

УДК 577.21: 577.33

Е.С.Вашукова (6 курс, каф. БФ), В.А.Куличкова, к.б.н. (ИНЦ РАН),
А.С.Цимоха, м.н.с. (ИНЦ РАН)

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИЗМЕНЕНИЙ В ПРОТЕАСОМАХ КЛЕТОК K562 ПРИ АПОПТОЗЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ ДОКСОРУБИЦИНОМ

Одной из актуальных проблем современной молекулярной биологии является исследование 26S протеасом. Важнейшая функция протеасом – нелизосомальная деградация внутриклеточных белков, в основе которой лежит АТФ- и убиквитин-зависимый путь. Уничтожению подвергаются неправильно синтезированные и денатурированные белки, а также различные регуляторные факторы. Убиквитин-зависимый протеолиз играет определяющую роль в таких клеточных процессах, как онкогенез, апоптоз, транскрипция, клеточный цикл, реакция на стрессовые воздействия, в том числе воспалительный и иммунный ответ [1].

Протеасомы были обнаружены в ядре и в цитоплазме эукариотической клетки. 26S протеасомы, или мультисубъединичные высококонсервативные белковые комплексы с молекулярной массой около 2500 кДа и с коэффициентом седиментации 26S, состоят из центрального цилиндрического 20S ядра (кора), или 20S протеасомы, и двух регуляторных комплексов 19S или 11S частиц.

Предполагается, что популяция протеасом гетерогенна по субъединичному составу. Гетерогенность субъединичного состава обуславливается наличием в клетке изоформ и модификаций некоторых субъединиц. Под воздействием γ -интерферона в клетках синтезируются три дополнительных β -белка, называемых иммунными (или индуцибельными), они замещают определенные конституционно-экспрессируемые β -субъединицы, в этом случае образуется иммунопротеасома. Примером модификации может служить фосфорилирование субъединиц [1-3].

Целью данного исследования являлся сравнительный анализ субъединичного состава, статуса фосфорилирования, эндорибонуклеазной активности ядерных и цитоплазматических 26S протеасом, выделенных из контрольных и апоптотических клеток проэритролейкемии человека линии K562 и из их среды. В качестве индуктора апоптоза в работе был использован доксорубицин (DOXO).

В ходе работы мы показали, что субъединичный состав 26S протеасом, выделенных из цитоплазмы, ядра и среды, различается. В индуцированных к апоптозу клетках белковый состав 26S комплексов изменяется.

В настоящее время известно, что в клетке некоторые субъединицы 26S протеасом фосфорилированы. В литературе есть данные о влиянии дефосфорилирования белковых субъединиц протеасом на их ферментативную активность. Предполагается, что фосфорилирование/дефосфорилирование может регулировать различные активности протеасом, вызывая изменение их конформационного состояния. Кроме того, фосфорилирование протеасомных субъединиц регулируется при изменении функционального состояния клеток [3].

В данной работе мы впервые выявили отличия в статусе фосфорилирования 26S протеасом из цитоплазмы, ядер и из среды, как по тирозину, так и по треонину. Также показали, что фосфорилирование субъединиц протеасом (по тирозину и треонину) изменяется в апоптотических клетках по сравнению с контрольными клетками.

Несколько лет назад было обнаружено, что 20S протеасома, кроме протеолитической активности, способна и к специфическому эндонуклеотическому расщеплению РНК вируса табачной мозаики [4]. Вскоре оказалось, что эндорибонуклеазной активностью обладают и

26S протеасомы, а в качестве субстрата для расщепления могут выступать различные РНК эукариот, как рибосомные, так и специфические информационные [5]. Предполагается, что одним из уровней контроля экспрессии генов, вероятно, может являться регуляция скорости деградации молекул информационных РНК.

Мы показали, что дефосфорилирование ядерных и цитоплазматических протеасом щелочной фосфатазой кишечника телят (СІАР) вызывает ингибирование их эндорибонуклеазной активности по отношению к суммарной клеточной РНК, причем в случае ядерных протеасом происходит практически полное подавление их РНКазы.

В данной работе мы также обнаружили, что происходит изменение эндорибонуклеазной активности протеасом из клеток, запущенных в апоптоз, по сравнению с протеасомами из контрольных клеток. В апоптотических клетках активность РНКазы протеасом из ядер и цитоплазмы ингибируется, РНКАза протеасом из среды, наоборот, активируется. Таким образом, можно предположить, что протеасомы участвуют в контроле стабильности РНК белков, участвующих в регуляции апоптоза.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что фосфорилирование/ дефосфорилирование протеасом может являться одним из возможных путей проведения апоптотического сигнала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 05-04-49606) и Санкт-Петербургского Научного Центра.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Абрамова Е.Б., Шарова Н.П., Карпов В.Л. Мол. Биол. 2002, т.36, с.761-776.
2. Bose S., Brooks P., Mason G.G.P., Rivett A.J. Biochem J. 2001, v. 353, p. 291-297.
3. Цимоха А.С., Ватажок Ю.Я., Вашукова Е.С. и др. Цитология 2005, т. 47, с. 436-441.
4. Petit F., Jarrouse A.-S., Boissonnet G., Dadet M.-H., Buri J., Briand Y., Schmidt H.-P. Mol. Biol. Rep. 1997, v. 24, p. 113-117.
5. Евтеева И.Н., Куличкова В.А., Миттенберг А.Г., и др. Цитология 2000, т. 42, с. 675-680.