{WAF1/CIP1} is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *EMBO J.* 20 : 2367—2375.
- Wang X., Chen C., Baker P. R., Chen P., Kaiser P., Huang L. 2007. Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex. *Biochemistry.* 46 : 3553—3565.
- Zoeger A., Blau M., Egerer K., Feist E., Dahlmann B. 2006. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clin. Chem.* 52 : 2079—2086.

Поступила 1 III 2011

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF EXTRA- AND INTRACELLULAR PROTEASOMES FROM K562 CELL LINE

Yu. Ia. Zaykova,¹ V. A. Kulichkova,¹ Yu. B. Ermolaeva,¹ L. N. Gause,² A. S. Tsimokha^{1,}*

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

The comparative analysis of peptidase activities of extra- and intracellular proteasomes was carried out. Here we have shown that excreted proteasomes exhibit higher chymotrypsin-type and lower trypsin-like peptidase activities than cytoplasmic particles. Posttranslational modifications (PTMs) of 20S proteasomal subunits were revealed by immunoblotting techniques. We have observed the difference in PTMs associated with enzymatic activities subunits β 2, β 5 and α 5 of extracellular and cytoplasmic proteasomes. Proteasomal subunits α 2, 4, 7 and β 7 also had a variety of PTMs. The phosphorylation level of excreted proteasomes was lower compared to that of the intracellular ones. This observation strongly suggests the involvement of this PTM in the regulation of proteasomes excretion from cells.

Key words: extracellular proteasomes, peptidase activities, phosphorylation, posttranslational modifications, serine, threonine, tyrosine.