

**СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК НЕК293,
СТАБИЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ПРОТЕАСОМНУЮ СУБЪЕДИНИЦУ PSMD14,
СЛИТУЮ С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ БЕЛКОМ EGFP
И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ НТВН**

© В. А. Куличкова,¹ Ю. Я. Зайкова,¹ Ю. Б. Ермолаева,¹ Е. В. Виноградова,² Л. Хуанг,³
А. Н. Томилин,¹ Н. А. Барлев,^{1, 4, 5} А. С. Цимоха^{1, *}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ² С.-Петербургский государственный университет,
³ Калифорнийский университет, США, ⁴ С.-Петербургский государственный технологический институт и
⁵ Университет г. Лестер, Великобритания;

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

В настоящей работе селекционирована стабильная клеточная линия на основе эмбриональных клеток почек человека НЕК293, экспрессирующая протеасомную субъединицу PSMD14, слитую с зеленым флуоресцентным белком EGFP и последовательностью НТВН. Показано, что белок PSMD14-EGFP-НТВН встраивается в протеасомы и такие комплексы обладают основной для протеасом химотрипсин-подобной пептидазной активностью. Сконструированная и селекционированная клеточная линия может использоваться в дальнейших флуоресцентных исследованиях локализации протеасом в клетке.

Ключевые слова: аффинная очистка, зеленый флуоресцентный белок, химотрипсин-подобная пептидазная активность, протеасомы.

Принятые сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель, ПЦР — полимеразная цепная реакция, EGFP — модифицированный зеленый флуоресцентный белок, НТВН — сложный полипептид, состоящий из двух последовательностей из шести гистидинов (Н), специфического сайта расщепления TEV-протеазой (Т) и сигнальной последовательности для биотинилирования *in vivo* (В), GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

26S протеасома — это мультисубъединичный белковый комплекс, который осуществляет регулируемый убиквитин-зависимый и убиквитин-независимый протеолиз белка в клетке (Konstantinova et al., 2008; Моисеева et al., 2010; Цимоха, 2010). 26S протеасома состоит из протеолитического ядра — 20S протеасомы и одного или двух 19S регуляторов. 20S протеасома представляет собой полый цилиндр, состоящий из четырех сложенных в стопку гептамерных колец: два внешних кольца образованы субъединицами α -типа, два внутренних — субъединицами β -типа. 19S регуляторный комплекс протеасом состоит из шести АТФазных (Rpt1-6) и девяти не АТФазных (Rpn1—12) субъединиц. 19S комплекс служит для узнавания убиквитинированных белков и подготовки их к деградации в 20S каталитической протеасоме (Mittenberg et al., 2008).

Согласно современным представлениям, протеасомы в клетке находятся в ядре и в цитоплазме, что неудивительно в силу крайней важности убиквитин-протеасомного протеолиза для регуляции основных клеточных процессов (Konstantinova et al., 2008). Ни для кого не секрет, что большая часть исследований клеточной локализации белка осуществляется с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. Главным недостатком такого метода помимо ограниченной чувствительности и неспецифиче-

ской флуоресценции является необходимость в фиксации клеток, что не позволяет использовать этот подход в прижизненных исследованиях клетки, например с помощью техники *time-lapse*. В последнее время проводится все больше исследований, в которых используют зеленый флуоресцирующий белок (GFP) или другие флуоресцирующие белки в качестве прижизненного маркера для изучения разнообразных процессов внутри не только клетки, но и всего организма в целом (Ikawa et al., 1999). Наиболее часто в таких исследованиях используют генно-инженерные подходы для создания слитых с GFP белков (Misteli, Spector, 1997; Tsien, 1998; Lippincott-Schwartz et al., 2001), что позволяет не просто изучать локализацию белка, но и наблюдать за его транспортом в живых и нормально функционирующих клетках. В большинстве случаев такой слитый с GFP белок сохраняет свою функцию, его локализация или активность не изменяется (Bastiaens, Pepperkok, 2000; Lippincott-Schwartz et al., 2001). Однако в случае, когда изучаемый белок в клетке функционирует в комплексе с другими белками, крайне важно контролировать эти параметры (локализацию или активность) у слитого с GFP белка в составе белкового комплекса.

В литературе встречаются работы, в которых различные протеасомные субъединицы 20S коровей частицы (PSMA4, PSMA3, PSMA1 и PSMB9) и 19S регулятора

(PSMD14 и PSMC2) маркировали флуоресцентным белком (Reits et al., 1997; Enenkel et al., 1998; Wilkinson et al., 1998; Baldin et al., 2008; Miles et al., 2013). Несмотря на то что во всех упомянутых работах авторы наблюдали флуоресценцию, лишь при экспрессии слитого с GFP белка в дрожжах (Enenkel et al., 1998; Wilkinson et al., 1998) показано, что химерный флуоресцентный белок в клетке находится только в составе протеасом и не присутствует в свободном состоянии. Такой контроль крайне важен, особенно в случае создания слитого с GFP белка на основе субъединиц α -типа или каталитических β -субъединиц, в силу того что некоторые из этих протеасомных белков находятся в клетке в свободном от протеасом состоянии (Archer et al., 2004; Moiseeva et al., 2013).

Принимая во внимание тот факт, что интересы исследователей не ограничиваются лишь наблюдением за локализацией изучаемых белков в клетках, важно иметь возможность анализировать их биологическую функцию. В связи с этим мы подошли к вопросу о создании клеточной линии, которая бы стабильно экспрессировала протеасомную субъединицу, не только слитую с флуоресцирующим белком, но также имеющую специфический участок, который бы использовался при выделении и очистке протеасом.

Материал и методика

Клетки почки эмбриона человека линии HEK293, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН), культивировали при 37 °C в среде DMEM, содержащей 10 % сыворотки плодов коров, в присутствии пенициллин-стрептомицина.

Экспрессионную конструкцию получили на основе вектора pQCXIP (Clontech, США), в который по сайтам NotI и EcoRI вставлена последовательность hPSMD14-НТВН (любезно предоставлен д-ром Л. Хуангом; Wang et al., 2007). Между последовательностями hPSMD14 и НТВН по сайту рестрикции PacI мы вставили последовательность EGFP, которую амплифицировали с вектора pCX-EGFP (Addgene, США) с помощью праймеров 5'-ССТТААТТААТГАТГГТГАГСААГГГСГАГГАГСТГТТС-3' и 5'-GGTТААТТААСТТГТАСАГСТСГТССАТГССГАГА-3', включающих в себя сайты рестрикции для PacI. Наличие, ориентацию и точность вставки в векторе определяли с помощью рестрикции и итоговым секвенированием.

Трансфекцию клеток проводили с помощью реагента TurboFect (MBI Fermentas, Литва) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Через 24 ч после постановки трансфекции клеткам заменяли трансфекционную среду на новую, содержащую антибиотик пурамицин (Invitrogen, США). Селекцию клеток проводили в течение 1 нед.

Для приготовления клеточного экстракта клетки промывали холодным PBS и лизировали в буфере А (50 mM Na-фосфат, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 % глицерин, 5 mM АТФ, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 0.5 % NP-40 и ингибиторы протеаз) в течение 30 мин при 4 °C. Клеточные фрагменты удаляли центрифугированием при 13 тыс. об/мин в течение 30 мин при 4 °C.

Разделение белков в градиенте плотности глицерина (5—30 %) выполняли согласно описанной ранее методике (Moiseeva et al., 2013). Фракции, содержащие белковые комплексы разных молекулярных масс, анализировали методом Вестерн-блоттинга.

Вестерн-блоттинг белков с применением вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, выполняли, следуя рекомендациям фирмы (Sigma, США). Пероксидазу выявляли с помощью кита SuperSignal (Pierce, США). Белки фракционировали в денатурирующем 13%-ном ПААГ (Laemmli, 1970). Полученные фракции электрофоретически переносили на фильтры PVDF (BioRad, США) в буфере, содержащем 25 mM Трис-НСl, 190 mM глицина, 0.05 % додецилсульфата натрия и 20 % метанола, pH 7.3. Мембрану отмывали в буфере TBS (10 mM Трис-НСl, pH 7.5, 150 mM NaCl) и блокировали центры неспецифического связывания антител 2.5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина или 5%-ным обезжиренным молоком в этом же буфере. Избыток блокирующего агента отмывали буфером TBS и мембрану инкубировали с конъюгированными с пероксидазой хрена антителами против биотина (Cell Signaling, США), с моноклональными антителами против GAPDH (Millipore, США) или со специфическими антителами против соответствующих субъединиц 26S протеасомы (Enzo, США).

Выделение протеасом проводили в соответствии с методикой, описанной ранее (Wang et al., 2007).

Пептидазную активность протеасом химо-трипсин-подобного типа определяли по гидролизу флуорогенного пептида Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Enzo, США). Для этого 0.4 mM субстрат инкубировали с 1 мкг протеасом в течение 45 мин при 37 °C в буферном растворе, содержащем 50 mM Трис-НСl, 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 хлорацетата натрия и 30 mM ацетата натрия. Концентрацию продукта гидролиза AMC (7-амино-4-метилкумарина) определяли на флуориметре VersaFluor (BioRad, США), измеряя экстинкцию и эмиссию при длинах волн 365 и 440 нм соответственно (Barrett, 1980).

Использованные реактивы. В работе использовали среду DMEM, глутамин, сыворотку плодов коров, пенициллин-стрептомицин, трипсин и PBS (БиолоТ, Россия); пурамицин (Invitrogen, США); бромистый этидий и кумасси G-250 (Serva, Германия); хлороформ, Na-хлорацетат, метанол, этанол, уксусную кислоту, соляную кислоту, глицерин, KCl и NaOH (Россия); акриламид, дитиотрейтол, трис-гидрокси-метиламинометан, глицин, MgCl₂, АТФ, додецилсульфат натрия, β -меркаптоэтанол, персульфат аммония и NaCl (Amresco, США); метилен-бис-акриламид, ЭДТА, фенолметилсульфонилфторид, ТЕМЕД, tween-20, ацетат натрия, бычий сывороточный альбумин, конъюгированные с пероксидазой хрена козы антитела против иммуноглобулинов мыши и козы антитела против иммуноглобулинов кролика (Sigma, США); NaCl и ацетат натрия (Merck, Германия); TurboFect, рестриктазу PacI, киты для выделения РНК и ДНК (MBI Fermentas, Литва); флуорогенный пептид Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC и антитела против субъединиц 26S протеасомы Rpn7, α 5, β 1 и β 7 (Enzo, США); моноклональные антитела против GAPDH (Millipore, США); конъюгированные с пероксидазой хрена антитела против биотина (Cell Signaling, США); кит SuperSignal (Pierce, США).

Результаты и обсуждение

Слияние протеасомного белка PSMD14 с GFP как один из методических подходов для исследования локализации протеасом использовался ранее (Wilkinson et al.,

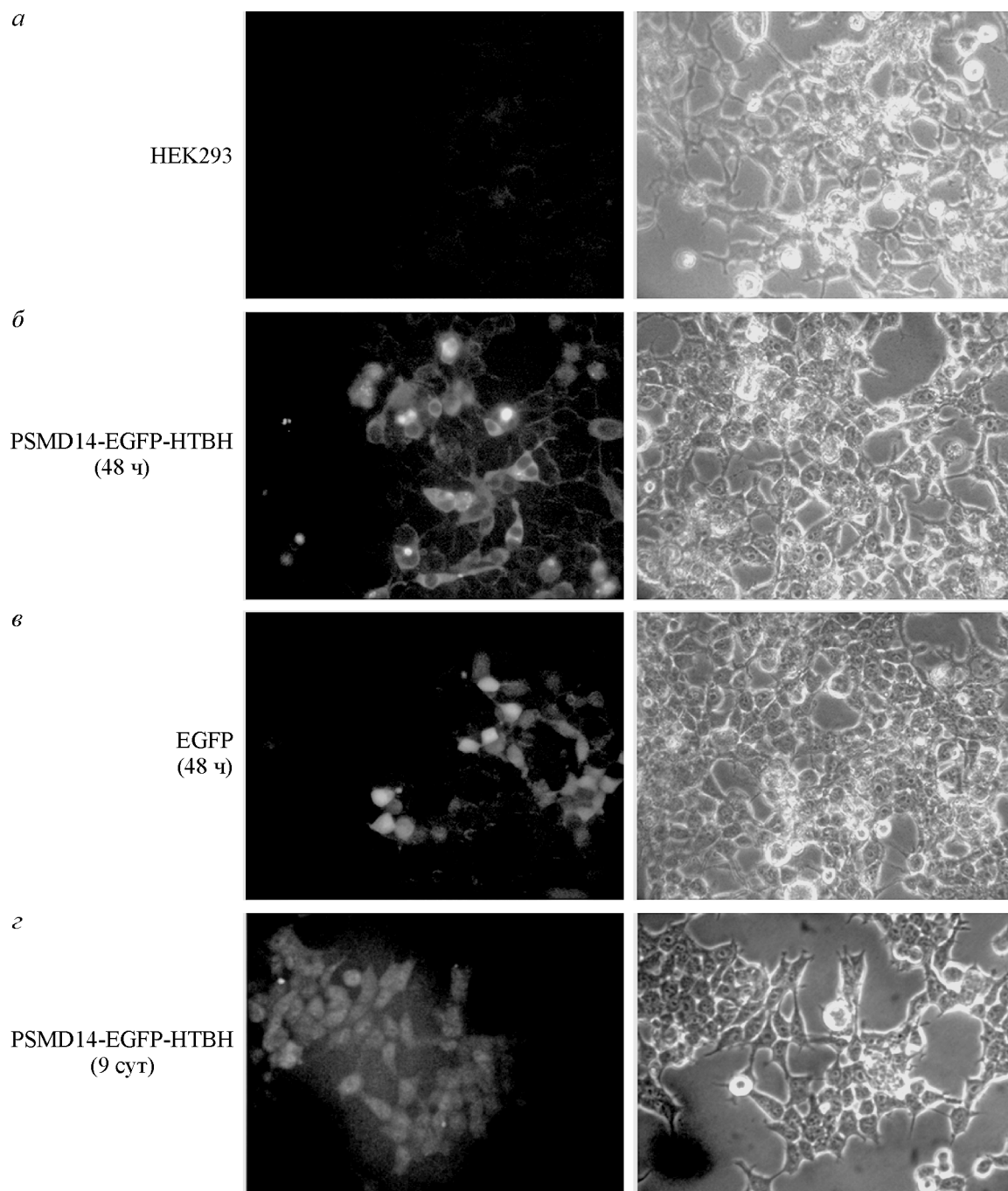


Рис. 1. Микрофотографии клеток HEK293 (а—г): контрольных, временно трансфицированных PSMD14-EGFP-HTBH или EGFP (48 ч), а также стабильно экспрессирующих PSMD14-EGFP-HTBH (9 сут).

Левая панель — флуоресценция, правая панель — в проходящем свете.

1998). В то же время в литературе нет данных о добавлении к протеасомному белку дополнительно к GFP специальной метки (тега), которую можно было бы использовать для быстрого выделения протеасом из таких клеток за счет аффинного связывания. Это позволило бы значительно расширить исследования убиквитин-протеасомной системы, не ограничиваясь лишь изучением локализации протеасом в клетке.

Ранее показано, что экспрессия тегированного на С-конце сложным пептидом НТВН протеасомного белка Rpn11 (PSMD14) в клетках HEK293 позволяет быстро выделять протеасомы с высокой степенью очистки (Wang

et al., 2007). Такая сложная метка состоит из двух последовательностей из шести гистидинов, специфического сайта расщепления TEV-протеазой и сигнальной последовательности для биотинилирования *in vivo*. Полипептид НТВН используется в трехступенчатой очистке белка за счет связывания с Ni²⁺-NTA колонкой (шаг 1), элюирования и связывания с авидиновым носителем (шаг 2), элюирования путем отщепления с помощью TEV-протеазы (шаг 3). Важно отметить, что, поскольку в клетках млекопитающих в отличие от клеток дрожжей биотинилированные эндогенные белки встречаются редко, первый этап очистки в нашем случае можно исключить.

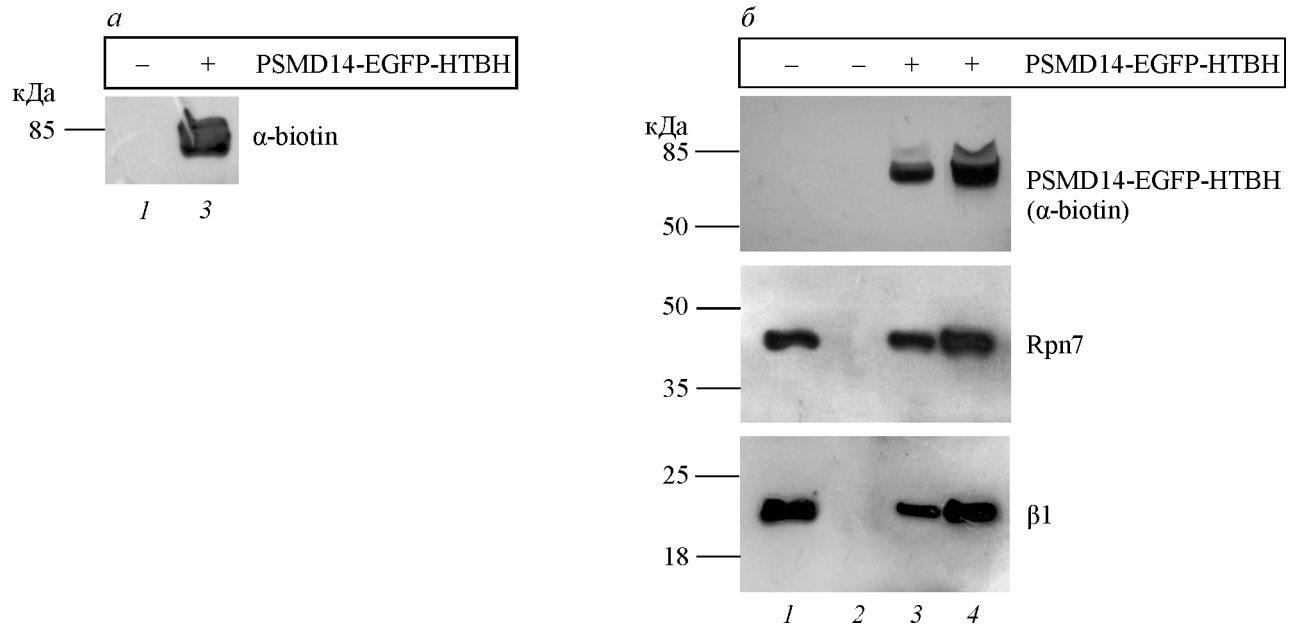


Рис. 2. Экспрессия белка PSMD14-EGFP-HTBH (а) и иммунохимическое выявление протеасомных антигенов в комплексе со стрептавидин-биотином после инкубации стрептавидинового носителя с клетками HEK293, нетрансфицированными и стабильно экспрессирующими слитый белок PSMD14-EGFP-HTBH (б).

Денатурирующий электрофорез в 13 %-ном ПААГ белкового экстракта клеток HEK293, нетрансфицированных (1) и стабильно экспрессирующих слитый белок PSMD14-EGFP-HTBH (3), и белков в комплексе со стрептавидин-биотином после инкубации стрептавидинового носителя с клетками HEK293, нетрансфицированными (2) и стабильно экспрессирующими слитый белок PSMD14-EGFP-HTBH (4).

Выбор ретровирусного вектора pQCXIP обусловлен тем, что его используют в инфекционной доставке конструкций в трудно трансфицируемые клетки. В настоящей работе не было необходимости использовать инфекционный тип доставки, поскольку клетки HEK293 легко трансфицировать кальций-фосфатным и(или) липофильным методом. Однако дальнейшее использование такого вектора в исследованиях локализации протеасом позволит нам учитывать аспект тканеспецифичности, не ограничиваясь возможностью выбора лишь легко трансфицируемых клеток.

На начальном этапе ген EGFP был введен в вектор между последовательностями PSMD14 и HTBH. Полученная генетическая конструкция pQCXIP-PSMD14-EGFP-HTBH трансфицировалась в клетки HEK293, в которых через 2 сут после трансфекции флуоресцентное свечение оценивали с помощью микроскопии (рис. 1, б). В качестве контроля мы использовали клетки HEK293, нетрансфицированные (рис. 1, а) и трансфицированные плазмидой pCX-EGFP (рис. 1, в).

Временные трансфекции часто приводят к сверхэкспрессии исследуемого гена, которая на несколько порядков выше его физиологического уровня в клетке. Наблюдаемое нами после трансфекции флуоресцентное свечение в клетках подтверждает, что слитый протеасомный белок экспрессируется в клетках. Чтобы свести к минимуму сверхэкспрессию PSMD14-EGFP-HTBH, мы провели селекцию клеток, которая длилась 9 сут при концентрации пуромидина 5 мкг/мл, для получения стабильной клеточной линии. После этого остаются вопросы о том, сохранится ли достаточный для флуоресцентной микроскопии уровень экспрессии слитого с EGFP протеасомного белка в стабильной клеточной линии и встраивается ли слитая субъединица в протеасому. Показанный на рис. 1, г уровень флуоресценции, как мы полагаем, является до-

статочным для исследований внутриклеточной локализации протеасом на модели полученной стабильной клеточной линии с помощью флуоресцентной микроскопии. Уровень экспрессии слитого белка в прошедших селекцию клетках HEK293, экспрессирующих белок PSMD14-EGFP-HTBH, показан на рис. 2, а. С помощью антител против биотина мы наблюдали сигнал на уровне предсказанной подвижности слитого белка в системе одномерного SDS-электрофореза (66 кДа).

Известно, что при разделении общего клеточного белка в градиенте плотности глицерина протеасомы распределяются в последних фракциях, и эти фракции обладают крайне высоким уровнем химотрипсин-подобной активности среди всех фракций градиента (Kominami et al., 1995; Seeger et al., 1996; Epenkel et al., 1998). Для оценки эффективности встраивания слитого белка в протеасому белковый экстракт клеток HEK293, экспрессирующих белок PSMD14-EGFP-HTBH, ультрацентрифугировали в градиенте плотности глицерина (5—30 %) и затем фракционировали на 12 одинаковых по объему частей. Каждую фракцию анализировали с помощью Вестерн-блоттинга (рис. 3, а), а также определяли для каждой фракции концентрацию общего белка и наличие химотрипсин-подобной активности (рис. 3, б). Распределение слитого белка PSMD14-EGFP-HTBH по фракциям градиента определяли при помощи антител против биотина. Мы наблюдали сигнал на уровне предсказанной подвижности белка в системе одномерного SDS-электрофореза преимущественно во фракциях 9—12 (рис. 3). Результаты анализа распределения общего клеточного белка в градиенте показали, что флуоресцентный сигнал наблюдался во фракциях, содержащих протеасомные антигены (окраска антителами против субъединиц 20S протеасомы β 7 и α 5), и практически не перекрывался с теми фракциями, в которых распределялись такие клеточные белки, как на-

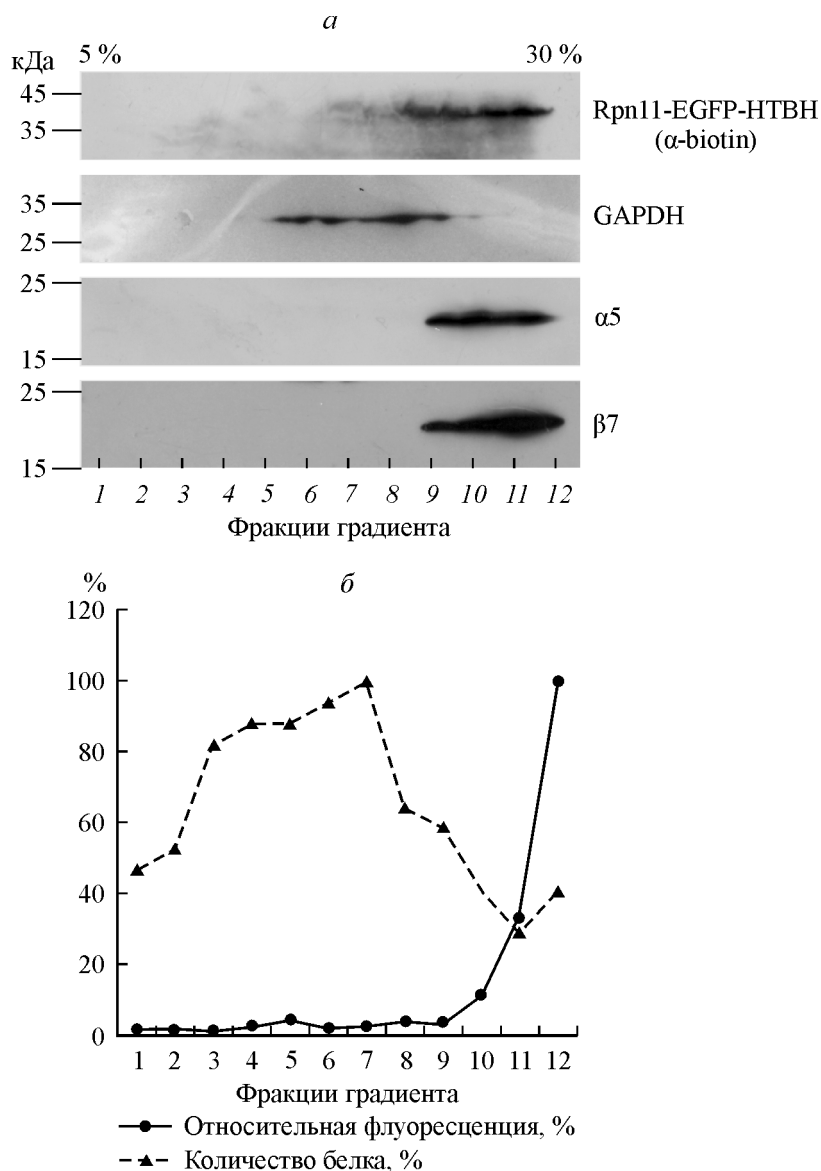


Рис. 3. Распределение белкового экстракта из клеток HEK293, стабильно экспрессирующих PMD14-EGFP-НТВН, во фракциях после ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина (5—30 %).

а — иммунохимическое выявление во фракциях градиента биотинилированного белка PMD14-EGFP-НТВН, внутриклеточного белка GAPDH, субъединиц 20S протеасомы α-типа (α5) и β-типа (β7); *б* — содержание (%) общего белка (треугольники) и пептидазной активности по типу химотрипсина (кружки) в каждой фракции градиента.

пример GAPDH. Важно отметить, что эти же фракции градиента также обладали максимальным уровнем пептидазной активности по типу химотрипсина (рис. 3, б), что указывает на то, что слитый белок мигрирует в градиенте преимущественно вместе с протеасомными комплексами. Таким образом, мы создали клеточную линию, экспрессирующую слитую с EGFP субъединицу 19S протеасомного регуляторного комплекса, которая встраивается в протеасомы, что позволит в будущих исследованиях изучать динамику распределения протеасом в клетке.

Следующим этапом стал анализ возможности очистки протеасом за счет аффинного связывания авидина (стрептавидина) с участком сложного полипептида НТВН. К экстракту контрольных клеток HEK293 и клеток, экспрессирующих белок PSMD14-EGFP-НТВН, добавляли стрептавидин-агарозу, которая за счет высокого сродства между биотином и авидином связывала тегиро-

ванную протеасомную субъединицу. Мы наблюдаем сигнал на уровне предсказанной подвижности слитого белка в системе одномерного SDS-электрофореза в клеточном лизате и во фракции со стрептавидиновым носителем (рис. 2, б). Мы показали присутствие протеасомных антигенов в полученных нами препаратах аффинно-очищенных протеасом, несущих в себе тегированную субъединицу 19S регуляторного комплекса (рис. 2, б), что подтверждает высокую специфичность одностадийной очистки протеасом за счет реакции авидин—биотин. Картина распределения протеасомных белков в системе электрофореза в присутствии SDS показана на рис. 4, а и аналогична представленной ранее (Wang et al., 2007).

Ранее показано, что тегирование субъединицы протеасом PSMD14 сложным полипептидом НТВН не влияет на протеолитическую функцию очищенной протеасомы (Wang et al., 2007). Чтобы исключить влияние EGFP в

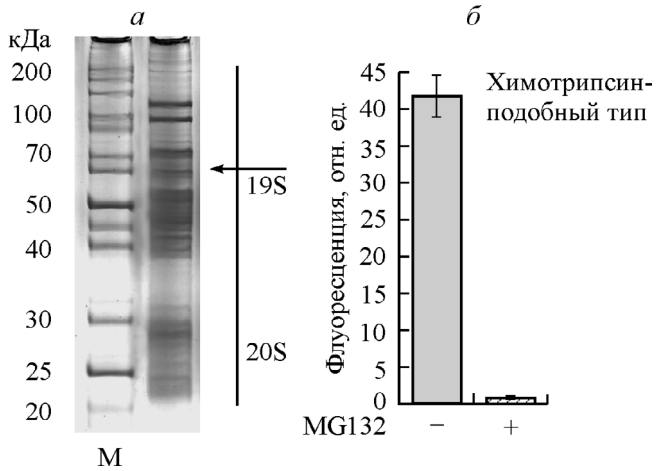


Рис. 4. Электрофоретическое разделение белков (а) и пептидазная активность по типу химотрипсина (б) 26S протеасом, аффинно-очищенных из клеток HEK293, стабильно экспрессирующих слитый белок PSMD14-EGFP-НТВН.

а — окраска геля Кумасси G-250; М — маркеры молекулярных масс (МВІ Fermentas, Литва), стрелкой указано положение слитого белка PSMD14-EGFP-НТВН. б — средние значения и стандартные отклонения трех независимых определений флуоресценции освобожденного (7-амино)-4-метилкумарина; 100 ед. флуоресценции соответствуют освобождению 50 пмоль продукта; концентрация протеасом в пробах составляет 1 мкг.

комплексе с НТВН на активность протеасом, мы определили пептидазную активность химотрипсина очищенных протеасом по гидролизу флуорогенного олигопептида, специфичного для данного протеолитического центра протеасом (рис. 4, б). В качестве контроля за специфичностью пептидазной активности мы использовали протеасомный пептидный ингибитор MG132. Согласно полученным результатам, протеасомы, содержащие слитый белок PSMD14-EGFP-НТВН, сохраняют высокую пептидазную активность по типу химотрипсина, которая полностью подавлялась специфическим для протеасом ингибитором MG132.

В настоящей работе, используя ранее полученную конструкцию для аффинной очистки протеасом (Wang et al., 2007), мы создали клеточную линию на основе клеток HEK293 со стабильной экспрессией протеасомной субъединицы PSMD14, слитой с флуоресцентным белком EGFP и последовательностью НТВН. Данная линия клеток может быть использована в исследованиях внутриклеточного транспорта протеасом при различных воздействиях на клетки (в том числе с помощью прижизненной флуоресцентной микроскопии). Использование этой клеточной линии также позволит проводить одновременный анализ изменений в самих протеасомах, включая протеомные исследования посттрансляционных модификаций белков протеасом, их субъединичного состава, белок-белковых взаимодействий (Fedorova et al., 2011), протеолитических и непротеолитических активностей (Kulichkova et al., 2010) и других характеристик.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (№ 8787).

Список литературы

- Моисеева Т. Н., Миттенберг А. Г., Барлев Н. А. 2010. Роль протеасом в регуляции транскрипции. Цитология. 52 (3): 195—203. (Moiseeva T. N., Mittenberg A. G., Barlev N. A. 2010. Proteasomes and their role in transcriptional regulation. Tsitologiya. 52 : 195—203.)
- Цимоха А. С. 2010. Протеасомы: участие в клеточных процессах. Цитология. 52 (4) : 271—300. (Tsimokha A. S. 2010. Proteasomes: their role in cellular processes. Tsitologiya. 52 : 271—300.)
- 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.
- Baldin V., Militello M., Thomas Y., Doucet C., Fic W., Boireau S., Jariel-Encontre I., Piechaczyk M., Bertrand E., Tazi J., Coux O. 2008. A novel role for PA28gamma-proteasome in nuclear speckle organization and SR protein trafficking. Mol. Biol. Cell. 19 : 1706—1716.
- Barrett A. J. 1980. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. Biochem. J. 187 : 909—912.
- Bastiaens P. I., Pepperkok R. 2000. Observing proteins in their natural habitat: the living cell. Trends Biochem. Sci. 25 : 631—637.
- Enenkel C., Lehmann A., Kloetzel P. M. 1998. Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. EMBO J. 17 : 6144—6154.
- Fedorova O. A., Moiseeva T. N., Nikiforov A. A., Tsimokha A. S., Livinskaya V. A., Hodson M., Bottrill A., Evteeva I. N., Ermolayeva J. B., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Eperon I., Barlev N. A. 2011. Proteomic analysis of the 20S proteasome (PSMA3)-interacting proteins reveals a functional link between the proteasome and mRNA metabolism. Biochem. Biophys. Res. Commun. 416 : 258—265.
- Ikawa M., Yamada S., Nakanishi T., Okabe M. 1999. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in mammals. Curr. Top. Develop. Biol. 44 : 1—20.
- Kominami K., DeMartino G. N., Moomaw C. R., Slaughter C. A., Shimbara N., Fujimuro M., Yokosawa H., Hisamatsu H., Tanahashi N., Shimizu Y. et al. 1995. Nip1, a regulatory subunit of the 26S proteasome, is necessary for activation of Cdc28p kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 14 : 3105—3115.
- Konstantinova I. M., Tsimokha A. S., Mittenberg A. G. 2008. Role of proteasomes in cellular regulation. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 267 : 59—124.
- Kulichkova V. A., Tsimokha A. S., Fedorova O. A., Moiseeva T. N., Bottrill A., Lezina L., Gauze L. N., Konstantinova I. M., Mittenberg A. G., Barlev N. A. 2010. 26S proteasome exhibits endoribonuclease activity controlled by extra-cellular stimuli. Cell Cycle. 9 : 840—849.
- Lippincott-Schwartz J., Snapp E., Kenworthy A. 2001. Studying protein dynamics in living cells. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2 : 444—456.
- Miles E. L., O’Gorman C., Zhao J., Samuel M., Walters E., Yi Y. J., Sutovsky M., Prather R. S., Wells K. D., Sutovsky P. 2013. Transgenic pig carrying green fluorescent proteasomes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 110 : 6334—6339.
- Misteli T., Spector D. L. 1997. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. Nat. Biotechnol. 15 : 961—964.
- Mittenberg A. G., Moiseeva T. N., Barlev N. A. 2008. Role of proteasomes in transcription and their regulation by covalent modifications. Front. Biosci. 13 : 7184—7192.
- Moiseeva T. N., Bottrill A., Melino G., Barlev N. A. 2013. DNA damage-induced ubiquitylation of proteasome controls its proteolytic activity. Oncotarget. 4 : 1338—1348.
- Reits E. A., Benham A. M., Plougastel B., Neeffes J., Trowsdale J. 1997. Dynamics of proteasome distribution in living cells. EMBO J. 16 : 6087—6094.

Seeger M., Gordon C., Ferrell K., Dubiel W. 1996. Characteristics of 26S proteases from fission yeast mutants, which arrest in mitosis. *J. Mol. Biol.* 263 : 423—431.

Tsien R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67 : 509—544.

Wang X., Chen C. F., Baker P. R., Chen P. L., Kaiser P., Huang L. 2007. Mass spectrometric characterization of the affinity-

purified human 26S proteasome complex. *Biochemistry.* 46 : 3553—3565.

Wilkinson C. R., Wallace M., Morphey M., Perry P., Allshire R., Javerzat J. P., McIntosh J. R., Gordon C. 1998. Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast. *EMBO J.* 17 : 6465—6476.

Поступила 22 XI 2013

DESIGN OF CELL LINE STABLE EXPRESSING PROTEASOMAL SUBUNIT PSMD14 FUSED TO THE FLUORESCENT PROTEIN EGFP AND HTBH TAG BASED ON HEK293 CELLS

V. A. Kulichkova,¹ Yu. Ya. Zaykova,¹ Yu. B. Ermolaeva,¹ E. V. Vinogradova,² L. Huang,³
A. N. Tomilin,¹ N. A. Barlev,^{1, 4, 5} A. S. Tsimokha^{1, *}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, ² St. Petersburg State University, ³ University of California, USA,

⁴ St. Petersburg State Institute of Technology and ⁵ University of Leicester, UK;

* e-mail: atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru

A stable cell line based on HEK293 cells that expresses proteasome subunit PSMD14 fused to the fluorescent protein EGFP and HTBH tag has been selected. This chimera was shown to be incorporated completely into proteolytic active proteasomes. The created cell line can be used for further fluorescent studies of proteasomes localization in the cell.

Key words: affinity purification, chymotrypsin-like peptidase activity, green fluorescent protein, proteasome.