

УДК 577.21: 577.3

И.В.Пугачева (5 курс, каф. БФ), А.Г.Миттенберг, к.б.н., ИНЦ РАН

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЭНДОРИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СУБПОПУЛЯЦИЙ ПРОТЕАСОМ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ K562 ПРИ ИНДУКЦИИ ЭРИТРОИДНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Все этапы жизни клетки регулируются белковым метаболизмом, включающим в себя синтез и деградацию полипептидов. В эукариотической клетке до 80 – 90 % всех внутриклеточных белков подвергаются протеолизу по АТФ- и убиквитин-зависимому пути, ключевым ферментом которого является мультисубъединичный комплекс – 26S протеасома. Популяция протеасом гетерогенна и субъединичный состав этих комплексов варьируются в зависимости от типа клетки и ее функционального состояния.

Недавно в ядрах и цитозоле клеток различной видовой и тканевой принадлежности был выявлен новый класс рибонуклеопротеидов – α -РНП частицы, в состав которых входит 20S протеасома, малые антисмысловые РНК и некоторые еще не идентифицированные высокомолекулярные белки [1].

Было показано, что протеасомы и α -РНП частицы обладают эндорибонуклеазной активностью, строго специфичной по отношению к определенным молекулам РНК и зависящей от присутствия бивалентных ионов щелочноземельных металлов, статуса фосфорилирования субъединиц комплекса и некоторых других факторов [2-4].

Контроль над стабильностью молекул информационных РНК является важным этапом регуляции экспрессии генов в эукариотической клетке. Несмотря на это, рибонуклеазы, осуществляющие деградацию эукариотических мРНК, изучены слабо.

Цель данной работы состояла в исследовании специфичности эндорибонуклеазной активности протеасом и α -РНП по отношению к различным мРНК-субстратам и особенностей ее регуляции в клетках человека линии K562 при индукции эритроидной дифференцировки.

В данной работе для индукции эритроидной дифференцировки использовался гемин [5]. В качестве субстратов для субпопуляций протеасом выступали последовательности мРНК *p53*, как смысловая, так и антисмысловая, а также смысловые и антисмысловые транскрипты 3'-НТР генов *c-myc* и *c-fos*.

Было обнаружено, что смысловая последовательность мРНК *p53* практически не разрушается протеасомами из цитоплазмы и ядра, а также α -РНП частицами контрольных клеток. Наиболее полный эндорибонуклеолиз осуществляют протеасомы из кондиционированной контрольными клетками среды в отсутствие двухвалентных катионов. Протеасомы и α -РНП из клеток, индуцированных к эритроидной дифференцировке, проявляют значительно большую активность по отношению к мРНК *p53*. Так, цитоплазматические протеасомы активны в присутствии ионов Ca^{2+} , ядерные и из среды – Mg^{2+} , а α -РНП осуществляет эндонуклеолиз смысловой мРНК *p53* только в отсутствие ионов Ca^{2+} .

Антисмысловая последовательность мРНК *p53* в отсутствие ионов практически не подвергается эндонуклеолизу протеасомами из контрольных клеток. Наибольшая активность наблюдается у α -РНП и цитоплазматических протеасом, причем у первых в присутствии Ca^{2+} , а у вторых – Mg^{2+} . В индуцированных клетках ситуация аналогична, хотя цитоплазматические протеасомы проявляют очень сильную активность при инкубации с ионами Ca^{2+} , в отличие от протеасом, выделенных из цитоплазмы контрольных клеток.

При инкубации смысловой последовательности 3'-НТР мРНК *c-myc* с протеасомами из контрольных клеток, реакцию эндонуклеолиза осуществляли только протеасомы из кондиционированной клетками среды в присутствии ионов Ca^{2+} и α -РНП в отсутствие ионов. Субпопуляции протеасом из индуцированных к дифференцировке клеток оказались одинаково активными по отношению к смысловому фрагменту в отсутствие бивалентных катионов.

Антисмысловая последовательность мРНК *c-myc* расщеплялась как протеасомами, так и α -частицами, выделенными из контрольных клеток, хотя для прохождения реакции необходимо присутствие ионов, в особенности Ca^{2+} . Поведение α -РНП индуцированных к дифференцировке клеток аналогично таковому у α -РНП контрольных клеток.

Смысловые транскрипты 3'-НТР мРНК *c-fos* подвергаются эндонуклеолизу в присутствии ионов Ca^{2+} субпопуляциями протеасом как из контрольных, так и из индуцированных клеток. Инкубация с ионами Mg^{2+} по-разному влияет на активность комплексов.

Антисмысловые последовательности мРНК *c-fos* специфически расщепляются всеми использованными нами ферментами (из контрольных и индуцированных клеток) в присутствии ионов, особенно Ca^{2+} , хотя в случае протеасом из среды контрольных клеток ионы Mg^{2+} блокируют активность фермента. Без добавления в реакционную смесь бивалентных катионов все ферменты малоактивны.

В данной работе впервые показана способность 26S протеасом осуществлять эндорибонуклеолиз мРНК протоонкогенов (*c-fos*, *c-myc*) и гена опухолевого супрессора *p53*, а также зависимость этой реакции от используемого субстрата. Кроме того, мы показали, что специфичность эндорибонуклеазной активности изменяется при эритроидной дифференцировке клеток K562, и что добавление в реакционную смесь бивалентных катионов Mg^{2+} и Ca^{2+} влияет на проявление и специфичность данной активности.

На основе полученных результатов были сделаны следующие выводы: 1. Протеасомы и α -РНП из клеток линии K562 проявляют эндорибонуклеазную активность по отношению к различным информационным РНК при индукции в этих клетках эритроидной дифференцировки. 2. Проявление протеасомами и α -РНП эндорибонуклеазной активности различается в зависимости от клеточных субпопуляций (ядро, цитоплазма, кондиционированная клетками среда), а также от физиологического состояния клетки (контроль или индукция эритроидной дифференцировки). 3. РНКазная активность комплексов изменяется в зависимости от присутствия бивалентных катионов (Mg^{2+} и Ca^{2+}). 4. Протеасомы и α -РНП проявляют различия в специфичности деградации индивидуальных мРНК (*p53*, *c-myc*, *c-fos* человека).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Константинова И.М., Петухова О.А., Куличкова В.А., Туроверова Л.В., Волкова И.В., Илькаева О.Р., Кожухарова И.В., Ермолаева Ю.Б. 1995. Мол. Биол. 29(5): 761-771.
2. Куличкова В.А., Волкова И.В., Туроверова Л.В., Евтеева И.Н., Ермолаева Ю.Б., Миттенберг А.Г., Урсова М.Е., Галкин В.Э., Гаузе Л.Н., Константинова И.М. 1999. Мол. Биол. 33(5): 764-771.
3. Petit F., Jarrousse A.-S., Boissonnet G., Dadet M.-H., Buri J. 1997a. Mol. Biol. Rep. 24: 113-117.

4. Petit F., Jarrousse A.-S., Dahlmann B., Sobek A., Hendil K.B., Buri J., Briand Y., Schmid H.-P. 1997b. *Biochem. J.* 326: 93-98.
5. Andersson L.S., Nilsson K., Gahmberg C.G. 1979. *Int. J. Cancer* 23: 143-147.