

УДК 577

Т.Н.Моисеева (5 курс, каф. БФ), А.Г.Миттенберг, к.б.н., н.с. (ИНЦ РАН)

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОРИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВЫХ СУБЪЕДИНИЦ ПРОТЕАСОМ

26S протеасома представляет собой мультикаталитическую протеазу, которая отвечает за расщепление большинства клеточных белков. Протеасомы обнаруживаются в цитоплазме и ядре клеток, причём протеасомы разных популяций отличаются по субъединичному составу и свойствам. При изменении физиологического состояния клетки может происходить миграция протеасом из ядра в цитоплазму или наоборот, а также экспорт их во внеклеточную среду и импорт из оной. Открытие убиквитин-зависимого пути деградации белков и активное исследование протеолитических активностей протеасом показало, что эти частицы являются незаменимыми во многих клеточных процессах, таких как апоптоз, дифференцировка, контроль клеточного цикла, регуляция стабильности онкобелков и опухолевых супрессоров.

В середине 1990-х годов была впервые обнаружена способность 20S протеасом расщеплять некоторые РНК. Последующие исследования показали, что эта эндорибонуклеазная активность является специфичной, и РНК разрезаются по AUUUA-богатым участкам. Было также показано, что за данную активность отвечают по крайней мере две субъединицы  $\alpha$ -типа – зета и иота, которые способны осуществлять эндонуклеолиз после диссоциации протеасом *in vitro*. Субъединица зета была обнаружена в клетке в виде свободного мономера, который тоже обладал специфической эндорибонуклеазной активностью.

Обсуждается возможное участие протеасом в контроле над стабильностью клеточных РНК. Важной особенностью протеолитических путей с участием протеасом является возможность быстрого и практически полного удаления из клетки определённого белка. Способность протеасом расщеплять также и мРНК для этого белка увеличивала бы скорость «выключения» определённых генов, что необходимо при перестройке клеточных систем в ходе изменения физиологического состояния клетки.

Для исследования способности компонентов протеасом к специфическому эндонуклеолизу смесь субъединиц, образовавшуюся при диссоциации протеасом, разделяли методом двумерного электрофореза. Из зоны геля, соответствующей подвижности субъединиц 20S протеасомы, выбрали 20 дискретных пятен, из которых затем были экстрагированы белки.

Полученные экстракты были исследованы на наличие эндорибонуклеазной активности в различных условиях. В качестве субстратов использовали смысловую и антисмысловую последовательности 3'-нетранслируемой области мРНК *c-myc* человека. Проверяли способность белков к эндонуклеолизу в отсутствие двухвалентных катионов, в присутствии 12.5 мМ CaCl<sub>2</sub> или 12.5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Отдельный интерес представляло исследование изменения активности субъединиц после дефосфорилирования их щелочной фосфатазой, так как мы предполагали, что некоторые пятна представляют собой одни и те же субъединицы с различными модификациями (вероятнее всего – с различным статусом фосфорилирования).

Было установлено, что 16 из 20 пятен содержали белки, способные расщеплять по крайней мере один из предложенных субстратов в определённых условиях. Присутствие в реакционной среде двухвалентных катионов и дефосфорилирование неоднозначно влияло на РНКазную активность этих белков. Возможно, *in vivo* такая сложная регуляция позволяет

изменением условий и статуса фосфорилирования активировать субъединицы, способные расщепить не нужную более в клетке РНК.

Сравнение расположения пятен на геле после двумерного электрофореза, а также характеристик РНКазной активности белков, экстрагированных из этих пятен, позволило предположить, что в некоторых случаях несколько пятен содержат модифицированные формы одной и той же субъединицы. Это относится, например, к пятнам 1-5. Способность белков из всех этих пятен к расщеплению антисмысловой последовательности 3'-нетранслируемой области мРНК с-туса активировалась в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и подавлялись при добавлении  $\text{Mg}^{2+}$  и после дефосфорилирования субъединиц.

Если наше предположение относительно соответствия нескольких пятен одной субъединице верно, то в 20 исследованных нами пятнах содержатся около 12 различных белков, примерно 10 из которых проявили способность к расщеплению хотя бы одного из предложенных субстратов. Ранее было известно, что за РНКазную активность протеасом ответственны по крайней мере 2 субъединицы  $\alpha$ -типа, что позволило сделать предположение о специфическом назначении  $\alpha$ -субъединиц для расщепления РНК, аналогично тому, как за расщепление белков отвечают  $\beta$ -субъединицы. 20S протеасома содержит по 2 копии каждой из 7 различных  $\alpha$ -субъединиц. Таким образом, количество белков, способных к эндонуклеолизу, превышает число различных  $\alpha$ -субъединиц в протеасоме. Это говорит о возможном участии в расщеплении РНК субъединиц  $\beta$ -типа или компонентов регуляторных комплексов, так как после двумерного электрофореза комплекс PA28 оказывается в той же области геля, что и субъединицы 20S протеасом.

В дальнейшем предполагается провести идентификацию отдельных субъединиц с использованием антител, а также методом масс-спектрометрии. Это позволит более точно определить, какие белки отвечают за способность протеасом к расщеплению РНК, а также сказать какие пятна соответствуют различным субъединицам, а какие представляют собой их модификации. Возможно также установить, какие именно это модификации и как они могут влиять на расщепление субстрата протеасомой.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (проекты №2231.2003.4 и №05-04-49606) и проектов, финансируемых СПбНЦ РАН.