

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СУБЪЕДИНИЦ ПРОТЕАСОМ, ОБЛАДАЮЩИХ ЭНДОРИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© А. Г. Миттенберг,^{1,*} Т. Н. Моисеева,¹ В. О. Кузык,¹ Е. П. Подольская,²
И. Н. Евтеева,¹ Н. А. Барлев^{1,3}

¹Институт цитологии РАН, ²Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия,
и ³Отдел биохимии Университета Лестера, Великобритания;

* электронный адрес: a.mittenberg@gmail.com

Протеасомы выступают в качестве основного нелизосомального аппарата внутриклеточного протеолиза и принимают участие в регуляции большинства важнейших клеточных процессов. Несмотря на значительный прогресс в понимании функционирования протеасом, некоторые вопросы, в частности РНКазная активность этих рибонуклеопротеиновых комплексов и ее регуляция, остаются малоисследованными. В настоящей работе обнаружено, что ряд белков, соответствующих по электрофоретической подвижности субъединицам 20S корового комплекса протеасом, обладает эндорибонуклеазной активностью по отношению к смысловой и антисмысловой последовательностям 3'-НТР мРНК *c-myc*. Масс-спектрометрический анализ триптических гидролизатов данных белков показал присутствие в пробах субъединиц 20S протеасомы — $\alpha 1$ (PSMA6), $\alpha 5$ (PSMA5), $\alpha 6$ (PSMA1) и $\alpha 7$ (PSMA3). Выявлены ряд новых сайтов фосфорилирования субъединиц $\alpha 1$ (PSMA6) и $\alpha 7$ (PSMA3), а также существование формы субъединицы $\alpha 5$ (PSMA5) с делецией 20 N-концевых аминокислотных остатков. Наблюдаемые различия в проявлении индивидуальными субъединицами эндонуклеазной активности, по-видимому, объясняются посттрансляционными модификациями данных белков, в частности фосфорилированием. Показано, что специфичность РНКазной активности изменяется при дефосфорилировании протеасом, а также под влиянием катионов Са и Mg. Сделаны выводы о влиянии статуса ПТМ субъединиц протеасом на специфичность их РНКазной активности.

Ключевые слова: протеасомы, рибонуклеазы, стабильность мРНК, посттрансляционные модификации, фосфорилирование, масс-спектрометрия.

Принятые сокращения: 3'-НТР — 3'-нетранслируемая область, ПТМ — посттрансляционные модификации белков, СИАР — щелочная фосфатаза кишечника телят, MALDI-TOF/TOF, MS/MS — тандемная времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией—ионизацией.

Протеасомы встречаются в клетках почти всех организмов от археобактерий до человека и представляют собой белковые комплексы, состоящие из более чем 20 различных субъединиц. Протеасомы обнаруживаются как в ядре, так и в цитоплазме, при различных изменениях способны изменять свою локализацию внутри клетки, а также экскретироваться во внешнюю среду или импортироваться из нее. 20S коровая частица протеасомы представляет собой полый цилиндр, составленный из субъединиц двух типов — α и β Konstantinova et al., 2008; Mittenberg et al., 2008; Моисеева и др., 2010).

До недавнего времени важнейшей функцией протеасом считались участие в убиквитинзависимом протеолизе и ответственность за расщепление большинства клеточных белков, однако в конце прошлого века была обнаружена способность протеасом специфически расщеплять некоторые РНК (Rouch et al., 1995). Дальнейшие исследования показали, что эндорибонуклеазная активность протеасом является специфичной, а также может регулироваться с помощью модификации субъединиц протеасом и изменения состава реакционной среды (Petit et al., 1997a,

1997b; Jarrousse et al., 1999; Евтеева и др., 2000, 2003; Миттенберг и др., 2002a, 2002b, 2007; Ballut et al., 2003; Gautier-Bert et al., 2003; Куличкова и др., 2004a, 2004b, 2005; Токтарова и др., 2004; Tsimokha et al., 2007; Kulichkova et al., 2010; Dielen et al., 2011). Обнаружены по крайней мере две субъединицы протеасом, отвечающие за РНКазную активность, причем обе они относятся к α -типу (Petit et al., 1997a, 1997b; Jorgensen, Hendil, 1999). Эти результаты позволяют сделать предположение о наличии у α -субъединиц, играющих важную роль в регуляции доступа субстратов в протеасому (Fedorova et al., 2011) и присоединении регуляторных комплексов, дополнительной функции — эндорибонуклеазной активности. Аналогично тому, как β -субъединицы отвечают за расщепление белков протеасомой, субъединицы α -типа могут отвечать за расщепление РНК. Ранее нами было показано, что $\alpha 5$ -субъединица 20S протеасомы способна расщеплять мРНК p53 и 3'-НТР мРНК *c-myc* (Kulichkova et al., 2010). Белок p53 является важнейшим онкосупрессором человека (Barlev et al., 2010) и регулируется на уровне как белковой стабильности, так и мРНК (Marouco et al., 2013).

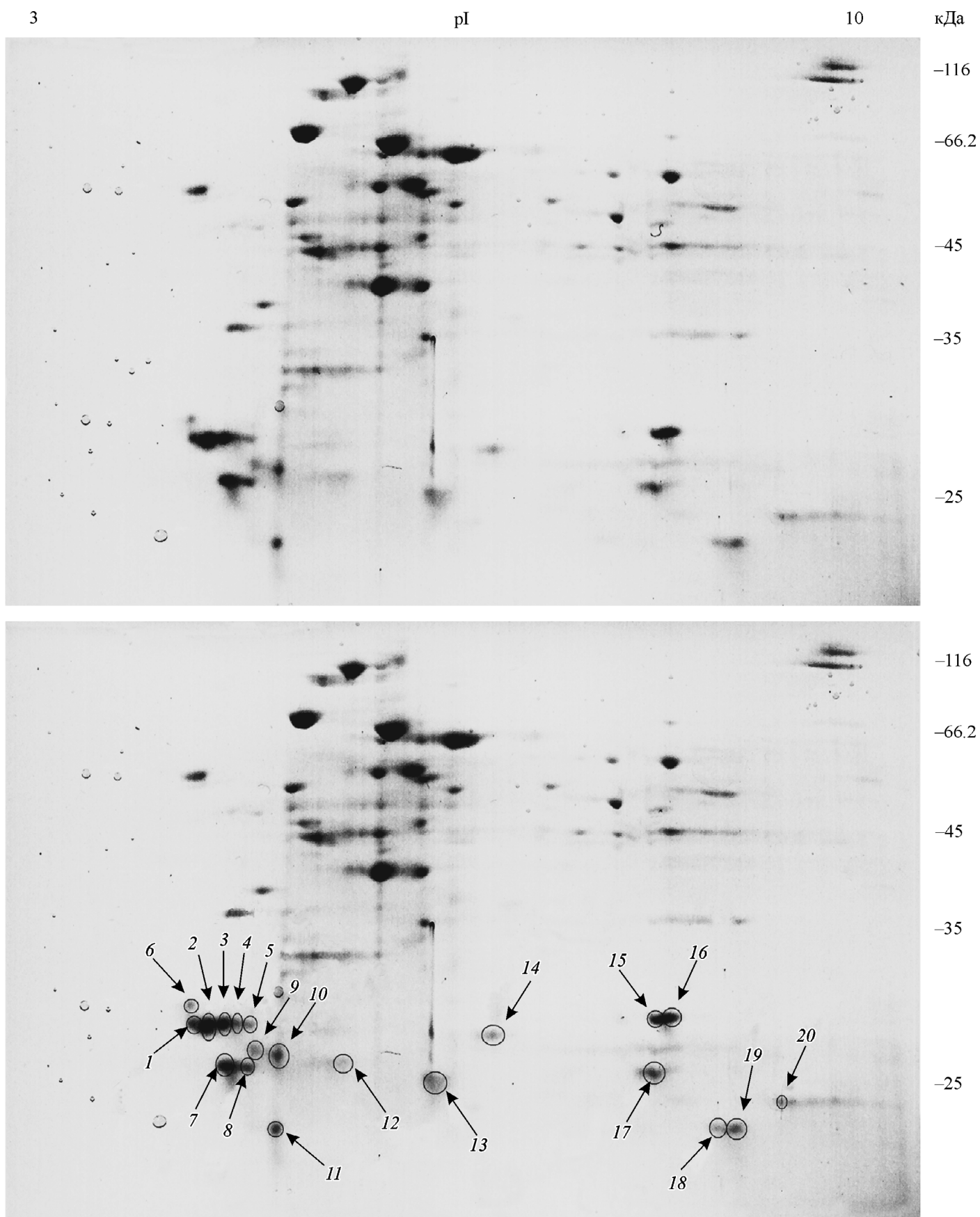


Рис. 1. Двухмерный электрофорез субъединиц 26S протеасом.

Цифрами 1—20 обозначены пятна, предположительно соответствующие субъединицам 20S протеасом, экстракты из которых исследовали масс-спектрометрическими методами, а также проверяли на наличие эндорибонуклеазной активности.

протеасом, выделенных из цитоплазмы клеток K562, были разделены с помощью двухмерного электрофореза (рис. 1). Белки, соответствующие по молекулярным массам субъединицам 20S протеасомы, были экстрагированы из геля, после чего исследованы на наличие эндорибонуклеазной активности по отношению к двум различным субстратам в присутствии или в отсутствие двухвалентных катионов, а также после дефосфорилирования данного белка с помощью CIAP (рис. 2, 3). В качестве субстратов выбрали смысловой и антисмысловой транскрипты 3'-НТР мРНК *c-myc* человека, синтезированные *in vitro* в присутствии радиоактивно меченного СТР.

Ранее было показано, что 20S протеасомы способны расщеплять молекулы РНК по AUUUA-сайтам, причем в оригинальных экспериментах количество разрезов, внесенных при эндонуклеолизе, соответствовало числу таких сайтов в предложенном РНК-субстрате (Petit et al., 1997b). Выбранный нами в качестве субстрата фрагмент 3'-НТР мРНК *c-myc* человека длиной 488 нуклеотидов также представляет собой AU-богатый участок, который содержит четыре AUUUA-сайта в своей смысловой последовательности и три — в антисмысловой.

Число фрагментов, полученных в результате эндонуклеолиза этих последовательностей субъединицами протеасом, не соответствовало количеству AUUUA-сайтов в них. Более того, антисмысловая последовательность оказалась разрезанной на большее число частей, чем смысловая, несмотря на то что AUUUA-участков в ней меньше. Это может свидетельствовать о наличии в нуклеотидной последовательности РНК-субстрата других сайтов, узнаваемых субъединицами протеасом. Скорее всего, изучаемые белки могут узнавать близкие к AUUUA последовательности — AUUAA, AUUAU и др. Другое вероятное объяснение такой специфичности состоит в том, что вторичная структура РНК может способствовать или, наоборот, препятствовать связыванию субстрата с ферментом, изменяя спектр узнаваемых последовательностей. В любом случае результаты наших исследований подтверждают данные начала века о дестабилизации РНК при наличии в ее последовательности AU-богатых участков (Tourtiere et al., 2002).

Эксперименты по расщеплению 3'-НТР мРНК *c-myc* показали, что среди 20 исследованных нами экстрактов содержится около 10 белков, способных расщеплять по крайней мере один из предложенных субстратов в каких-либо условиях, причем эндорибонуклеазная активность этих белков зависит от статуса их фосфорилирования, а также от наличия в среде ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Для идентификации в исследованных экстрактах субъединиц протеасом был проведен масс-спектрометрический анализ препаратов белков, содержащихся в наиболее интенсивных пятнах на геле после двухмерного электрофореза.

Анализ белков, содержащихся в пятнах 1—5 (здесь и далее — на рис. 1). Расположение пятен 1—5 на геле после двухмерного электрофореза позволяет предположить, что в каждом из указанных пятен содержится смесь белков, имеющих близкие значения молекулярной массы и *pI* и отличающихся друг от друга посттрансляционными модификациями (табл. 1). Полученные для данных препаратов масс-спектры представлены на рис. 4.

По количеству сигналов и перекрытию последовательности можно судить о составе смеси (табл. 2), в который входят субъединица 20S протеасомы $\alpha 7$ (PSMA3), а

также субъединицы протеасомного активатора PA28 — PA28 α (PSME1), PA28 β (PSME2) и PA28 γ (PSME3).

Каждый из указанных белков представлен большим количеством индивидуальных пептидов с достаточно высокой степенью перекрытия последовательностей (табл. 2), особенно в пробах с наибольшей интенсивностью окраски пятна. Процент перекрытия последовательностей позволяет нам с высокой долей вероятности предполагать наличие указанных белков в пробах. Также данные масс-спектрометрического анализа прекрасно согласуются с результатами, полученными в ходе эксперимента по исследованию эндорибонуклеазной активности.

Предположение о том, что в пробах 1—5 содержится один и тот же набор субъединиц протеасом с различными модификациями, вполне подтверждается масс-спектрометрическим анализом. Кроме того, для подтверждения полученных результатов были проведены два MS/MS-анализа для сигналов, соответствующих массе 1821.92 в пробе 2 (рис. 5) и массе 1519.83 в пробе 3 (рис. 6). На рисунках указаны сигналы, соответствующие Y-ионам. Полный набор сигналов (Y1—Y15) позволяет нам утверждать, что в пробе 2 содержится субъединица PA28 β , а в пробе 3 соответственно PA28 α . Выбранные для MS/MS-анализа пептиды, кроме того что являются индивидуальными, как в случае PA28 α , так и для PA28 β , не несут ПТМ. Данные сигналы присутствуют во всех спектрах серии 1—5, что наряду с непосредственным сравнительным анализом подтверждает наличие по крайней мере этих двух субъединиц в пробах 1—5.

Исследования данных белковых препаратов на наличие эндорибонуклеазной активности показали, что все они способны расщеплять антисмысловой транскрипт фрагмента 3'-нетранслируемой области мРНК *c-myc* человека. Активности экстрактов пятен 1—5 во многом сходны по зависимости от условий реакции эндонуклеолиза. В частности, присутствие 10 мМ Mg^{2+} эффективно подавляло их способность к расщеплению антисмысловой последовательности *c-myc*, в то время как наличие ионов Ca^{2+} , напротив, увеличивало их активность. В отсутствие двухвалентных катионов белки из пятен 1—5 проявляли одинаковую способность к эндонуклеолизу как смысловой, так и антисмысловой последовательностей предложенной мРНК, что говорит о незначительности модификаций, которые привели к появлению пяти различных пятен, для проявления эндорибонуклеазной активности.

Препараты белков, экстрагированные из пятен 1—5, практически полностью теряли свою активность после обработки их щелочной фосфатазой кишечника теленка. Однако активность по-разному фосфорилированных форм (1—5) практически идентична, что говорит о том, что даже наименее фосфорилированный из этих белков содержит некоторое количество фосфатных групп, которые необходимы для проявления им эндорибонуклеазной активности и могут быть удалены дефосфорилированием, а дополнительные модификации, как уже говорилось выше, на эту активность не влияют.

Ни один из обнаруженных в исследуемых экстрактах белков не был ранее охарактеризован как обладающий РНКазной активностью, поэтому мы не можем с уверенностью говорить о том, какой именно компонент исследуемой смеси отвечает за способность препаратов к эндорибонуклеолизу. Опираясь на ранее выдвинутую гипотезу о специфическом назначении субъединиц α -типа для расщепления РНК, можно предположить, что ключевым

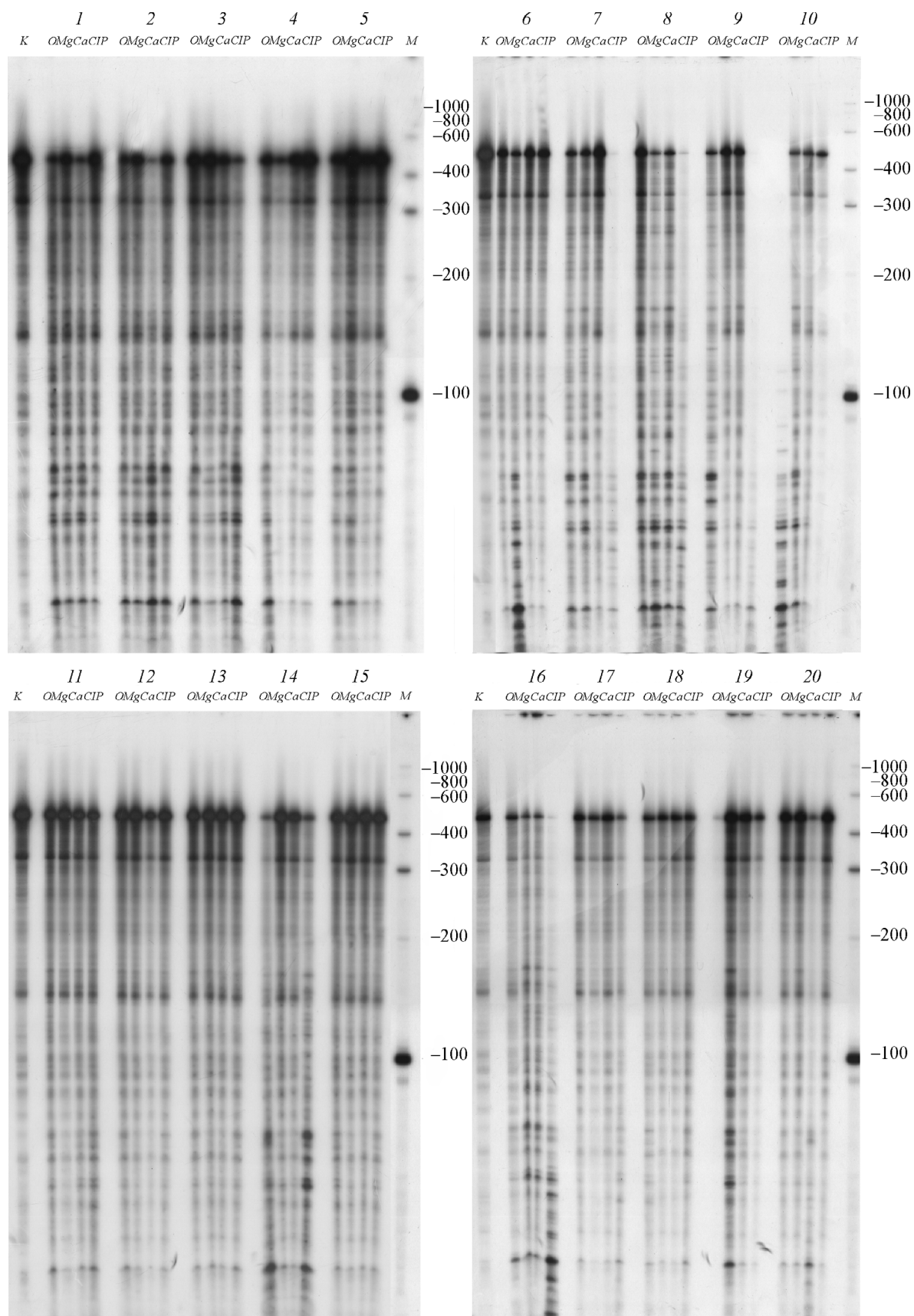


Рис. 2. Радиоавтографы электрофореграмм смысловой последовательности 3'-НТР мРНК *c-myc*, предварительно обработанной белковыми экстрактами из пятен 1—20 на рис. 1.

0 — в отсутствие двухвалентных катионов, *Mg* — в присутствии 10 мМ $MgCl_2$, *Ca* — в присутствии 10 мМ $CaCl_2$, *CIP* — после дефосфорилирования субъединиц протеасом щелочной фосфатазой кишечника теленка. Маркер справа (*M*) указывает длину фрагмента РНК в нуклеотидах. К — контроль.

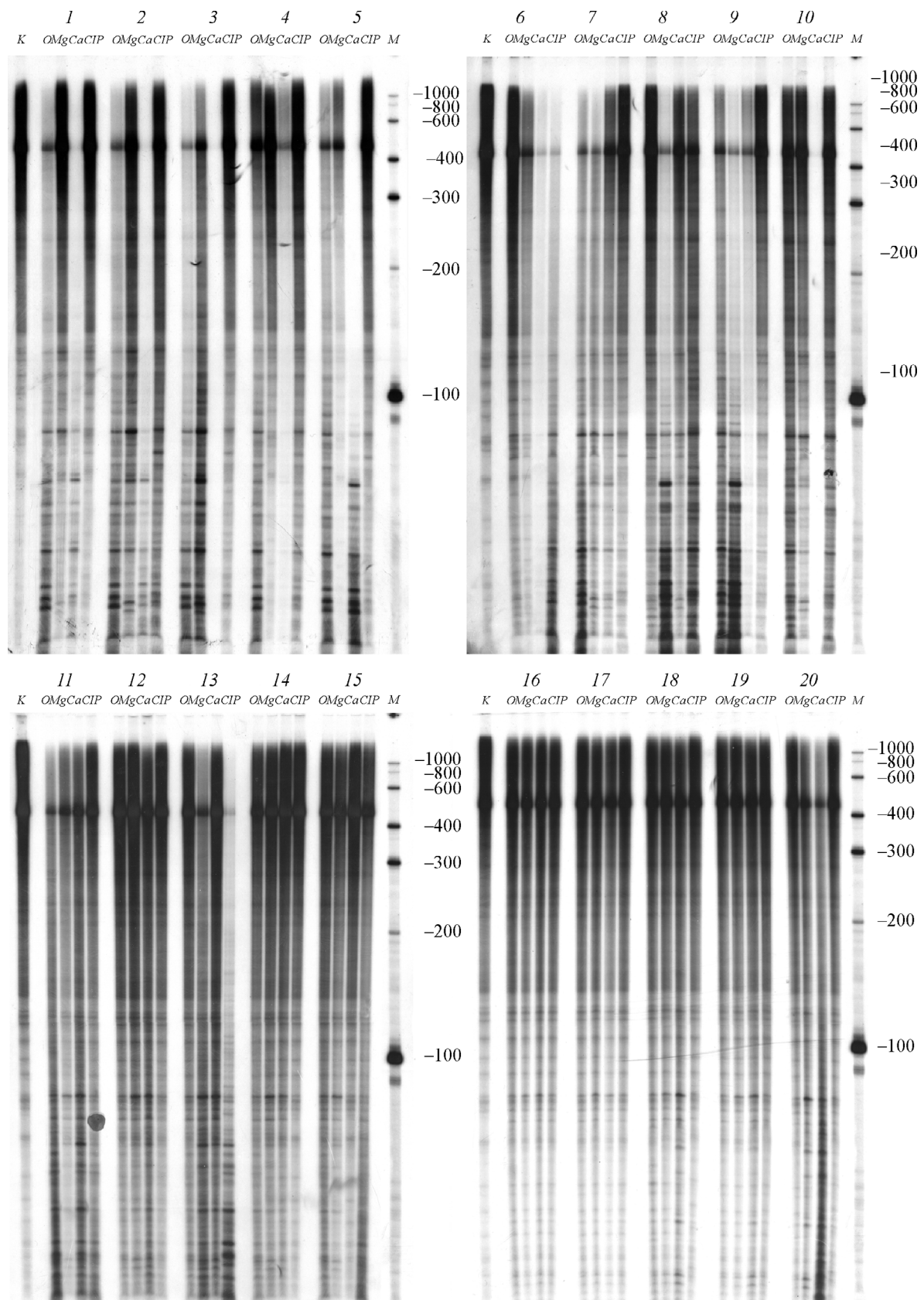


Рис. 3. Радиоавтографы электрофореграмм антисмысловой последовательности 3'-НТР мРНК *c-myc*, предварительно обработанной белковыми экстрактами из пятен 1—20 на рис. 1.

Объяснения те же, что и на рис. 2.

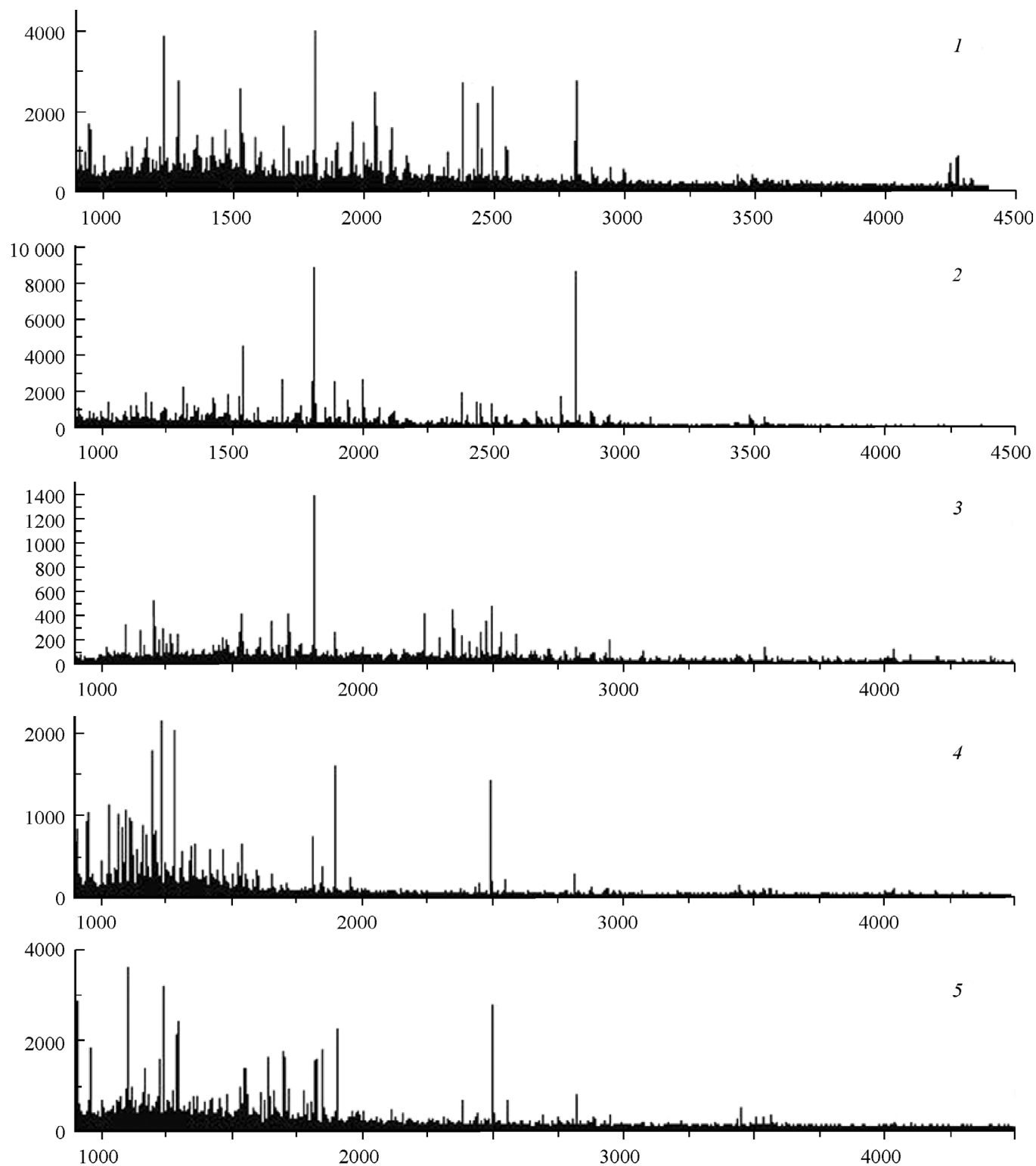


Рис. 4. Масс-спектры белков, выделенных из пятен 1—5 на рис. 1.

Здесь и на рис. 5—8 по горизонтали — значения масса/заряд, по вертикали — интенсивность, отн. ед.

компонентом данного препарата, отвечающим за эндорибонуклеазную активность, является субъединица $\alpha 7$. Эта субъединица в составе 20S протеасомы находится в непосредственной близости от субъединицы $\alpha 1$ (PSMA6), которая была ранее охарактеризована как способная связывать РНК (Bey et al., 1993) и обладающая РНКазной ак-

тивностью (Petit et al., 1997a). Действуя согласованно, эти два белка могли бы осуществлять эффективное специфическое связывание и гидролиз РНК, причем расположение активных центров на двух различных субъединицах давало бы дополнительные возможности для тонкой регуляции процесса эндонуклеолиза.

Субъединицы регуляторных комплексов ранее не рассматривались как возможные претенденты на роль РНКазных центров протеасомы, однако полученные нами результаты не исключают возможности того, что одна или несколько из них способны к специфическому расщеплению РНК. Вполне возможным также представляется участие субъединиц PA28 в регуляции каталитической активности или способности к связыванию РНК α -субъединицами.

Анализ белков, содержащихся в пятнах 7—10. Набор сигналов в спектрах, полученных для гидролизатов белков, содержащихся в пробах 7—10, очень схож (рис. 7), что позволяет сделать предположение о присутствии в этих пятнах одного и того же набора белков. Различия в электрофоретической подвижности могут быть объяснены тем, что в белках, обладающих меньшей массой (пятна № 7 и 8), отсутствует фрагмент с мол. массой около 2 кДа, в то время как разница в значении pI является результатом различной степени модификации субъединиц.

Пятна, содержащие субъединицу $\alpha 5$ (PSMA5), были выявлены с помощью иммуноблотинга (не показано). Данные, полученные в результате масс-спектрометрического анализа, подтвердили это предположение (табл. 3).

Как видно из данных табл. 3, в спектрах, относящихся к пробам 7—8, не было обнаружено ни одного из сигналов, соответствующих пептидам, состоящим из первых 20 аминокислот, в то время как в пробах 9—10 они присутствуют. Мол. масса данного фрагмента составляет 2.3 кДа, что позволяет сделать предположение о том, что именно отсутствие этой N-концевой последовательности приводит к различию в электрофоретической подвижности между белками из проб 7—8 и 9—10.

Также был обнаружен набор пептидов, которые присутствуют во всех четырех пробах, причем в пробах 8 и 10 данные пептиды не модифицированы, а в пробах 7 и 9 фосфорилированы. В частности, пептид, имеющий последовательность ITSPLEMPSSIEK, в пробе 7 несет одну фосфатную группу, в пробе 9 — две (табл. 6), а в пробах 8 и 10 данная ПТМ отсутствует.

Таким образом, данные масс-спектрометрии подтверждают наличие субъединицы $\alpha 5$ (PSMA5) в пробах 7—10. Кроме того, удалось показать, что фосфорилирование коррелирует со сдвигами pI рассматриваемых белков, так как изоформы $\alpha 5$ из проб 7 и 9 отличаются от изоформ из проб 8 и 10 соответственно наличием дополнительных фосфатных групп и сдвигом изоэлектрических точек.

Белки из пятен 7—10 были исследованы на наличие эндорибонуклеазной активности, и была показана их способность к специфическому расщеплению как смысловой, так и антисмысловой последовательностей 3'-НТР мРНК *c-myc* человека. Однако характеристики данной активности исследуемых белков несколько различались: они оказались общими попарно для проб 7 и 10 и для проб 8 и 9, что не очень хорошо согласуется с обнаруженными структурными особенностями данных белков. Препараты 7 и 10, различающиеся как по молекулярным массам, так и по изоэлектрическим точкам, проявляли наибольшую способность к расщеплению антисмысловой последовательности мРНК *c-myc* в присутствии Mg^{2+} . Эндорибонуклеазная активность экстрактов из пятен 8 и 9, имеющих близкие значения pI, по отношению к данному субстрату, напротив, подавлялась в присутствии ионов Mg^{2+} , но активировалась добавлением Ca^{2+} .

Таблица 1

Предположительный белковый состав проб (субъединиц протеасом клеток K562)

Субъединица протеасом	Пятна, где обнаруживается субъединица	Молекулярная масса, Да	Теоретическое значение pI
PA28 α (PSME1)	1—5	28723	5.8
PA28 β (PSME2)	1—5	27402	5.54
PA28 γ (PSME3)	1—5	29506	5.69
$\alpha 1$ (PSMA6)	15—16	27399	6.35
$\alpha 5$ (PSMA5)	7—10	26411	4.74
$\alpha 6$ (PSMA1)	15	29556	6.15
$\alpha 7$ (PSMA3)	1—5	28433	5.19

Таблица 2

Перекрытие последовательностей белков, обнаруженных в пробах 1—5 на рис. 1

Номер пятна	Субъединица	Количество обнаруженных пептидов	Перекрытие последовательности, %
1	PA28 α (PSME1)	14	51
	PA28 β (PSME2)	8	33
	PA28 γ (PSME3)	16	56
	$\alpha 7$ (PSMA3)	18	46
2	PA28 α (PSME1)	32	79
	PA28 β (PSME2)	25	60
	PA28 γ (PSME3)	40	76
	$\alpha 7$ (PSMA3)	30	73
3	PA28 α (PSME1)	23	73
	PA28 β (PSME2)	19	56
	PA28 γ (PSME3)	33	74
	$\alpha 7$ (PSMA3)	29	79
4	PA28 α (PSME1)	46	81
	PA28 β (PSME2)	33	53
	PA28 γ (PSME3)	43	65
	$\alpha 7$ (PSMA3)	42	64
5	PA28 α (PSME1)	29	72
	PA28 β (PSME2)	25	76
	PA28 γ (PSME3)	33	58
	$\alpha 7$ (PSMA3)	45	72

В случае субъединицы $\alpha 5$ из пятен 7 и 8 данные изоформы различаются, в частности, по статусу фосфорилирования, причем наличие данной ПТМ имеет существенное значение для проявления эндорибонуклеазной активности. В отсутствие двухвалентных катионов экстракт пятна 7 проявлял существенно большую способность к расщеплению антисмысловой последовательности *c-myc*, чем экстракт пятна 8, но дефосфорилирование практически полностью ее подавляло в отличие от активности белков из пятна 8. Однако оно способствовало проявлению субъединицами из обоих пятен эндорибонуклеазной активности по отношению к смысловой последовательности 3'-НТР мРНК *c-myc*. Эти результаты также позволяют высказать предположение о влиянии ПТМ, отличающих белок из пятна 7 от белка из пятна 8, на специфичность

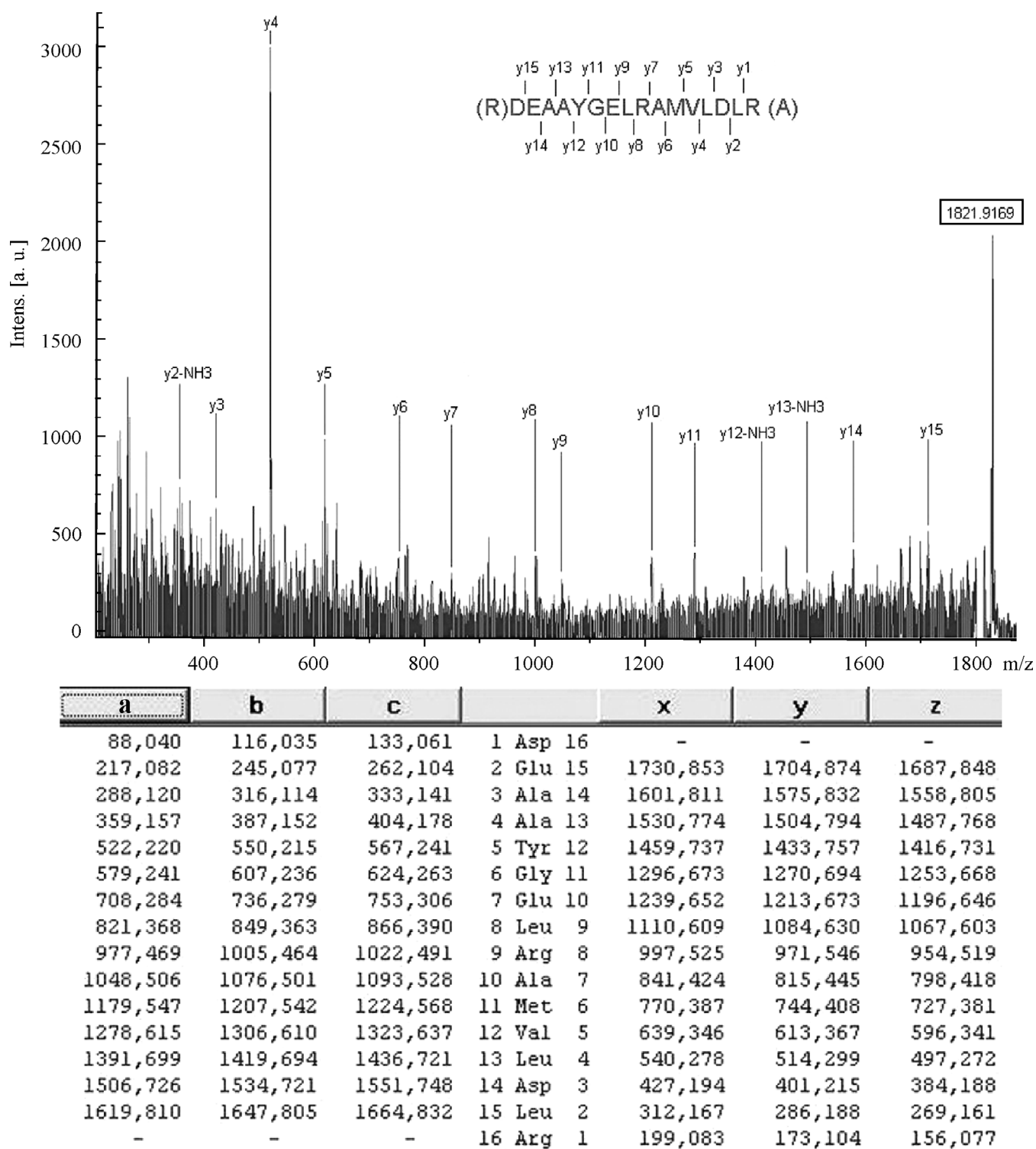


Рис. 5. MS/MS-спектр пептида, соответствующего последовательности DEAAAYGELRAMVLDLR с мол. массой 1821.9169 Да (субъединица PA28 β).

Здесь и на рис. 6 таблица под спектром содержит значения масс фрагментов данного пептида, полученных при его расщеплении в камере соударений масс-спектрометра, и соответствующую этим массам аминокислотную последовательность искомого пептида.

по отношению к узнаваемым ими РНК-последовательностям.

Эти данные подтверждают гипотезу о возможной регуляции эндорибонуклеазной активности протеасом с помощью ПТМ: активности белков из пятен 7 и 8, имеющих общую первичную структуру, из-за различных моди-

фикаций (в частности, различий в статусе фосфорилирования) совершенно противоположно регулируются наличием в реакционной среде двухвалентных катионов. То же можно сказать и о пробах 9—10. Таким образом, основная субъединица, ответственная за эндорибонуклеазную активность протеасом, подвержена сложной регу-

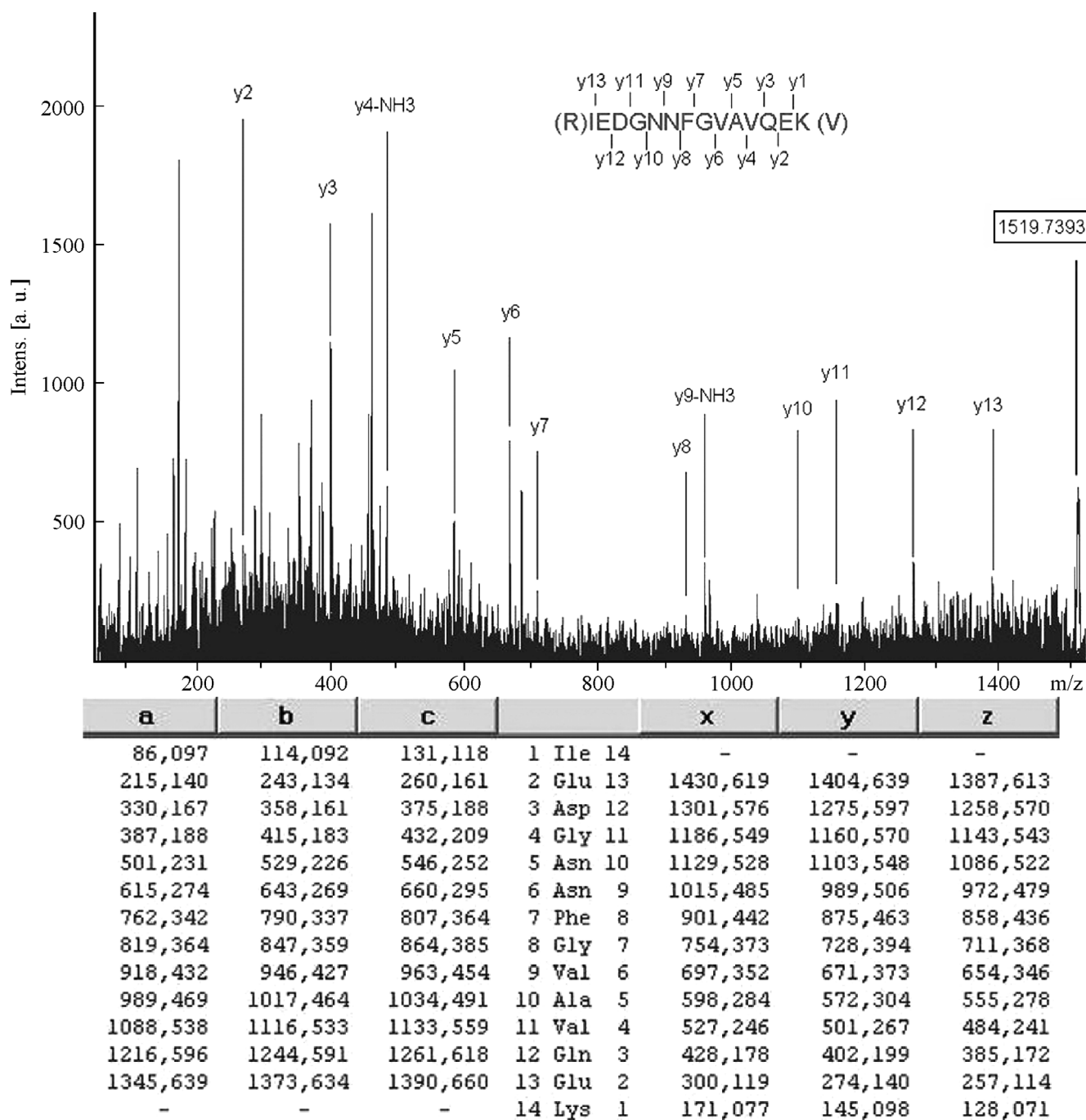


Рис. 6. MS/MS-спектр пептида, соответствующего последовательности IEDGNNFGVAVQEK с мол. массой 1519.7393 Да (субъединица PA28 α).

ляции с помощью ПТМ, а также существует в виде нескольких изоформ, различающихся как по физическим свойствам, так и по способности к эндорибонуклеолизу.

Субъединица $\alpha 5$ ранее была обнаружена в клетках в свободном виде, причем и в этом состоянии белок обладал эндорибонуклеазной активностью (Jorgensen, Hendil, 1999). Результаты нашего эксперимента подтверждают предположение о важной роли данного белка в расщеплении РНК протеасомами.

Анализ белков, содержащихся в пятнах 15 и 16. В ходе данного эксперимента были проанализированы белки, экстрагированные из пятен 15 и 16 (табл. 1; рис. 8). Их расположение на геле, а также схожесть

масс-спектров, как и в предыдущих случаях, позволяют предположить наличие одной субъединицы в обоих пятнах, но в различной степени модификации.

На основании полученных данных (табл. 4) можно сделать выводы о том, что в пятне 16 содержится субъединица $\alpha 1$ (PSMA6). В пятне 15 также присутствуют сигналы, принадлежащие этому белку, но их количество гораздо меньше, и субъединица в высокой степени модифицирована (рис. 8), основное же количество сигналов относится к субъединице $\alpha 6$ (PSMA1).

Теоретические значения масс и pI данных субъединиц ($\alpha 1$ (PSMA6) — 27399/6.35, $\alpha 6$ (PSMA1) — 29556/6.15) различаются, поэтому наличие обеих субъе-

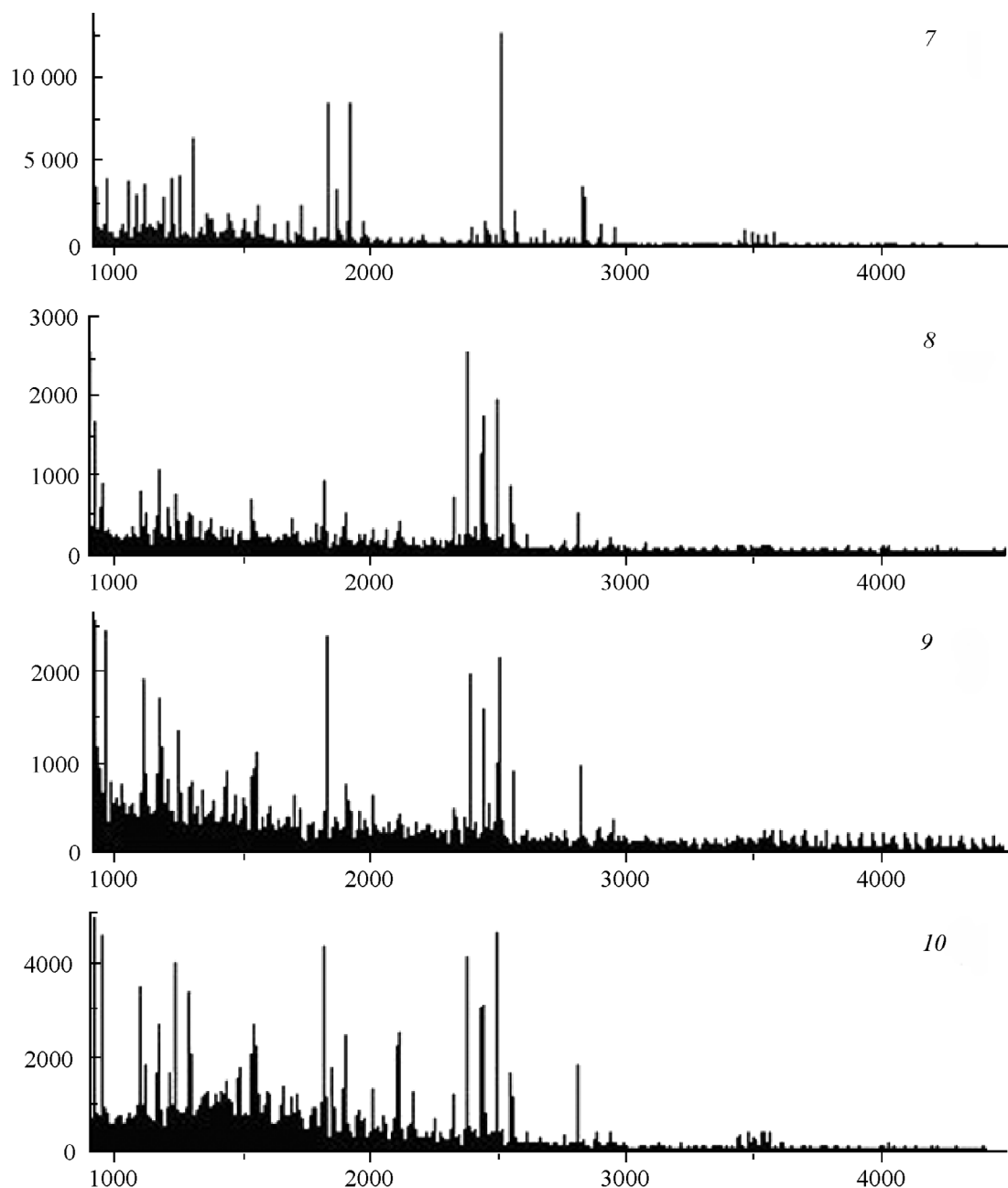


Рис. 7. Масс-спектры белков, выделенных из пятен 7—10 на рис. 1.

диниц в пробе 15 можно объяснить лишь существованием некоторого посттрансляционного процессинга и модификаций, изменяющих изоэлектрическую точку.

Анализ данных, полученных для субъединицы $\alpha 1$ в экстракте из пятна 16 (табл. 5), позволил обнаружить множество ПТМ данной субъединицы (табл. 6). В большинстве случаев мы не можем точно назвать сайт фосфорилирования, однако для некоторых пептидов можно однозначно судить о модифицированных аминокислотах. Например, можно говорить о фосфорилировании Tyr23 и Tyr27, а также об окислении Met1 и Met79. Всего, согласно полученным данным, $\alpha 1$ содержит не менее 8 сайтов фосфорилирования, большая часть которых представляет собой остатки Ser и Thr.

Исследование эндорибонуклеазной активности позволило выявить способность к расщеплению смыслово-

го транскрипта 3'-нетранслируемой области мРНК *c-myc* человека только для экстракта пятна 16, что говорит об отсутствии РНКазной активности у субъединицы $\alpha 6$, а также негативном влиянии гиперфосфорилирования на способность субъединицы $\alpha 1$ к расщеплению РНК. Однако белок $\alpha 1$ из пятна 15 оказался неспособным расщепить антисмысловый транскрипт, что свидетельствует о строгой специфичности данной субъединицы по отношению к РНК-субстратам.

Отсутствие РНКазной активности у субъединицы $\alpha 6$ было показано и ранее (Petit et al., 1997a); таким образом, наши результаты хорошо согласуются с литературными данными. Негативное влияние избытка фосфатных групп может объясняться тем, что белок приобретает дополнительный отрицательный заряд, который мешает ему связываться с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами.

Таблица 3

Перекрытие аминокислотной последовательности субъединицы α5 (PSMA5)

Номер пробы	Количество обнаруженных пептидов	Перекрытие последовательности, %
7	21	65
8	19	55
9	17	67
10	22	63

*MFLTRSEYDRGVNTFSPEGRLFQVEYAIEAIKLGSTAIGIQTSEGVCLAVEKRITSPLMEPSSIEKIVEIDAHIGC
AMSGLIADAKTLIDKARVETQNHWFYNETMTVESVTQAVSNLALQFGEEDADPGAMSRPFGVALLFGGVDEK
GPQLFHMDPSTFVQCDARAIGSASEGAQSSLQEVYHKSM TLKEAIKSSLIILKQVMEEKLNATNI ELAT
VQPGQNFHMFTKEELEEVIKDI*

*MFLTRSEYDRGVNTFSPEGRLFQVEYAIEAIKLGSTAIGIQTSEGVCLAVEKRITSPLMEPSSI EKIVEIDAHIG
CAMSGLIADAKTLIDKARVETQNHWFYNETMTVESVTQAVSNLALQFGEEDADPGAMSRPFGVALLFGGV
DEKGPQLFHMDPSTFVQCDARAIGSASEGAQSSLQEVYHKSM TLKEAIKSSLIILKQVMEEKLNATNIELA
TVQPGQNFHMFTKEELEEVIKDI*

*MFLTRSEYDRGVNTFSPEGRLFQVEYAIEAIKLGSTAIGIQTSEGVCLAVEKRITSPLMEPSSIEKIVEIDAHI
GCAMSGLIADAKTLIDKARVETQNHWFYNETMTVESVTQAVS NLALQFGEEDADPGAMSRPFGVALLFGG
VDEKGPQLFHMDPSTFVQCDAVQCD AEGAQSSLQEVYHKSM TLKEAIKSSLIILKQVMEEKLNATNIEL
ATVQPGQNFHMFTKEELEEVIKDI*

*MFLTRSEYDRGVNTFSPEGR LFQVEYAIEAIKLGSTAIGIQTSEGVCLAVEKRITSPLMEPSSIEKIVEIDAHI
GCAMSGLIADAKTLIDKARVETQNHWFYNETMTVESVTQAVSNLALQFGEEDADPGAMSRPFGVALLFGGV
DEKGPQLFHMDPSTFVQCDARAIGSASEGAQSSLQEVYHKSM TLKEAKSSLIILKQVMEEKLNATNIELAT
VQPGQNFHMFTKEELEEVIKDI*

Примечание. Курсивом помечена N-концевая последовательность, предположительно отсутствующая в белках из проб 7—8; полужирным шрифтом выделены последовательности обнаруженных пептидов.

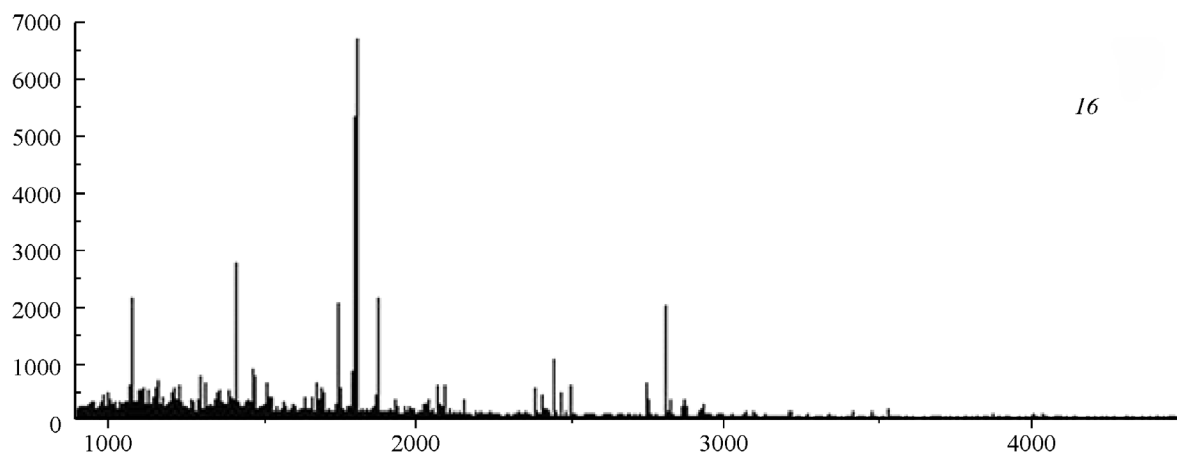
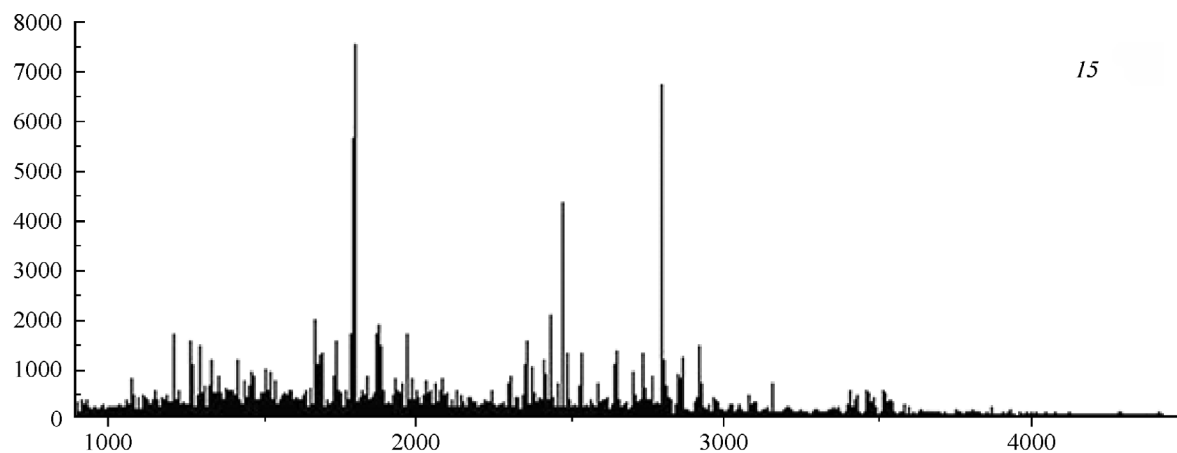


Рис. 8. Масс-спектры белков, выделенных из пятен 15 и 16 на рис. 1.

Перекрывание аминокислотных последовательностей белков, обнаруженных в пробах 15 и 16 на рис. 1

Номер пробы	Субъединица	Количество обнаруженных пептидов	Перекрывание последовательности, %
16	$\alpha 1$ (PSMA6)	46 MSRGSSAGFDRHITIFSPEGRLYQVEYAFKAINQGGLTSAVVRGKDCAVIVTQKKVDPKLL DSSTVTHLKFITENIGCVMTGMTADSRVQVQRARYEAANWKYKYGYEIPVDMCKRIADIS QVYTQNAEMRPLGCCMILIGIDEEQGPQVYKCDPAGYYCGFKATAPQVYKCDPAGYYCGF KATAAGVKQTESTSFLEKKVKKKFDWTFEQTVETAITCLSTVLSIDFKPSEIEVGVVTVENPKFR ILTEAEIDAHLVALAERD	82
15	$\alpha 6$ (PSMA1)	38 MFRNQYDNDVTWVSPQGRHQIEYAMEAVKQGSATVGLKSKTHAVLVALKRAQSELAHQ KKILHVDNHIGISIAGLTADARLLCNFMRQECLEDSRFVDRPLVSRVSLIGSKTQIPTQRY GRRPYGVLLIAGYDDMGPHIFQTCPSANYFDCRAMSIGARSQSARTYLERHMSEFMENLNE LNELVKHGLRALRETLPAEQDLTKNVSIGIVGKDLEFTIYDDDDVSPFLEGLEERQRKAQPA QPADEPAEKADPEMHN	68
	$\alpha 1$ (PSMA6)	10 MSRGSSAGFDRHITIFSPEGRLYQVEYAFKAINQGGLTSAVVRGKDCAVIVTQKKVDPKLLDS STVTHLKFITENIGCVMTGMTADSRVQVQRARYEAANWKYKYGYEIPVDMCKRIADISQVYT QNAEMRPLGCCMILIGIDEEQGPQVYKCDPAGYYCGFKATAAGVKQTESTSFLEKKVKKKFDW TFEQTVETAITCLSTVLSIDFKPSEIEVGVVTVENPKFRILTEAEIDAHLVALAERD	40

Примечание. Полужирным шрифтом выделены последовательности обнаруженных пептидов.

Результаты поиска для белка $\alpha 1$ в пробе 15 на рис. 1

m/z фактическое	m/z теоретическое	Различие молекулярной массы, Да	ПТМ	Пептид		Пропущенные сайты	Последовательность из Базы данных
				от	до		
1236.5810	1236.5778	0.0032	1PO4	12	21	0	(R)HITIFSPEGR(L)
1250.5960	1250.4989	0.097	1PO4	1	11	1	(-)MSRGSSAGFDR(H)
1320.5870	1320.5318	0.055	2PO4	22	30	0	(R)LYQVEYAFK(A)
1377.6110	1377.6303	-0.019	1PO4	172	182	1	(K)QTESTSFLEKK(V)
1440.7390	1440.7140	0.025	1PO4	60	71	0	(K)LLDSSTVTHLKF(I)
1440.7390	1440.7286	0.010	1Cys-am 1PO4	44	55	2	(R)GKDCAVIVTQKK(V)
1764.7850	1764.7263	0.059	3PO4	172	184	2	(K)QTESTSFLEKKV(K)
1895.9570	1896.0078	-0.051		165	182	2	(K)ATAAGVKQTESTSFLEKK(V)
2007.9910	2008.0520	-0.061	1PO4	55	71	2	(K)KVPDKLLDSSTVTHLKF(I)
2484.0930	2484.0532	0.040	1Met-ox 2PO4	1	21	2	(-)MSRGSSAGFDRHITIFSPEGR(L)
2484.0930	2484.1645	-0.072	1Met-ox 1Cys-am	72	93	1	(K)ITENIGCVMTGMTADSRVQVQR(A)
3549.4800	3549.4196	0.060	2Met-ox 4PO4	60	88	1	(K)LLDSSTVTHLKFITENIGCVMTGMTADSR(S)

Исходя из результатов исследования РНКазной активности экстрактов пятен (рис. 2, 3), можно предположить, что эндорибонуклеазной активностью обладает большее число субъединиц, чем нам удалось идентифицировать (из электрофореграмм видно, что способностью расщеплять использованные нами субстраты обладают также неидентифицированные белки из пятен 11, 13, 18—20). Эти данные согласуются с результатами экспериментов по анализу РНКазной активности созданных нами рекомбинантных субъединиц протеасом, слитых с глутатион-S-трансферазой: из шести сконструированных белков слияния пять ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ и $\alpha 7$) обладали спе-

цифической регулируемой эндорибонуклеазной активностью по отношению к двум РНК-субстратам (Федорова и др., 2010).

Сложность обсуждения результатов, полученных в ходе данного исследования, заключается в незначительном объеме работ, выполненных ранее в этой области. Полученные нами данные позволяют создать довольно стройную теорию о субъединицах, ответственных за расщепление РНК протеасомами. Исходя из наших результатов есть основания утверждать, что РНКазной активностью обладают по меньшей мере три α -субъединицы протеасом: описанные ранее в литературе $\alpha 1$ и $\alpha 5$ (Petit et al.,

Таблица 6

Фосфорилирование субъединиц протеасом

Пятно	Субъединица протеасом	Обнаруженные фосфопептиды	Фосфорилированные АК
1	$\alpha 7$ (PSMA3) MSSIGTG \underline{Y} DLSASTFSPDGRVVFQVEYAMKAVENSSTAIGIRCKDGVV FGVEKLVLSKLYEEGSNKRLFNVDHRVGMVAVAGLLADARSLADIAR EEASNFRSNFG \underline{Y} NIPLKHLADRVAMYVHAYTLYSAVRPFGCSFMLGS YSVNDGAQLYMIDPSGVSYG \underline{Y} WGCAIGKARQAAKTEIEKLMKEM TCRDIVKEVAKI \underline{Y} IVHDEVKDKAFELELSWVGELTNGRHEIVPKDIR EEAEKYAKE \underline{S} LKEEDE \underline{S} DDDDNM	(R)CKDGVVFGVEK(L) 1PO4 (R)VFQVEYAMKAVENS STAIGIR(C) 2PO4 (K)AVENSSTAIGIRCK(D) 2PO4	2 из 4: Y26/S34/S35/ T36
4	$\alpha 7$ (PSMA3) MSSIGTG \underline{Y} DLSASTFSPDGRVVFQVEYAMKAVENSSTAIGIRCKDGVV GVEKLVLSKLYEEGSNKRLFNVDHRVGMVAVAGLLADARSLADIARE EASNFRSNFG \underline{Y} NIPLKHLADRVAMYVHAYTLYSAVRPFGCSFMLGSY SVNDGAQLYMIDPSGVSYG \underline{Y} WGCAIGKARQAAKTEIEKLMKEMTC RDIVKEVAKI \underline{Y} IVHDEVKDKAFELELSWVGELTNGRHEIVPKDIREE AEKYAKE \underline{S} LKEEDE \underline{S} DDDDNM	(R)CKDGVVFGVEK(L) 1PO4 (R)VFQVEYAMKAVENS STAIGIR(C) 1PO4 (K)AVENSSTAIGIRCK(D) 2PO4	2 из 3: S34/S35/T36
5	$\alpha 7$ (PSMA3) MSSIGTG \underline{Y} DLSASTFSPDGRVVFQVEYAMKAVENSSTAIGIRCKDGVV GVEKLVLSKLYEEGSNKRLFNVDHRVGMVAVAGLLADARSLADIARE EASNFRSNFG \underline{Y} NIPLKHLADRVAMYVHAYTLYSAVRPFGCSFMLGSY SVNDGAQLYMIDPSGVSYG \underline{Y} WGCAIGKARQAAKTEIEKLMKEMTC RDIVKEVAKI \underline{Y} IVHDEVKDKAFELELSWVGELTNGRHEIVPKDIREE AEKYAKE \underline{S} LKEEDE \underline{S} DDDDNM	(K)AVENSSTAIGIRCK(D) 1PO4	1 из 3: S34/S35/T36
7	$\alpha 5$ (PSMA5) MFLTRSE \underline{Y} DRGVNTFSPEGR \underline{L} FQVEYAIEAIKLGSTAIGIQTSEGVCLA VEKRI \underline{T} SPLMEPSSIEKIVEIDAHIGCAMSGLIADAKTLIDKARVETQN HWFTYNETMTVESVTQAVSNLALQFGEEDADPGAMSRPFGVALLF GGVDEKGPQLFHMDPSTFVQCDARAIGSASEGAQSSLQEV \underline{Y} HKSM TLKEAIKSSLILKQVMEEKLNATNIELATVQPGQNFHMF \underline{T} KEELE EVIKDI	(R)ITSPLMEPSSIEK(I) 1PO4	1 из 4: T55/S56/S62/S63
9	$\alpha 5$ (PSMA5) MFLTRSE \underline{Y} DRGVNTFSPEGR \underline{L} FQVEYAIEAIKLGSTAIGIQTSEGVCLA VEKRI \underline{T} SPLMEPSSIEKIVEIDAHIGCAMSGLIADAKTLIDKARVETQN HWFTYNETMTVESVTQAVSNLALQFGEEDADPGAMSRPFGVALLFG GVDEKGPQLFHMDPSTFVQCDARAIGSASEGAQSSLQEV \underline{Y} HKSMT LKEAIKSSLILKQVMEEKLNATNIELATVQPGQNFHMF \underline{T} KEELEEVI KDI	(R)ITSPLMEPSSIEK(I) 2PO4	2 из 4: T55/S56/S62/S63
15	$\alpha 1$ (PSMA6) MSRGSSAGFDRHITIFSPEGRL \underline{Y} QVEYAFKAINQGGLT \underline{S} VAVRGKDC AVIVTQKKVPDKLLD \underline{S} STVTHL \underline{F} KITENIGCVMTGMTAD \underline{S} RSQVQRA R \underline{Y} EAA \underline{N} WK \underline{Y} KYG \underline{Y} EIPVDM \underline{L} CKRIADISQVYTQNAEMRPLGCCMIL IGIDEEQGPQVYKCDPAG \underline{Y} YCGFKATAAGVKQTESTSFLEKKVKKKF DWTFEQTVETAITCLSTVLSIDFKPSEIEVGVVTVENPKFRILTEAEIDA HLVALAERD	(R)HITIFSPEGR(L) 1PO4 (-)MSRGSSAGFDR(H) 1PO4 (R)LYQVEYAFK(A) 2PO4 (K)QTESTSFLEKK(V) 1PO4 (K)LLDSSTVTHL \underline{F} K(I) 1PO4 (R)GKDCAVIVTQKK(V) 1PO4 (K)QTESTSFLEKKV(K) 3PO4 (K)KVPDKLLDSSTVTHL FK(I) 1PO4 (-)MSRGSSAGFDRHITIFS PEGR(L) 2PO4 (K)LLDSSTVTHL \underline{F} KITENIG CVMTGMTADSR(S) 4PO4	1 из 3 : S2/S5/S6, 1 из 2 : T14/S17, Y23, Y27 , T52, 1 из 3 : S63/S64/T65, 3 из 4 : T73/T81/T84/S87 3 из 4 : T173/S175/T176 /S177

Примечание. Курсивом обозначены фосфорилированные аминокислотные остатки (по данным Phosphosite.org); подчеркнуты фосфо-ИТМ, обнаруженные нами в настоящей работе; полужирным шрифтом выделены фосфо-ИТМ, для которых определены конкретные сайты фосфорилирования.

1997a, 1997b; Jorgensen, Hendil, 1999), а также обнаруженная в настоящей работе субъединица $\alpha 7$. Рядом с белком $\alpha 7$ в цилиндрической структуре протеасомы располагается субъединица $\alpha 1$, которая способна специфически связывать РНК и отвечает за выбор субстрата. Каталитически активные субъединицы $\alpha 1$, $\alpha 5$ и $\alpha 7$, располагающиеся вблизи сайта связывания РНК, способны по-разному регулироваться наличием в среде двухвалентных катионов и посттрансляционными модификациями. Такая модель согласуется со всеми ранее полученными экспериментальными данными и подтверждает предположение о важной роли протеасом в регуляции экспрессии генов на уровне стабильности мРНК (Konstantinova et al., 2008).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-01397а и 13-04-01024а) и ФЦНТП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (соглашение № 8280).

Список литературы

- Евтеева И. Н., Куличкова В. А., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Миттенберг А. Г., Тесленко Л. В., Обухова А. Д., Пеннийainen В. А., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2000. Новая эндорибонуклеазная активность 26S протеасом из клеток линии A431. Цитология. 42 (7) : 675—680. (Evtseeva I. N., Kulichkova V. A., Volkova I. V., Ermolaeva Yu. B., Teslenko L. V., Obukhova A. D., Penniainen V. A., Gauze L. N., Konstantinova I. M. 2000. Novel endoribonuclease activity of 26S proteasomes from A431 cells. Tsitologiya. 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 в клетках линии A431 : возможное участие протеасом в контроле над стабильностью РНК эпидермальным фактором роста. Цитология. 45 (5) : 488—492. (Evtseeva I. N., Kulichkova V. A., Obukhova A. D., Mittenberg A. G., Volkova I. V., Ermolaeva Yu. B., Toktarova M. V., Teslenko L. V., Gauze L. N., Konstantinova I. M. 2003. EGF regulation of specific endoribonuclease activity of 26S proteasomes from A431 cells: a potential role of proteasomes in control of mRNA stability. Tsitologiya. 45 (5) : 488—492.)
- Куличкова В. А., Ермолаева Ю. Б., Миттенберг А. Г., Волкова И. В., Цимоха А. С., Евтеева И. Н., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2005. Влияние ЭФР на активности ядерных и цитоплазматических протеасом в клетках A431. Цитология. 47 (9) : 774—779. (Kulichkova V. A., Ermolaeva Yu. B., Mittenberg A. G., Volkova I. V., Tsimokha A. S., Evtseeva Yu. N., Gauze L. N., Konstantinova I. M. 2005. Effect of EGF on the activity of nuclear and cytoplasmic 26S proteasomes in A431 cells. Tsitologiya. 47 (9) : 774—779.)
- Куличкова В. А., Миттенберг А. Г., Евтеева И. Н., Токтарова М. В., Цимоха А. С., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2004а. Селективное влияние эпидермального фактора роста на эндорибонуклеазную активность различных субпопуляций протеасом в клетках линии A431. Специфичность популяций протеасом, экспортируемых из клеток. Цитология. 46 (6) : 525—530. (Kulichkova V. A., Mittenberg A. G., Evtseeva I. N., Toktarova M. V., Tsimokha A. S., Volkova I. V., Ermolaeva Yu. B., Gauze L. N., Konstantinova I. M. 2004a. Selective effect of epidermal growth factor on the endoribonuclease activity of different subpopulations of proteasomes from A431 cell line. Specificity of extracellular proteasome population. Tsitologiya. 46 (6) : 525—530.)
- Куличкова В. А., Миттенберг А. Г., Ермолаева Ю. Б., Цимоха А. С., Волкова И. В., Кожухарова И. В., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2004б. Специфичность популяции протеасом, экскретируемых из клеток в культуральную среду. Докл. РАН. 399 (5) : 503—506. (Kulichkova V. A., Mittenberg A. G., Ermolaeva Yu. B., Tsimokha A. S., Volkova I. V., Kozhukharova I. V., Gauze L. N., Konstantinova I. M. 2004b. Specificity of the proteasome population secreted from cells into the culture medium. Dokl. Akad. Nauk. 399(5) : 503—506.)
- Миттенберг А. Г., Куличкова В. А., Медведева Н. Д., Волкова И. В., Ермолаева Ю. Б., Константинова И. М. 2002а. Характеристики эндорибонуклеазной активности протеасом из клеток линии K562. II. Анализ нуклеолиза специфических мРНК протеасомами. Цитология. 44 (4) : 357—363. (Mittenberg A. G., Kulichkova V. A., Medvedeva N. D., Volkova I. V., Ermolaeva Yu. B., Konstantinova I. M. 2002a. Properties of endoribonuclease activity of proteasomes from K562 cells. II. Analysis of specific mRNA nucleolysis by proteasomes. Tsitologiya. 44 (4) : 357—363.)
- Миттенберг А. Г., Куличкова В. А., Медведева Н. Д., Пеннийainen В. А., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2002б. Характеристики эндорибонуклеазной активности протеасом из клеток линии K562. I. Зависимость РНКазной активности протеасом и α -РНП от условий реакции эндонуклеолиза. Цитология. 44 (2) : 181—187. (Mittenberg A. G., Kulichkova V. A., Medvedeva N. D., Penniainen V. A., Gauze L. N., Konstantinova I. M. 2002b. Characteristics of endoribonuclease activity of proteasomes from K562 cells. I. Dependence of RNase activity of proteasome and alpha-RNP on conditions of endonucleolysis reaction. Tsitologiya. 44 (2) : 181—187.)
- Миттенберг А. Г., Моисеева Т. Н., Пугачева И. В., Куличкова В. А., Цимоха А. С., Гаузе Л. Н., Константинова И. М. 2007. Регуляция специфичности эндорибонуклеазной активности протеасом при действии индукторов дифференцировки и апоптоза на клетки линии K562. Цитология. 49 (2) : 142—148. (Mittenberg A. G., Moiseeva T. N., Pugacheva I. V., Kulichkova V. A., Tsimokha A. S., Gauze L. N., Konstantinova I. M. 2007. Regulation of the specificity of the 26S proteasome endoribonuclease activity in K562 Cells under the action of differentiation and apoptosis inducers. Cell Tissue Biol. 1 (2) : 162—168.)
- 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 (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 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 программированной клеточной гибели. Цитология. 46 (3) : 283—290. (Toktarova M. V., Kulichkova V. A., Mittenberg A. G., Kozhukharova I. V., Volkova I. V., Ermolaeva Yu. B., Peshekhonov A. V., Ignatova T. N., Gauze L. N., Konstantinova I. M. 2004. Selective effect of inducers of apoptosis on the endoribonuclease activity of 26S proteasomes and alpha-RNP particles in K562 cells: possible involvement of 26S proteasomes and alpha-RNP in the regulation of RNA stability. Tsitologiya. 46 (3) : 283—290.)
- Федорова О. А., Моисеева Т. Н., Миттенберг А. Г., Барлев Н. А. 2010. Эндорибонуклеазная активность рекомбинантных альфа-субъединиц протеасом. Цитология. 52 (12) : 1012—1015. (Fedorova O. A., Moiseeva T. N., Mittenberg A. G., Barlev N. A. 2010. Recombinant proteasomal alpha-type subunits exhibit endoribonuclease activity. Cell Tissue Biol. 5 (2) : 123—126.)
- Ballut L., Petit F., Mouzeyar S., Le Gall O., Candresse T., Schmid P., Nicolas P., Badaoui S. 2003. Biochemical identification of proteasome-associated endonuclease activity in sunflower. Biochim. biophys. acta. 1645 (1) : 30—39.
- Barlev N. A., Sayan B. S., Candi E., Okorokov A. L. 2010. The microRNA and p53 families join forces against cancer. Cell Death and Differentiation. 17 (2) : 373—375.

- Bey F., Silva Pereira I., Coux O., Viegas-Pequignot E., Recillas Targa F., Nothwang H. G., Dutrillaux B., Scherrer K. 1993. The prosomal RNA-binding protein p27K is a member of the alpha-type human prosomal gene family. *Mol. Gen. Genet.* 237 (1—2): 193—205.
- Dielen A. S., Sasaki F. T., Walter J., Michon T., Menard G., Pagny G., Krause-Sakate R., Maia Ide G., Badaoui S., Le Gall O., Candresse T., German-Retana S. 2011. The 20S proteasome $\alpha 5$ subunit of *Arabidopsis thaliana* carries an RNase activity and interacts in planta with the lettuce mosaic potyvirus HcPro protein. *Mol. Plant Pathol.* 12 (2): 137—150.
- 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 (3—4): 258—265.
- Gautier-Bert K., Murol B., Jarrouse A. S., Ballut L., Badaoui S., Petit F., Schmid H. P. 2003. Substrate affinity and substrate specificity of proteasomes with RNase activity. *Mol. Biol. Rep.* 30: 1—7.
- Jarrouse A.-S., Petit F., Kreutzer-Schmid C., Geadigk R. 1999. Possible involvement of proteasomes (prosome) in AUUUA-mediated mRNA decay. *J. Biol. Chem.* 274: 5925—5930.
- Jorgensen L., Hendil K. B. 1999. Proteasome subunit zeta, a putative ribonuclease, is also found as a free monomer. *Mol. Biol. Rep.* 26 (1—2): 119—123.
- Konstantinova I. M., Tsimokha A. S., Mittenberg A. G. 2008. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 267: 99—166.
- Kulichkova V. A., Fedorova O. A., Tsimokha A. S., Moiseeva T. N., Bottril 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 (4): 840—849.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680—685.
- Marouco D., Garabadiu A. V., Melino G., Barlev N. A. 2013. Lysine-specific modifications of p53: a matter of life and death? *Oncotarget.* 4 (10): 1556—1571.
- Mittenberg A. G., Moiseeva T. N., Barlev N. A. 2008. The role of proteasomes in transcription and their regulation by post-translational modifications. *Front. Biosci.* 13: 7184—7192.
- O'Farrell P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 (10): 4007—4021.
- Petit F., Jarrouse A.-S., Boissonnet G., Dadet M.-H., Buri J., Briand Y., Schmid H.-P. 1997a. Proteasome (prosome) associated endonuclease activity. *Mol. Biol. Rep.* 24: 113—117.
- Petit F., Jarrouse A.-S., Dahmann B., Sobek A., Hendil K.B., Buri J., Briand Y., Schmid H.-P. 1997b. Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation. *Biochem. J.* 326: 93—98.
- Pouch M., Petit F., Buri J., Briand Y., Schmid H.-P. 1995. Identification and initial characterization of a specific proteasome (prosome) associated RNase activity. *J. Biol. Chem.* 270: 22 023—22 028.
- Tourriere H., Chebli K., Tazi J. 2002. mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie.* 84: 821—837.
- 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 (4): 338—348.

Поступила 7 II 2014

MASS-SPECTROMETRIC ANALYSIS OF PROTEASOMAL SUBUNITS POSSESSING ENDORIBONUCLEASE ACTIVITY

A. G. Mittenberg,^{1,*} T. N. Moiseeva,¹ V. O. Kuzyk,¹ E. P. Podolskaya,² I. N. Evteeva,¹ N. A. Barlev,^{1,3}

¹ Institute of Cytology RAS, ² Institute for Analytical Instrumentation RAS, St. Petersburg, Russia, and

³ Department of Biochemistry, Leicester University, United Kingdom;

* e-mail: a.mittenberg@gmail.com

Proteasomes act as the main apparatus of non-lysosomal intracellular proteolysis and participate in the regulation of most important cellular processes. Despite considerable progress in the understanding of proteasome's functioning, some issues, in particular, RNase activity of these ribonucleoprotein complexes and its regulation remain scarcely explored. In this paper we found several proteins corresponding by electrophoretic mobility to subunits of the complex 20S proteasome to possess endoribonuclease activity with respect to both sense and antisense sequences of the *c-myc* mRNA 3'-UTR. Mass-spectrometric analysis of tryptic hydrolysates of these proteins revealed in the samples the presence of 20S proteasome subunits — $\alpha 1$ (PSMA6), $\alpha 5$ (PSMA5), $\alpha 6$ (PSMA1) and $\alpha 7$ (PSMA3). A number of novel phosphorylation sites in subunits $\alpha 1$ (PSMA6) and $\alpha 7$ (PSMA3), and the form of subunit $\alpha 5$ (PSMA5) with a deletion of N-terminal 20 amino acid residues detected. The observed differences of individual subunits in the possession endonuclease activity could be apparently explained by posttranslational modifications of these proteins, in particular — by phosphorylation. It is shown that the specificity of the proteasomal RNase activity varies after dephosphorylation and also influenced by Ca and Mg cations. The conclusions made about the impact of the PTM status of proteasome subunits on the specificity of their RNase activity.

Key words: proteasomes, ribonucleases, mRNA stability, posttranslational modifications, phosphorylation, mass-spectrometry.