

На правах рукописи

УДК 577.218+577.152.277\*16

**Цимоха**  
**Анна Сергеевна**



**ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА И ФЕРМЕНТАТИВНЫХ АКТИВНОСТЕЙ  
ПРОТЕАСОМ ПРИ АПОПТОЗЕ В КЛЕТКАХ K562**

03.00.03. – молекулярная биология

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2007

Работа выполнена в лаборатории регуляции экспрессии генов  
Института цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Научный руководитель: доктор биологических наук  
**Константинова Ирина Михайловна,**  
Институт цитологии РАН,  
г. Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
**Корнилова Елена Сергеевна,**  
Институт цитологии РАН,  
г. Санкт-Петербург

доктор биологических наук, профессор  
**Перевозчиков Андрей Петрович,**  
НИИ экспериментальной медицины РАМН,  
г. Санкт-Петербург

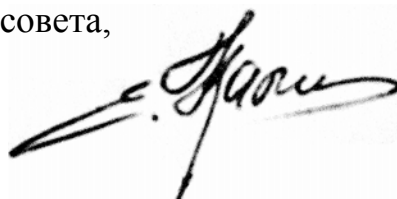
Ведущая организация: Санкт-Петербургский  
Государственный Университет,  
биолого-почвенный факультет

Защита состоится «30» марта 2007 года в 13 часов на заседании  
Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу:  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4  
e-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан «26» февраля 2007 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Е.В.Каминская

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Апоптоз, или программированная клеточная гибель, является важнейшим механизмом контроля над качеством и численностью клеточной популяции в многоклеточном организме. Он обеспечивает равновесие в пролиферации клеток, элиминации поврежденных (например, радиацией), пораженных вирусом и неопластических клеток, а также селекцию лимфоцитов, при которой удаляются аутоиммунные клоны. Неспособность клеток претерпевать апоптоз – это один из ключевых моментов в опухолеобразовании. Молекулярные механизмы, задействованные в этом процессе, до сих пор окончательно не исследованы.

В настоящее время широко изучается участие в апоптозе протеасом. При использовании ингибиторов протеасом обнаружили как проапоптотное, так и антиапоптотное функционирование протеасом в клетке (Wojcik, DeMartino, 2003; Yang et al., 2006). Такие противоположные роли протеасом в регуляции апоптоза, по-видимому, обусловлены пролиферативным статусом клетки (Sohn et al., 2006).

Для осуществления разнообразных функций в клетке протеасомы должны быть подвержены строгому регуляторному контролю. Фосфорилирование регуляторных белков (например, киназ) является ключевым моментом в передаче сигнала, продвижении клетки по клеточному циклу и в апоптозе (Ptacek, Snyder, 2006). Фосфорилирование субстратов и ферментов также играет важную роль в убиквитин-протеасомном пути (Glickman, Ciechanover, 2002). Известно также, что 26S протеасомы посттрансляционно модифицируются в различных случаях как фосфорилированием (Bose et al., 1999, 2004), так и N-ацетилированием (Claverol et al., 2002), гликозилированием (Zachara, Hart, 2004) и 4-гидрокси-2-ноненил-алкилированием (Farout et al., 2006). Из всех известных модификаций субъединиц протеасом чаще всего исследуется фосфорилирование (Tanaka et al., 1990; Bose et al., 1999; Iwafune et al., 2002; Tokumoto et al., 1999; Umeda et al., 1997). Обнаружены сайты потенциального фосфорилирования на субъединицах 20S протеасомы и 19S регуляторных комплексов, и, исходя из этого, выдвинуто предположение о возможном контроле протеолитической активности протеасом посредством фосфорилирования (Bose et al., 1999; Fernandez Murga et al., 2002). Так, например, дефосфорилирование  $\alpha 3$  и  $\alpha 7$  субъединиц протеасом приводило к снижению двух пептидазных активностей протеасом (Mason et al., 1996). Кроме того, фосфорилирование субъединиц протеасом ответственно за ассоциацию 20S протеасомы и 19S регуляторных комплексов (Rivett et al., 2001). Известно, что в зависимости от стадии клеточного цикла, изменялся статус фосфорилирования протеасом (Iwafune et al., 2002), и что некоторые клеточные сигналы также вызывают изменения в фосфорилированности субъединиц протеасом (Bose et al., 2001; Bardag-Gorce et al., 2004). Однако воздействие индукторов апоптоза на изменение статуса фосфорилирование протеасом не исследовалось.

Основываясь на том, что при индукции апоптоза в дифференцированных клетках изменялся субъединичный состав и протеолитическая активность протеасом, было сделано предположение, что такие изменения в протеасомах могут приводить к усилению деградации по протеасом-убиквитиновому пути определенных клеточных белков, приводящих к апоптозу (Naujokat, Hoffmann, 2002). Однако до сих пор нет данных об изменении субъединичного состава и регуляции активностей протеасом в быстропролиферирующих клетках при индукции апоптотической гибели. Кроме того, при индукции апоптоза в клетках не было исследовано изменение эндорибонуклеазной активности протеасом. Не исследовано влияние изменения статуса фосфорилирования протеасом на их протеолитическую и эндорибонуклеазную активности при индукции апоптоза как в дифференцированных, так и в быстро пролиферирующих клетках. Одним из актуальных и наименее исследованных, кроме всего прочего, является вопрос о гетерогенности популяции протеасом в клетке (в том числе, в отдельных клеточных компартментах), о назначении множественных форм протеасом. Так, например, нет данных об исследованиях субъединичного состава, статуса фосфорилирования и ферментативных активностей ядерных протеасом при индукции апоптоза в клетках.

В свете вышесказанного, представляется весьма актуальным исследование специфических изменений субъединичного состава и статуса фосфорилирования протеасом, очищенных из цитоплазмы и ядер клеток проэритролейкемии человека линии K562 при индукции программированной клеточной гибели при помощи диэтилмалеата (ДЭМ) или доксорубина (ДР). Кроме того, важно проанализировать воздействие данных индукторов апоптоза на протеолитическую и эндорибонуклеазную активности протеасом, а также влияние дефосфорилирования протеасомных субъединиц на ферментативных активностей протеасом при индукции апоптоза в клетках K562.

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящей работы явилось исследование субъединичного состава и ферментативных активностей протеасом при индукции апоптоза в клетках проэритролейкемии человека линии K562. Исходя из этого, были поставлены следующие задачи:

1. На модели индукции апоптоза в быстро пролиферирующих клетках K562 с помощью противоопухолевого препарата доксорубина и глутатион-истощающего агента диэтилмалеата провести сравнительный анализ субъединичного состава и протеолитической активности ядерных и цитоплазматических протеасом.
2. Исследовать влияние индукторов апоптоза на эндорибонуклеазную активность протеасом из ядер и цитоплазмы клеток K562.
3. Оценить изменения в статусе фосфорилирования по треонину, серину и тирозину субъединиц ядерных и цитоплазматических протеасом при индукции апоптоза в клетках K562.

4. Исследовать влияние дефосфорилирования белковых субъединиц изучаемых частиц на протеолитическую и РНКазную активности протеасом, выделенных из ядер и цитоплазмы клеток K562 в контроле и при индукции апоптоза.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. При индукции апоптоза с помощью ДЭМ или ДР в клетках K562 наблюдаются специфические изменения субъединичного состава протеасом и статуса фосфорилирования, то есть перепрограммирование популяции цитоплазматических протеасом.
2. При индукции апоптотической гибели в клетках K562 происходит также перепрограммирование популяции ядерных протеасом.
3. Воздействие на клетки K562 индукторов апоптоза (ДЭМ и ДР) приводит к изменению специфичности ферментативных (протеолитической и эндорибонуклеазной) активностей протеасом.
4. Изменение статуса фосфорилирования протеасом при индукции апоптоза в клетках K562 регулирует как протеолитическую, так и эндорибонуклеазную активности исследуемых частиц.

**Научная новизна полученных результатов.** В настоящей работе впервые показано, что индукция апоптоза в быстро пролиферирующих клетках (на примере клеток проэритролейкемии человека линии K562) вызывает изменения субъединичного состава цитоплазматических и ядерных протеасом и их протеолитической активности. Причем при действии на клетки K562 индукторов апоптоза наблюдается изменение специфичности протеолитической активности протеасом: выявлено селективное изменение трипсин- и химотрипсин-подобных типов протеолитической активности как цитоплазматических, так и ядерных протеасом.

Впервые при индукции апоптотической программы выявлены изменения статуса фосфорилирования по треонину, серину и тирозину ядерных и цитоплазматических протеасом, а также их эндорибонуклеазной активности. Наблюдается дифференциальная регуляция РНКазной активности протеасом при действии индукторов апоптоза на клетки K562. Полученные результаты свидетельствуют также о существовании пока не исследованной системы регуляции статуса фосфорилирования протеасом (причем различной в ядре и цитоплазме) в составе программы ответа клетки на действие индукторов апоптоза.

Выявлено, что при индукции апоптотической программы в клетках K562 наблюдаются модификации субъединиц 20S протеасомы, в том числе каталитических, ассоциированных с протеолитической активностью трипсин-подобного типа ( $\beta 2$ ) и РНКазной активностью ( $\alpha 5/zeta$  и  $\alpha 6/iota$ ).

Впервые исследован механизм регуляции протеолитической и эндорибонуклеазной активностей протеасом при индукции апоптоза, а именно обнаружена зависимость исследуемых активностей от дефосфорилирования белковых субъединиц протеасом.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Полученные результаты свидетельствуют об изменениях субъединичного состава, ферментативных активностей и статуса фосфорилирования, то есть о перепрограммировании популяции цитоплазматических и ядерных протеасом при индукции апоптоза в клетках K562. Результаты работы имеют большое значение для дальнейшего углубленного изучения молекулярных механизмов, задействованных в апоптозе; могут служить теоретической основой для разработки терапевтических подходов в лечении лейкемии, так как индукцию апоптоза используют для терапии рака. Протеасомы человека могут быть использованы в качестве новых фармакологических мишеней (Wojcik, 2002). Так, ингибиторы протеасом уже сейчас активно исследуются в качестве агентов противоопухолевой терапии (Vink et al., 2006). Однако результаты экспериментов с использованием ингибиторов протеасом должны соответствовать данным по сравнительному анализу структуры и функций протеасом в норме и при патологии.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 6 статей.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены Всероссийских симпозиумах «Клеточная биология на пороге XXI века» (Санкт-Петербург, 2000), «1-й съезд Общества клеточной биологии» (Санкт-Петербург, 2003), «Биология клетки в культуре» (Санкт-Петербург, 2006); на XV Всероссийском совещании «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 2005), а также на Международных конгрессах по молекулярной биологии и генетике (Киев, 2003), по внутриклеточному сигналингу (Дубровник, 2004), по биологии клетки в культуре "Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия" (Санкт-Петербург, 2004) и 30-м конгрессе Европейского биохимического общества "The Protein World. Proteins and Peptides: Structure, Function and Organization" (Будапешт, 2005).

**Финансовая поддержка работы.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 02-04-49621, 05-04-49606), гранта Президента РФ по поддержке ведущих научных школ (НШ-523.2006.4), Санкт-Петербургского Научного Центра 2006 года и с использованием оборудования ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения экспериментальных данных, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, иллюстративный материал содержит 17 рисунков.

#### **Материалы и методы исследований**

Клетки проэритролейкемии человека линии K562 (Lozzio, Lozzio, 1975), полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН), культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Для индукции апоптоза в культуральную жидкость добавляли диэтилмалеат

(ДЭМ) до конечной концентрации 1 мМ (Castelli et al., 1998) или доксорубицин (ДР) в концентрации 4 мкМ (Anand et al., 1995) и инкубировали клетки в течение 24 ч. Индукцию апоптоза оценивали по изменению морфологии ядер и по межнуклеосомной фрагментации ДНК.

Выделение РНК. Ядерную и цитоплазматическую РНК выделяли методом фенольно-термического фракционирования (Георгиев, Мантьева, 1962).

Ядра и цитозоль выделяли согласно методу, описанному Константиновой и соавторами (1995). Электрофоретический анализ белков и РНК, выделение и очистку плазмид осуществляли согласно известным рекомендациям (Laemmli, 1970; Maniatis et al., 1982).

Выделение протеасом. 26S протеасомы выделяли из постмитохондриального супернатанта цитозоля клеток или из ядерного экстракта с помощью центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы (15-30%) и ионообменной хроматографии на DE целлюлозе (Hough et al., 1987).

Пептидазную активность протеасом трипсин-подобного типа определяли по гидролизу флуорогенного пептида – Bz-DL-Arg-AMC (Bachem, Швейцария), а химотрипсин-подобного типа - по гидролизу Bz-Ala-Ala-Phe-AMC (Bachem, Швейцария). Для этого 0.05 мкмоль субстрата инкубировали с 5 мкг протеасом в течение 45 мин при температуре 37 °С в буферном растворе, содержащем 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ KCl, 1 мМ DTT, 5 мМ АТФ. Реакцию останавливали, добавляя равный объем смеси 70 мМ уксусной кислоты, 100 мМ хлорацетата натрия и 30 мМ ацетата натрия (Barret, 1980). Концентрацию продукта гидролиза (7-амино-4-метилкумарина) определяли на флуориметре (Турочеров и др., 1998), измеряя экстинкцию и эмиссию при длинах волн 365 и 440 нм соответственно (Barret, 1980).

Обработка РНК с помощью протеасом. РНК инкубировали с 26S протеасомами в буферном растворе, содержащем 20 мМ Hepes, рН 7.6, 50 мМ KCl, 0.1 мМ ЭДТА, 10 % глицерина, 0.5 мМ PMSF, 2 мМ DTT, 1 мМ АТФ в течение 30 мин при температуре 37 °С. Каждая проба содержала 15 мкг РНК и 5-15 мкг протеасом (в случае экспериментов с немечеными субстратами). Если же препарат РНК предварительно подвергался радиоактивному мечению, то количество субстрата, необходимое для постановки одной реакции, определялось по включению радиоактивной метки, при этом соотношение субстрат-фермент оставалось прежним.

Транскрипция *in vitro*. мРНК *p53* была синтезирована с помощью транскрипции в бесклеточной системе вектора Bluescript KS(-), в который по сайту EcoRI вставлена последовательность кДНК гена дикого типа *p53* человека. Плазмиду расщепляли рестриктазой BamHI для перевода в линейную форму, после чего транскрибировали (с использованием [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ЦТФ) Т3 РНК полимеразой (для получения смыслового транскрипта), либо переваривали эндонуклеазой рестрикции HindIII, а затем осуществляли транскрипцию Т7 РНК-полимеразой (для получения антисмысловой последовательности). Плазида была любезно предоставлена д-ром

П.М.Чумаковым. Фрагмент 3'-нетранслируемой области мРНК *c-myc* был получен в результате транскрипции *in vitro* в системе вектора pGEM, в который была вставлена 3'-нетранслируемая последовательность мРНК *c-myc* человека. Для получения смысловой последовательности плазмиду линеаризовали с помощью рестриктазы BamHI и транскрибировали РНК полимеразой фага SP6, согласно инструкциям фирмы-изготовителя (Fermentas Life Sciences, Литва). Транскрипцию вели в присутствии [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ЦТФ в течение 2 ч при 37 °С. Транскрибированную РНК обрабатывали ДНКазой I и очищали депротенинизацией с помощью смеси фенол-хлороформ.

Обработка протеасом щелочной фосфатазой кишечника телят (CIAP). Протеасомы инкубировали при 37 °С в течение 90 мин в буферном растворе, содержащем 10 mM трис-HCl, pH 7.5 и 10 mM MgCl<sub>2</sub>, с щелочной фосфатазой в количестве 2 единицы фермента на 1 мкг протеасом.

Двумерный электрофорез белков. Двумерный электрофорез (2-ДЭ) белков проводили согласно инструкциям фирмы изготовителя (Bio-Rad, США). Электрофорез во втором направлении проводили в 12%-ном ПААГ в стандартной системе Лэммли (Laemmli, 1970). Белки визуализировали при помощи окрашивания серебром.

Анализ содержания субъединиц протеасом и их статуса фосфорилирования проводили методом вестерн-блотинга. Концентрацию белка в очищенных препаратах 26S протеасом определяли спектрофотометрически методом Брэдфорд (Bradford, 1976) и уравнивали пробы по количеству белка между собой. Вестерн-блотинг проводили по стандартным методикам. Белки выявляли методом усиленной хемилюминесценции (ECL), согласно инструкции фирмы-изготовителя (ICN, США), или SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, США). В качестве специфических антител использовали антитела к субъединицам протеасом  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 и  $\beta$ 7 (все BioMol, Англия). Были использованы также антитела к фосфорилированным аминокислотам: Tug (BD, США), Thr (Cell Signaling, США) и Ser (Sigma, США). В качестве вторичных антител были использованы кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши или козы антитела против иммуноглобулинов кролика (Sigma, США).

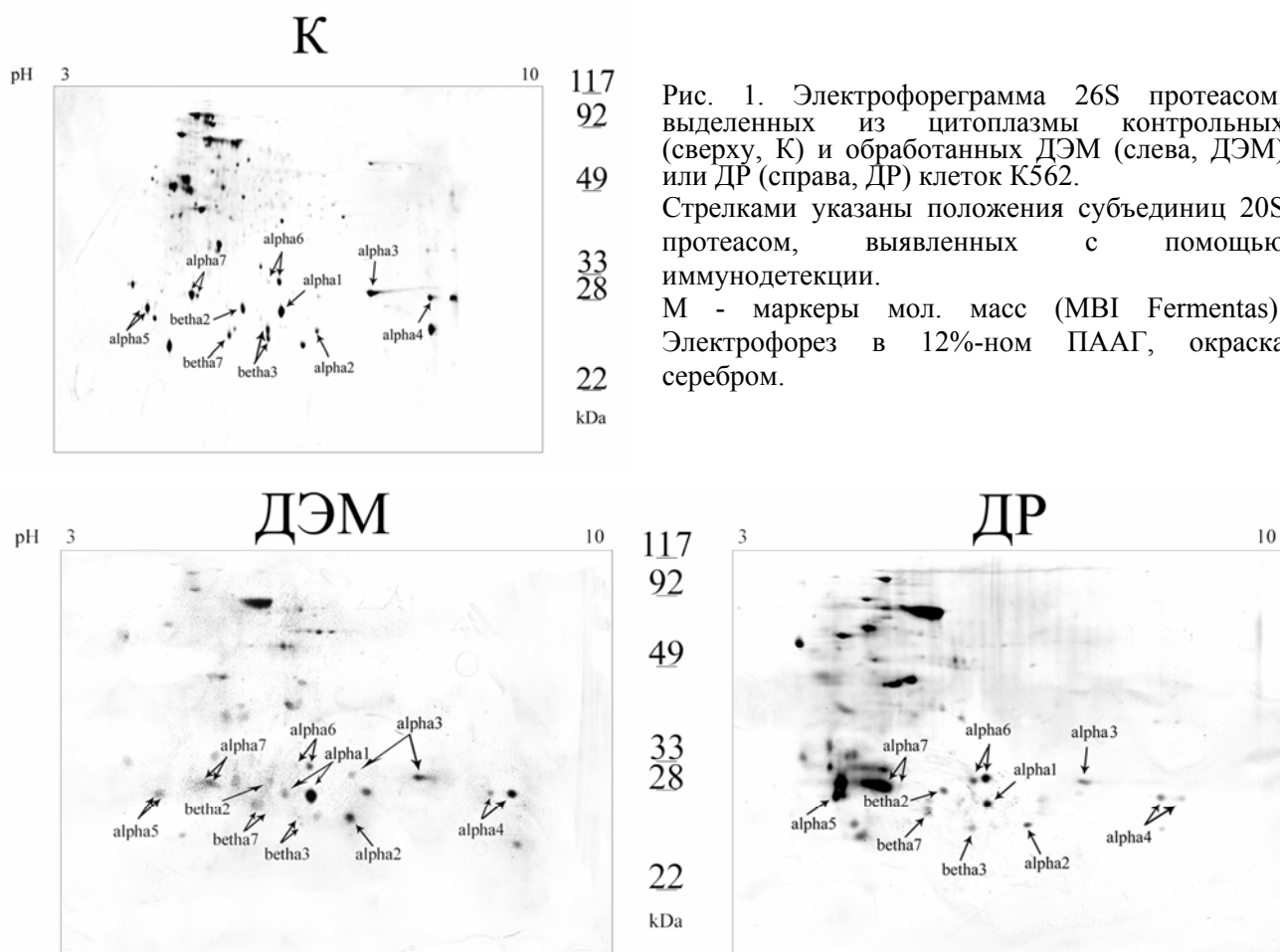
### Результаты и обсуждение

В работе использовали индукцию апоптоза в клетках проэритролейкемии человека линии K562 (Токтарова и др., 2004; Цимоха и др., 2006). Эта клеточная линия представляет собой прекрасную мишень для таких индукторов апоптоза, как глутатион-истощающий агент диэтилмалеат (Varghese et al., 2003) и широко применяемый в раковой терапии противоопухолевый препарат доксорубицин (Anand et al., 1995).

Для анализа изменений субъединичного состава протеасом под действием индукторов апоптоза препараты очищенных 26S протеасом, выделенных из цитоплазмы клеток K562, фракционировали при помощи метода двумерного электрофореза белков (Цимоха и др., 2005, 2006; Tsimokha et al., 2005). Как видно на рис. 1, после действия индукторов апоптоза на клетки K562 цитоплазматические 26S комплексы особым



образом изменяются. Содержание некоторых изоформ отдельных субъединиц повышается при индукции апоптоза, в то время как других, напротив, снижается. Наблюдая изменения субъединичного состава протеасом, можно предположить, что в процесс выполнения программы клеточной гибели вовлечена специфическая субпопуляция протеасом. Однако на основании представленных результатов нельзя судить о том, каким образом происходят наблюдаемые изменения в субъединичном составе протеасом - благодаря ли модификациям протеасомных субъединиц или же изменениям их экспрессии после воздействия индуктора апоптоза.



Наблюдая при индукции апоптоза в клетках K562 изменения субъединичного состава, мы решили исследовать, насколько эти изменения обусловлены модифицированием (и каким образом) протеасомных субъединиц после воздействия на клетки индукторов апоптоза. Для решения этой задачи применили метод иммуноблотинга с использованием антител к субъединицам 20S протеасомы (Tsimokha et al., 2005). Как видно на рис. 2, протеасомы, выделенные из клеток человека линии K562, проявляют ту или иную степень гетерогенности, характеризуемую присутствием различных изоформ некоторых субъединиц 20S протеасомы. Причем во многих случаях эти изоформы отличались значениями pI, но не молекулярными массами, что свидетельствует о наличии различных посттрансляционных модификаций субъединиц протеасом, но не является результатом частичного гидролиза этих белков или альтернативного сплайсинга (Claverol et al., 2002). Так, большая часть  $\alpha$ - субъединиц и

три  $\beta$ -субъединицы ( $\beta 2$ ,  $\beta 3$  и  $\beta 7$ ) цитоплазматических протеасом из контрольных клеток в той или иной степени модифицированы (рис. 2). Кроме того, при индукции апоптоза в клетках K562 изменяются вид и степень модификаций для одной и той же субъединицы. Такие данные вполне могут свидетельствовать в пользу существования специфической (или специфических) субпопуляции протеасом, вовлеченной в реализацию программы клеточной гибели.

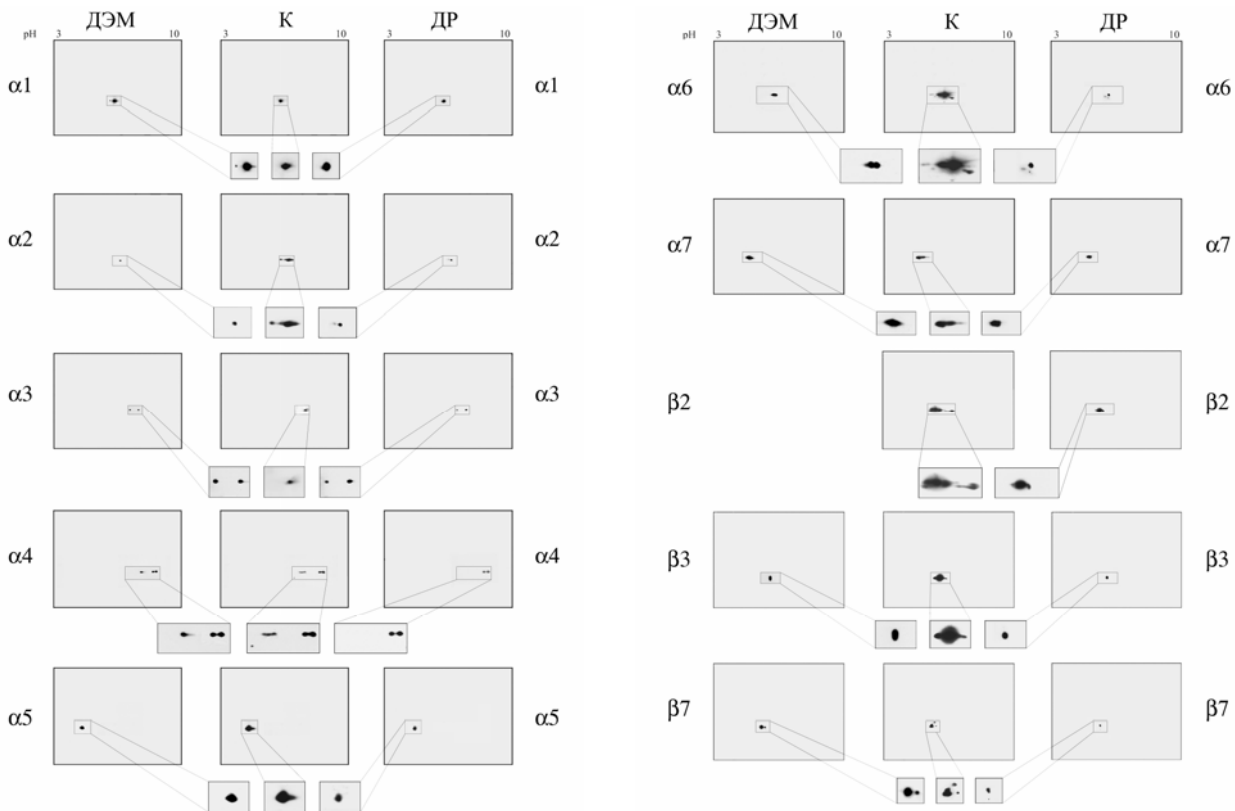


Рис. 2. При индукции апоптоза в клетках K562 наблюдается модифицирование субъединиц цитоплазматических протеасом.

Электрофореграмма 26S протеасом, выделенных из цитоплазмы контрольных (посередине, К) и обработанных ДЭМ (слева, ДЭМ) или ДР (справа, ДР) клеток K562.

Электрофорез в 12%-ном ПААГ. Иммуноблоттинг проводился с использованием антител к субъединицам 20S протеасомы (все субъединицы  $\alpha$ -типа и три субъединицы  $\beta$ -типа).

Сравнивая модификации белковых субъединиц протеасом из контрольных и индуцированных клеток K562 (рис. 2) выявляются некоторые общие тенденции в действии индукторов апоптоза. Так, при индукции апоптоза снижается содержания (наблюдается уменьшение разнообразия) изоформ таких субъединиц, как  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$  и  $\beta 3$ ; количество изоформ субъединицы  $\alpha 3$ , напротив, возрастает после воздействия на клетки K562 апоптотических индукторов. Кроме того, наблюдается перераспределение изоформ  $\alpha 7$  субъединицы протеасом после добавления и ДЭМ, и ДР к клеткам K562. Схожий характер изменения цитоплазматических протеасом при индукции апоптоза может свидетельствовать об участии исследуемых частиц в протеолизе одинаковых для апоптоза анти-апоптотических белков-регуляторов с одновременным опосредованным протеасомами накоплением про-апоптотических белковых молекул. Кроме того, для некоторых протеасомных субъединиц, а именно  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  и  $\beta 7$ , вид и степень модификаций различаются в случае разных индукторов (ДЭМ и ДР), что, по всей

видимости, объясняется различными стадиями апоптоза и (или) различными апоптотическими путями. Однако природу, характер и механизмы возникновения модификаций протеасомных субъединиц при индукции программируемой клеточной гибели еще предстоит исследовать.

Ранее проводились исследования субъединичного состава протеасом в клетках человека различной тканевой принадлежности (клетки плаценты, почек, печени; эритроциты) и ряда клеточных линий человека (Kristensen et al., 1994; Hendil et al., 1995), печени крыс (Rivett, Sweeney, 1991), в которых описано наличие изоформ у большинства  $\alpha$ -субъединиц 20S протеасомы. Кроме того, изменения в составе протеасом были выявлены *in vivo* в процессе развития *Drosophila* (Haass, Kloetzel, 1989) и при дифференцировке В-клеток человека (Frisan et al., 1998). Однако в настоящей работе впервые проведено исследование изменения субъединичного состава протеасом при индукции апоптоза в клетках человека опухолевого происхождения.

Поскольку ферментативная активность протеасом регулируется как конформационными изменениями комплексов, так и заменой и модификациями самих субъединиц, ответственных за эту активность, наблюдаемые различия в субъединичном составе протеасом при действии на клетки индуктора апоптоза, позволяют предположить, что в ответ на индукцию апоптоза в клетке происходит изменение и ферментативных активностей 26S комплексов.

Ранее при исследовании протеасом при апоптозе в дифференцированных клетках было показано, что в индуцированных дексаметазоном апоптотических тимоцитах крысы трипсин-, химотрипсин-подобные и пептидилглутамилгидролазная активности цитоплазматических протеасом снижаются (Beyette et al., 1998). Протеолитическая активность цитоплазматических протеасом при индукции апоптоза в быстро пролиферирующих, так же как и активность ядерных протеасом при апоптозе в каких-либо (дифференцированных и быстро пролиферирующих) клетках (Rockel et al., 2005), до сих пор не исследована. Поэтому для анализа влияния индукторов апоптоза на протеолитическую активность протеасом мы исследовали трипсин- и химотрипсин-подобные типы пептидазной активности протеасом, выделенных из клеток человека K562 (Цимоха и др., 2005, 2006). Как видно на рис. 3, обработка клеток K562 ДЭМ приводит к ингибированию протеолитической активности цитоплазматических протеасом: понижению на 62 % и 32 % трипсин- и химотрипсин-подобных типов соответственно (рис. 3, А и Б), но усилению активности ядерных протеасом: соответственно в пять раз и на 38 % (рис. 3, В и Г). После обработки клеток K562 ДР усиливалась протеолитическая активность цитоплазматических протеасом трипсин- и химотрипсин-подобных типов на 80 % и 14 % соответственно (рис. 3, А и Б). Тогда как после воздействия ДР на эти клетки активность ядерных протеасом трипсин-подобного типа практически не изменялась и несколько (на 15 %) усиливался химотрипсин-подобный тип протеазы ядерных протеасом (рис. 3, В и Г).

Таким образом, при индукции программированной гибели клеток K562 изменяется специфичность (т. е. соотношение различных типов активности) протеолитической активности как цитоплазматических, так и ядерных протеасом, что свидетельствует о перепрограммировании протеасом на протеолиз других типов

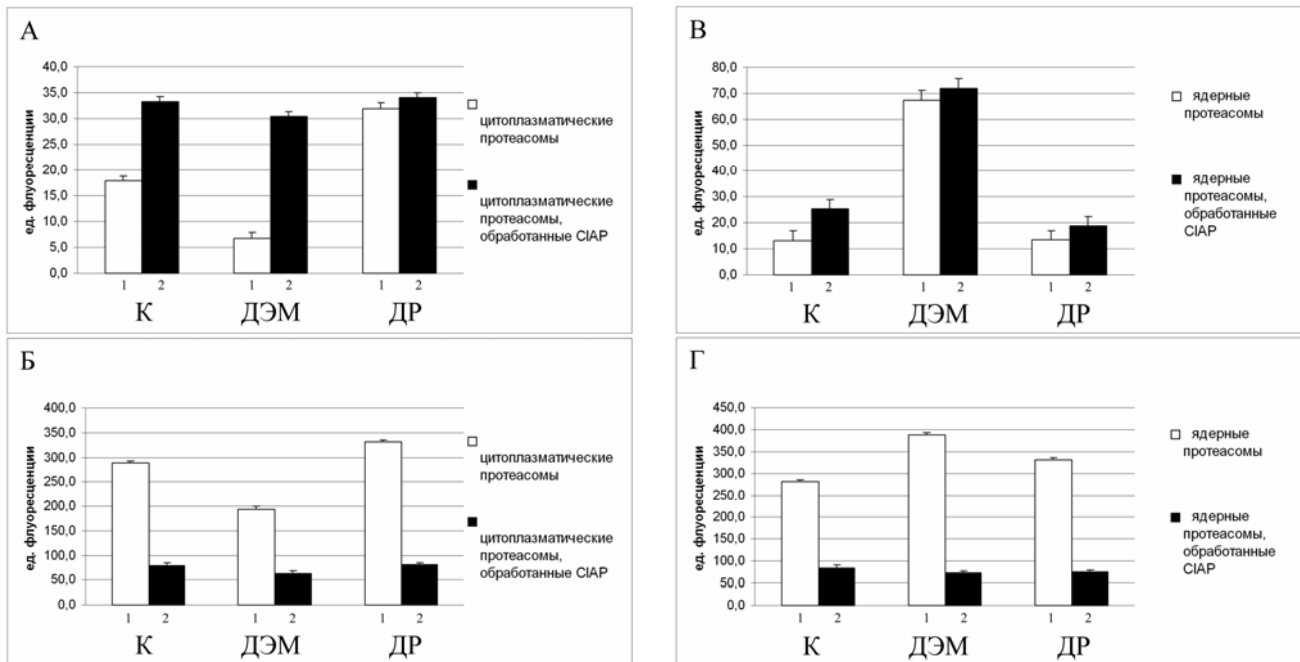


Рис. 3. Влияние индукторов апоптоза на протеолитическую активность 26S протеасом из цитоплазмы (А и Б) и ядер (В и Г) клеток линии K562.

Приведены средние значения и стандартные отклонения трех независимых определений флуоресценции освобожденного (7-амино)-4-метилкумарина; 100 ед. флуоресценции соответствует освобождению 50 пмоль продукта ((7-амино)-4-метилкумарина). Концентрация протеасом во всех пробах составляет 5 мкг.

А, В – трипсин-подобный тип пептидазной активности протеасом; Б, Г – химотрипсин-подобный тип пептидазной активности протеасом; 1 - активность интактных протеасом; 2 – активность дефосфорилированных щелочной фосфатазой (CIAP) протеасом.

белков. Кроме того, различия в протеолитической активности протеасом из ядер и цитоплазмы клеток K562 вероятно определяются специфическими функциями исследуемых частиц в разных клеточных компартментах.

Наблюдаемые отличия в протеолитической активности протеасом при действии на клетки K562 разными индукторами апоптоза (ДЭМ и ДР) можно объяснить различными апоптотическими путями, требующими протеолиз различных наборов белков, и (или) различными стадиями апоптотического процесса. Однако поскольку популяция протеасом в клетке гетерогенна, увеличение активности общего количества очищенных протеасом совсем не исключает возможность снижения активности какой-либо отдельной субпопуляции протеасом после воздействия индуктора апоптоза. Так, например, наблюдаемое снижение активности химотрипсиновой пептидазы всей популяции цитоплазматических протеасом при индукции апоптоза ДЭМ, по сравнению с ядерными протеасомами, может свидетельствовать о передислокации из цитоплазмы в ядро специфической, задействованной в выполнении апоптотической программы, протеасомной субпопуляции. Показано также, что при воздействии ДР на клетки в ядро привлекаются протеасомы из цитоплазмы (Kiyomiya et al., 2001, 2002). Таким образом, помимо перечисленных выше возможных причин изменения субъединичного состава и

активностей протеасом при апоптозе, также и передислокация протеасом между ядром и цитоплазмой (перераспределение субпопуляций протеасом внутри клетки) может служить одним из механизмов контроля активности протеасом в клетке. Кроме того, известно, что протеасомы обладают, по крайней мере, пятью типами протеолитической активности. К ним относятся трипсин-, химотрипсин-подобные, постглутамилгидролазная активности и выявленная позже способность протеасом к разрезанию белковой цепи в участках после аминокислот с разветвлённой цепью в природных и синтетических пептидах и белках, а также между небольшим нейтральными аминокислотами (Orlowski et al., 1993). Поэтому возможно, что в клетке при индукции апоптоза одновременно может происходить активация одних (в данном случае двух исследуемых) пептидаз протеасом и ингибирование других.

На исследуемых клетках уже была выявлена способность протеасом к нуклеолизу молекул РНК (Миттенберг и др., 2002а, 2002б; Токтарова и др., 2004). Деградация подвергаются отдельные фракции высокомолекулярных цитоплазматических РНК (28S, 18S рибосомные РНК и ряд мРНК). Электрофоретический анализ продуктов реакции показывает появление фрагментов строго определенного размера, что свидетельствует о том, что реакция представляет собой эндонуклеолиз.

Для выяснения вопроса о том, происходят ли изменения рибонуклеазной активности 26S протеасом при индукции программированной гибели, высокомолекулярные цитоплазматические РНК инкубировали с исследуемыми частицами, выделенными из контрольных клеток K562 и из клеток, обработанных ДЭМ или ДР (Цимоха и др., 2005, 2006). Электрофоретический анализ свидетельствует, что при индукции апоптоза рибонуклеазная активность 26S цитоплазматических протеасом по отношению к клеточным высокомолекулярным рибосомным РНК ингибируется (рис. 4, дорожки 2, 4 и 6).

Известно, что одним из основных этапов регуляции экспрессии генов в клетках эукариот является регуляция стабильности молекул информационных РНК (Tourriere et al., 2002). В клетке молекулы РНК могут подвергаться эндонуклеолизу на разных этапах, а при индукции апоптоза, вероятно, может возникнуть необходимость в деградации РНК либо в ядре на стадии пре-мРНК, либо в цитоплазме, на этапах, предшествующих трансляции. Полученные в данной работе

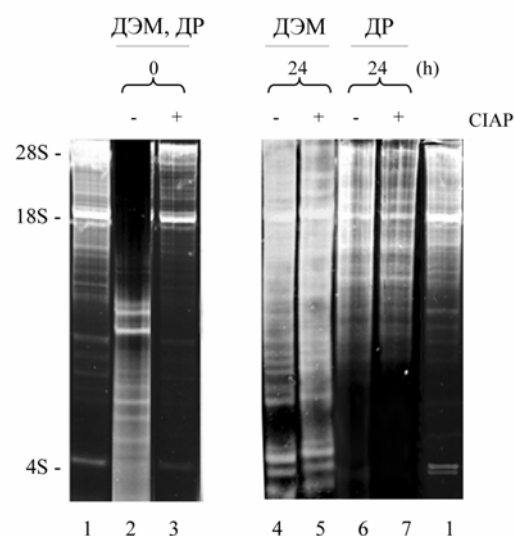


Рис. 5. Деградация высокомолекулярных рибосомных РНК из клеток K562 26S протеасомами, выделенными из цитоплазмы контрольных клеток (дорожки 2 и 3) и клеток после воздействия ДЭМ (дорожки 4 и 5) и ДР (дорожки 6 и 7).

1 – необработанная РНК, плюсы обозначают предварительное дефосфорилирование протеасом с помощью щелочной фосфатазы (CIAP), минусы – соответственно его отсутствие. Электрофорез в 2.75 %-ном ПААГ, окраска бромистым этидием.

результаты позволяют сделать предположение об участии РНКазы протеасом в процессе регуляции стабильности молекул информационных РНК при индукции программируемой клеточной гибели. Так, например, 26S частицы могут с помощью убиквитин-зависимого протеолиза контролировать уровень белков-регуляторов апоптоза, а с помощью специфического эндонуклеолиза регулировать содержание в клетке кодирующих их мРНК. И, таким образом, с помощью протеасом клетка может наиболее быстро и эффективно инактивировать анти-апоптотические и (или), наоборот, активировать про-апоптотические гены во время реализации программы своей гибели.

Наблюдая подавление РНКазной активности протеасом при индукции апоптотической гибели по отношению к суммарной рибосомной РНК, нельзя утверждать, что подобный характер изменения нуклеазной активности протеасом будет проявляться и по отношению к специфическим индивидуальным мРНК. Вполне вероятно, что в случае отдельных мРНК в клетке при индукции апоптоза может происходить как ингибирование, так и активация РНКазы протеасом.

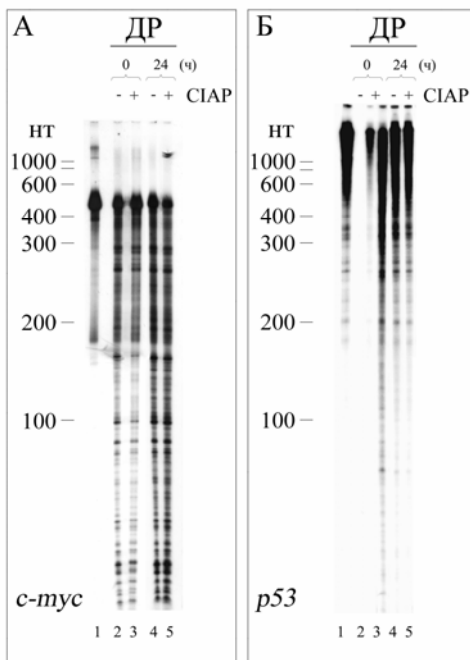


Рис. 5. Дegrаdация 26S протеасомами, выделенными из цитоплазмы контрольных (дорожки 2 и 3) и обработанных ДР (дорожки 4 и 5) клеток K562, транскрибированных *in vitro* мРНК генов *c-myc* (А) и *p53* (Б), меченных [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ЦТФ: 1- необработанная РНК, Электрофорез в 5 %-ном ПААГ на буфере ТБЕ с 7 М мочевиной

протеасомному пути (Lopes et al., 1997).

Электрофоретический анализ показал, что при индукции с помощью ДР программированной клеточной гибели в клетках K562 рибонуклеазная активность цитоплазматических протеасом не изменяется по отношению к мРНК *c-myc* (рис. 5, А, дорожки 2 и 4), но ингибируется по отношению к мРНК *p53* (рис. 5, Б, дорожки 2 и 4). Таким образом, при индукции апоптоза ДР изменяется специфичность

Для анализа специфичности эндорибонуклеазной активности протеасом при индукции апоптоза, т. е. способности к расщеплению различных последовательностей РНК, исследовали нуклеолиз транскрибированных *in vitro* индивидуальных информационных РНК *c-myc* и *p53* протеасомами, выделенными из контрольных и обработанных ДР клеток K562 (Миттенберг и др., 2007). При использовании ингибиторов протеасом было показано, что продукт протоонкогена *c-myc*, транскрипционный фактор *c-Myc*, разрушается по убиквитин-протеасомному пути (Salghetti et al., 1999). Выбор нами этого субстрата был обусловлен также и тем, что он содержит АU-богатые последовательности, а из литературы известно, что повторы АUУUА являются сигналом для деградации РНК протеасомами (Jagousse et al., 1999). Дegrаdация онкосупрессорного белка *p53* в клетках также происходит по убиквитин-зависимому

эндорибонуклеазной активности цитоплазматических 26S протеасом по отношению к мРНК *c-тус* и *p53*. Наблюдаемые изменения специфичности РНКазы протеасом связаны, по-видимому, с дифференциальной регуляцией активности разных ферментативных центров исследуемых частиц.

Кроме того, выше было сделано предположение о том, что общий характер изменения РНКазы протеасом при апоптозе по отношению к суммарной рибосомной РНК может не отражать изменения этой активности по отношению к каждой конкретной мРНК. И действительно, показано, что, несмотря на ингибирование эндорибонуклеазы протеасом по отношению к суммарной рибосомной РНК, в клетках K562 при индукции апоптоза ДР происходит увеличение нуклеазной активности 26S комплексов по отношению к индивидуальной мРНК *p53*.

Очевидно, что в свете изменения ферментативных активностей протеасом при индукции апоптоза в клетках наибольший интерес для нас представляли каталитические протеасомные субъединицы (Цимоха и др., 2005, 2006; Tsimokha et al., 2005).

Гликозилирование или алкилирование 4-гидрокси-2-ноненом приводит к увеличению массы белка и, соответственно, к сдвигу его положения вверх на двумерном электрофорезе. Присоединение же фосфатных групп вызывает увеличение как молекулярного веса белка, так и его отрицательного заряда, сохраняя подвижность белка во втором направлении двумерного электрофореза практически неизменной. И таким образом, фосфорилированные протеасомные субъединицы находятся по своей подвижности в системе Лэммли примерно на одном уровне относительно положения соответствующей исходной изоформы, несмотря на то, что их изоэлектрические точки несколько сдвинуты в кислую сторону – тем сильнее, чем больше фосфатных групп несет белок. При N-ацетилировании белка также происходит смещение его положения на двумерной электрофореграмме в область более кислых значений pH.

Известно, что за эндорибонуклеазную активность протеасом ответственны две субъединицы  $\alpha$ -типа, а именно  $\zeta$  (zeta, или  $\alpha 5$ ) и  $\xi$  (iota, или  $\alpha 6$ ) (Petit et al., 1997). Причем наиболее сильной РНКазной активностью обладает  $\alpha 5$  субъединица, субъединица  $\alpha 6$  менее активна, зато в своей аминокислотной последовательности она содержит сайт связывания РНК. Поскольку выше было показано, что при индукции апоптоза происходит изменение РНКазной активности протеасом как по отношению к суммарной рибосомной РНК, так и по отношению к индивидуальным специфическим мРНК (*c-тус* и *p53*), можно предположить, что один из механизмов регуляции РНКазы протеасом заключается в модификации субъединиц, ассоциированных с эндорибонуклеазной активностью 26S комплексов. В пользу данного предположения говорят выявленные нами методом иммуноблоттинга изменения субъединичного состава протеасом (в частности, затрагивающие субъединицы zeta/ $\alpha 5$  и iota/ $\alpha 6$ ) после воздействия ДЭМ и ДР на клетки K562 (рис. 2). Таким образом, изменение активности РНКазы протеасом при индукции апоптоза может быть обусловлено, в том числе,

специфическими модификациями субъединиц 20S протеасом, ассоциированных с этой активностью. Например, одним из способов модификации клеточных белков и, в частности, субъединиц протеасом может быть их фосфорилирование или дефосфорилирование специфическими киназами и фосфатазами. Интересно также, что  $\alpha 6$  субъединица протеасом из цитоплазмы контрольных клеток представлена большим числом изоформ (рис. 2, посередине). Такое количество вариантов данной субъединицы может быть связано с выше упомянутой функцией, определяющей специфичность выбора РНК-субстрата для его последующей деградации. После индукции апоптоза (ДЭМ или ДР) в клетках K562  $\alpha 6$  субъединица цитоплазматических протеасом теряет почти все свои модификации (рис. 2, слева и справа), что может говорить о перепрограммировании нуклеолиза протеасомами, т.е. о возможной перемене РНК-субстратов.

Мы также показали, что при индукции апоптоза в клетках K562 ДР посттрансляционным модификациям подвергается и ассоциированная с трипсин-подобной протеолитической протеасомной активностью  $\beta 2$  субъединица (рис. 2, посередине и справа).

Было показано, что воздействие некоторых клеточных сигналов вызывает изменение статуса фосфорилирования протеасомных субъединиц. Так, например,  $\gamma$ -интерферон вызывает изменение фосфорилирования протеасом в клетках человека линии L132 (Bose et al., 2001), а этиловая диета вызывает у крыс гиперфосфорилирование субъединиц протеасом из клеток печени (Bardag-Gorce et al., 2004).

В настоящей работе для исследования изменения статуса фосфорилирования субъединиц протеасом при индукции апоптоза использовали метод иммуноблотинга с применением антител против фосфотреонина, фосфосерина и фосфотирозина (Цимоха и др., 2005, 2006; Tsimokha et al., 2004, 2005). Как видно на рис. 6, Б, в случае треонина ДЭМ вызывает лишь небольшие изменения в фосфорилировании протеасомных субъединиц (дефосфорилирование субъединиц с молекулярными массами около 35, 27 и 25 кД и фосфорилирование 43, 36, и 33 кДа) (рис. 6, Б, слева, дорожки 1 и 2); ДР вызывает дефосфорилирование практически всех субъединиц, за исключением одной с молекулярной массой около 31 кД (рис. 6, Б, слева, дорожки 1 и 3). Интересно, что разные индукторы апоптоза по-разному изменяют также и статус фосфорилирования протеасом по серину, а именно ДЭМ вызывает дефосфорилирование некоторых субъединиц (в области мол. масс 66 – 90 кДа, 43 и 37 кДа) (рис. 6, Б, посередине, дорожки 1 и 2); ДР, напротив, приводит к фосфорилированию протеасомных субъединиц (в области мол. масс 27 - 35 кДа, 45 и 50 кДа) (рис. 6, Б, посередине, дорожки 1 и 3). Наблюдаемое фосфорилирование и дефосфорилирование протеасомных субъединиц при действии на клетки K562 индуктора апоптоза предполагает вовлечение в процесс определенных фосфатаз и протеинкиназ. Кроме того, некоторые фосфорилированные по треонину субъединицы протеасом (с молекулярными массами в



области 31-33 кДа) также фосфорилированы и по серину и тирозину в контрольных и в индуцированных к апоптозу клетках (рис. 6, Б). Функциональный смысл этого явления еще предстоит исследовать. Но, возможно, фосфорилирование или дефосфорилирование их не вовлечено в стадии апоптоза, индуцированного с помощью ДЭМ или ДР. Более того, используемые нами индукторы апоптоза практически не влияют на статус фосфорилирования цитоплазматических протеасом по тирозину (рис. 6, Б, справа).

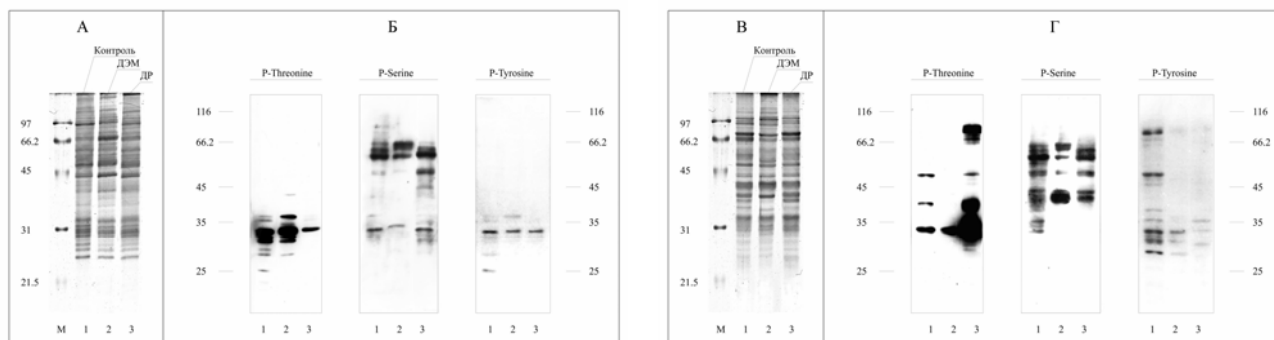


Рис. 6. При индукции апоптоза изменяется статус фосфорилирования субъединиц 26S протеасом, выделенных из цитоплазмы (А и Б) и ядер (В и Г) контрольных (дорожка 1) и обработанных ДЭМ (дорожка 2) или ДР (дорожка 3) клеток К562.

А, В - окраска геля Кумасси G-250; Б, Г - иммунохимическое выявление фосфорилированных по треонину, серину и тирозину субъединиц в составе очищенных 26S протеасом; М - маркеры мол. масс (МВ1 Fermentas).

Ранее не проводились исследования статуса фосфорилирования ядерных протеасом, а также не анализировалось влияние индукции апоптоза на их фосфорилирование. Для выяснения возможной регуляции статуса фосфорилирования ядерных протеасом при апоптозе нами был проведен анализ статуса фосфорилирования протеасом, изолированных из ядер клеток К562 до и после воздействия индукторов апоптоза (рис. 6). Как видно на рис. 6, Г, в случае треонина ДЭМ вызывает дефосфорилирование двух субъединиц ядерных 26S протеасом с молекулярными массами около 47-50 и 37-39 кДа (рис. 6, Г, слева, дорожки 1 и 2); ДР же, напротив, вызывает гиперфосфорилирование ядерных протеасом (рис. 6, Г, слева, дорожки 1 и 3). Кроме того, степень фосфорилирования субъединицы протеасом с мол. массой в области 30-33 кДа не изменяется, и, вероятно, фосфорилирование или дефосфорилирование ее не вовлечено в ДЭМ-индуцированный апоптоз клеток К562. Под действием ДЭМ наблюдается, во-первых, снижение степени фосфорилированности по тирозину субъединиц с мол. массами порядка 30-33, 26-27 и 28-29 кДа, а во-вторых – дефосфорилирование субъединиц с мол. массами около 68, 62-65, 55-60, 47-48, 46, 44, 37, 34 и 29-30 кДа (рис. 6, Г, справа, дорожки 1 и 2). Наблюдается также под действием ДР снижение степени фосфорилированности по тирозину двух субъединиц с относительными мол. весами соответственно порядка 28-30 и 26-27 кДа и полное дефосфорилирование субъединиц с мол. массами около 68, 62-65, 55-60, 47-48, 46, 44, 37, 34, 30-33 и 29-30 кДа (рис. 6, Г, слева, дорожки 1 и 3). В случае фосфорилирования по серину влияние индукторов апоптоза на статус фосфорилирования ядерных протеасом практически идентично (рис. 6, Г, посередине). Таким образом,

обнаруженные специфические отличия в статусе фосфорилирования ядерных и цитоплазматических протеасом, а также регуляция их статуса фосфорилирования при апоптозе свидетельствуют об исключительно тонком регуляторном клеточном процессе, в котором задействованы различные системы киназ и фосфатаз.

Полученные нами данные об изменении фосфорилирования протеасом при действии индукторов апоптоза на клетки позволяют предположить, что такая модификация субъединиц может определять специфичность функций протеасом в апоптотических клетках K562. Кроме того, наблюдаемая разница в фосфорилированности при действии этих двух индукторов апоптоза может свидетельствовать о различных путях выполнения и (или) о разных стадиях апоптотической программы. Можно также предположить, что фосфорилирование некоторых субъединиц по определенным аминокислотам участвует в механизмах реализации апоптоза, а фосфорилирование этих же субъединиц, но по другим аминокислотам (по которым не наблюдаются изменения в статусе фосфорилирования при апоптозе) определяет функционирование протеасом в клетке и не связано напрямую с апоптозом. Возможно также, что гиперфосфорилирование по треонину может служить сигналом ядерной локализации протеасом в клетке, так как из литературы известно, что при поступлении ДР в клетку он связывается с протеасомой и переносится из цитоплазмы в ядро. Так или иначе, очень вероятно, что статус фосфорилирования протеасом определяет их функциональную активность в клетке и что механизм выполнения программы апоптоза независимо от индуктора включает в себя фосфорилирование и дефосфорилирование протеасомных субъединиц.

С целью анализа возможного функционального значения наблюдаемых различий в фосфорилировании протеасом изучали влияние дефосфорилирования протеасомных субъединиц на ферментативные активности исследуемых частиц.

В ряде работ было обнаружено влияние степени фосфорилирования субъединиц цитоплазматических протеасом на их протеолитическую активность (Mason et al., 1996; Iwafune et al., 2002). Однако изменения при апоптозе протеолитической и рибонуклеазной активностей ядерных и цитоплазматических протеасом после воздействия на последние фосфатазой ранее не исследовали. Результаты, представленные на рис. 4, демонстрируют значительное снижение химотрипсин-подобного типа активности как цитоплазматических (рис. 3, Б), так и ядерных (рис. 3, Г) протеасом из контрольных и индуцированных к апоптозу клеток K562 после дефосфорилирования протеасомных субъединиц (Цимоха и др., 2005). Более того, наблюдалось значительное повышение трипсин-подобного типа активности при дефосфорилировании протеасом, выделенных из контрольных клеток (рис. 3, А и В) – на 87 % и 93 % для цитоплазматических и ядерных протеасом соответственно. После обработки цитоплазматических протеасом щелочной фосфатазой происходит также колоссальное усиление (в 4.5 раза) их трипсин-подобной активности из ДЭМ-индуцированных клеток K562, но практически не изменяется эта активность протеасом

из клеток, индуцированных к апоптозу с помощью ДР (рис. 3, А). Аналогичная ситуация наблюдается и с ядерными протеасомами, однако здесь дефосфорилирование не изменяет активность протеасом из ДЭМ-индуцированных клеток (рис. 3, В). Итак, при индукции апоптоза ДР трипсин-подобная протеолитическая активность цитоплазматических протеасом усиливается; она усиливается также, если дефосфорилировать протеасомы из контрольных клеток, причем обработка фосфатазой протеасом из ДР-индуцированных клеток не изменяет эту активность. Можно таким образом сделать вывод, что механизм регуляции активности цитоплазматических протеасом при индукции апоптоза ДР в клетках К562 связан с дефосфорилированием протеасомных субъединиц. Проведя параллель, можно сделать аналогичное предположение и о дефосфорилировании ядерных протеасом при индукции апоптоза ДЭМ. И действительно, если обратиться к рис. 6, А и Б, то видно, что при обработке клеток ДЭМ, ядерные протеасомы дефосфорилируются по треонину. Полученные данные позволяют сделать еще один вывод о том, что изменение статуса фосфорилирования определенных протеасомных субъединиц при действии на клетки индуктора апоптоза может являться одним из путей регуляции протеасом-зависимой деградациии белков, участвующих в выполнении программы гибели клетки. Кроме того, приведенные выше результаты свидетельствуют о селективном влиянии статуса фосфорилирования протеасом на разные типы их протеолитической активности.

Для анализа возможного влияния статуса фосфорилирования протеасом на их эндорибонуклеазную активность протеасомы обрабатывали при помощи щелочной фосфатазы из кишечника теленка (Цимоха и др., 2005, 2006). Показано влияние дефосфорилирования протеасом на их РНКазную активность по отношению к высокомолекулярной рибосомной РНК (рис. 4). Так, дефосфорилирование субъединиц цитоплазматических протеасом, выделенных из индуцированных к апоптозу клеток, не оказывало влияния на их активность (рис. 4, А, дорожки 4 и 5, 6 и 7); однако дефосфорилирование протеасом, полученных из контрольных клеток, приводило к снижению их нуклеазной активности (рис. 4, А, дорожки 2 и 3). Это позволяет предположить, что за наблюдаемое подавление РНКазной активности протеасом может быть ответственно дефосфорилирование протеасомных субъединиц при действии индуктора апоптоза на клетки К562.

В настоящей работе мы также исследовали вопрос влияния статуса фосфорилирования протеасом на их РНКазную активность по отношению к индивидуальным мРНК (*c-тус* и *p53*) (Миттенберг и др., 2007). Оказалось, что предварительная обработка протеасом щелочной фосфатазой не оказывает влияния на РНКазную активность цитоплазматических протеасом из контрольных клеток К562 по отношению к мРНК *c-тус* (рис. 5, А, дорожки 2 и 3), но стимулирует нуклеолиз этой РНК (рис. 5, А, дорожки 4 и 5) протеасомами из ДР-индуцированных клеток. И наоборот, дефосфорилирование цитоплазматических протеасом не изменяет эффективность нуклеолиза мРНК *p53* протеасомами из ДР-индуцированных клеток

(рис. 5, Б, дорожки 3 и 4), но активирует протеасомы из контрольных клеток (рис. 5, Б, дорожки 2 и 3). Эти результаты свидетельствуют о том, что статус фосфорилирования субъединиц протеасом оказывает влияние на разные рибонуклеазные центры протеасом и что изменения фосфорилирования субъединиц может являться механизмом контроля деградации РНК протеасомами при индукции апоптоза.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что степень фосфорилирования протеасомных субъединиц оказывает влияние на ферментативные (протеолитические и эндорибонуклеазные) центры протеасом, а изменение фосфорилирования субъединиц может являться механизмом координирующего контроля протеасомной деградации белков, участвующих в процессе выполнения апоптоза и в деградации кодирующих их мРНК.

### **Выводы**

1. Индуктор запрограммированной клеточной гибели (ДЭМ или ДР) вызывает изменения в субъединичном составе как цитоплазматических, так и ядерных 26S протеасом клеток K562. После воздействия на клетки индуктора апоптотической программы наблюдается модифицирование субъединиц 20S протеасом, как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -типа, в том числе и субъединиц, ответственных за ферментативные активности протеасом ( $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  и  $\beta 2$ ).
2. Действие индуктора апоптоза на клетки K562 приводит к изменению специфичности ферментативных (протеолитической и эндорибонуклеазной) активностей протеасом из ядер и цитоплазмы клеток K562.
3. Спектр фосфорилирования субъединиц протеасом различен в ядрах и цитоплазме. Индукция апоптоза в клетках K562 приводит к специфическим изменениям статуса фосфорилирования ядерных и цитоплазматических протеасом по серину, тирозину и треонину.
4. Неспецифическое дефосфорилирование белковых субъединиц 26S протеасом из ядер и цитоплазмы клеток K562, приводит к изменению специфичности их протеолитической и эндорибонуклеазной активностей.
5. Полученные данные свидетельствуют о существовании новой, не исследованной системы регуляции субъединичного состава и статуса фосфорилирования протеасом в составе клеточной программы ответа на апоптотические стимулы.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. **А.С.Цимоха**, И.В.Волкова, Ю.Б.Ермолаева, А.Г.Миттенберг, Н.Д.Медведева, А.Л.Евдонин, И.М.Константинова. "Структурно-функциональный анализ  $\alpha$ -РНП частиц из клеток печени крыс". "1-й съезд Общества клеточной биологии". Тезисы докладов и сообщений, Санкт-Петербург, Россия, Октябрь 14-16, 2003. // Цитология. 2003. 45(9): 941.
2. **A.S.Tsimokha**, I.V.Volkova, J.B.Ermolaeva, A.G.Mittenberg, V.A.Kulitchkova, N.D.Medvedeva, A.L.Evdonin, I.N.Evtteeva, I.M.Konstantinova. "The comparative analysis of the structure and functions of the  $\alpha$ -RNP particles and proteasomes in rat liver cells" // Abstracts of the Conference "Molecular biology and genetics" Kyev, Ukraine, 25-27 September, 2003, p.134-135.
3. **A.S.Tsimokha**, V.A.Kulitchkova, I.N.Evtteeva, I.V.Volkova, A.G.Mittenberg, J.B.Ermolaeva, I.M.Konstantinova. "EGF-induced changes in the composition, phosphorylation state and the endoribonuclease activity of proteasomes from different cellular compartments of A431 cells" // Abstracts of the Conference

“FEBS lecture course on cellular signaling & 4th Dubrovnik signaling conference” Dubrovnik, Croatia, 21-27 May, 2004, p.172.

4. В.А.Куличкова, И.Н.Евтеева, А.Г.Миттенберг, М.В.Токтарова, **А.С.Цимоха**, И.В.Волкова, Ю.Б.Ермолаева, Л.Н.Гаузе, И.М.Константинова. Селективное влияние эпидермального фактора роста на эндорибонуклеазную активность различных субпопуляций протеасом в клетках линии А431. Специфичность популяции протеасом, экспортируемых из клеток. // Цитология. 2004. 46(6): 525-530.
5. А.Куличкова, А.Г.Миттенберг, Ю.Б.Ермолаева, **А.С.Цимоха**, И.В.Волкова, И.В.Кожухарова, Л.Н.Гаузе, И.М.Константинова. Специфичность популяции протеасом, экскретируемых из клеток в культуральную среду. // ДАН. 2004. 399(5): 503-506.
6. **А.С.Цимоха**, Ю.Я.Ватажок, Е.С.Вашукова, В.А.Куличкова, И.В.Волкова, Ю.Б.Ермолаева, А.Г.Миттенберг, И.Н.Евтеева, В.А.Иванов, Л.Н.Гаузе, И.М.Константинова. Субъединицы протеасом и  $\alpha$ -РНП из клеток печени крыс фосфорилированы по тирозину и треонину // Цитология. 2005. 47 (5): 436-441.
7. **A.S.Tsimokha**, V.A.Kulichkova, A.G.Mittenberg, I.N.Evteeva, I.V.Volkova, J.B.Ermolaeva, I.M.Konstantinova. “Selective effect of inductors of apoptosis on the phosphorylation state and the endoribonuclease activity of 26S proteasomes from different cellular compartments of K562 cells” // IUBMB 50th Anniversary Symposium: Protein Structure and Function, Budapest, Hungary, July 3-4, 2005, FEBS J, 272(s1): 47.
8. В.А.Куличкова, Ю.Б.Ермолаева, А.Г.Миттенберг, И.В.Волкова, **А.С.Цимоха**, И.Н.Евтеева, Л.Н.Гаузе, И.М.Константинова. Влияние ЭФР на активность ядерных и цитоплазматических протеасом в клетках А431 // Цитология. 2005. 47 (9): 774-779.
9. **А.С.Цимоха**, В.А.Куличкова, А.Г.Миттенберг, И.Н.Евтеева, Ю.Я.Ватажок, Ю.Б.Ермолаева, И.В.Волкова, Е.С.Вашукова, Л.Н.Гаузе, И.М.Константинова. Изменения в субъединичном составе, статусе фосфорилирования и эндорибонуклеазной активности ядерных и цитоплазматических 26S протеасом из клеток K562 при воздействии на клетки индуктора апоптоза диэтилмалеата. XV Всероссийское совещание "Структура и функции клеточного ядра", Санкт-Петербург, 18- 20 октября, 2005 // Цитология. 2005. 47 (9): 838.
10. **А.С.Цимоха**, В.А.Куличкова, И.Н.Евтеева, Ю.Я.Ватажок, Т.Н.Моисеева, Ю.Б.Ермолаева, Е.С.Вашукова, Л.Н.Гаузе, И.М.Константинова. Специфичность изменений в протеасомах клеток K562 при апоптозе, индуцированном диэтилмалеатом // Цитология. 2006. 48 (2): 133-141.
11. А.Г.Миттенберг, Т.Н.Моисеева, И.В.Пугачева, В.А.Куличкова, **А.С.Цимоха**, Л.Н.Гаузе, И.М.Константинова. Регуляция специфичности эндорибонуклеазной активности протеасом при действии индукторов дифференцировки и апоптоза на клетки линии K562. // Цитология. 2007. 49(2):142-148.

### Список цитируемой литературы

1. **Георгиев Г.П.**, Мантьева В.Л. 1962. Биохимия 2(7):949-957. 2. **Константинова И.М.**, Петухова О.А., Куличкова В.А., Туроверова Л.В., Волкова И.В., Ермолаева Ю.Б., Ильяева О.Р., Кожухарова И.В., Ермолаева Ю.Б. 1995. Молекулярная биология. 29 (5): 761-771. 3. **Миттенберг А.Г.**, Куличкова В.А., Медведева Н.Д., Волкова И.В., Ермолаева Ю.Б., Константинова И. М. 2002б. Цитология. 44(4):357-363.
4. **Миттенберг А.Г.**, Куличкова В.А., Медведева Н.Д., Пеннийнен В.А., Гаузе Л.Н., Константинова И.М. 2002а. Цитология. 44(2):181-187. 5. **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. Цитология. 46(3): 283-290. 6. **Туроверов К.К.**, Бикташев А.Г., Дорофенюк А.В., Кузнецова И.М. 1998. Цитология. 40(8/9): 806-814. 7. **Anand S.**, Verma H., Kumar L., Singh N. 1995. Cancer Lett. 88:101-105. 8. **Bardag-Gorce F.**, Venkatesh R., Li J., French B.A., French S.W. 2004. Life Sci. 75: 585-597. 9. **Barret A.J.** 1980. Biochem. J. 187: 909-912. 10. **Beyette J.**, Mason G., Murray R., Cohen G., Rivett J. 1998. Biochem. J. 332: 315-320. 11. **Bose S.**, Brooks P., Mason G.G., Rivett A.J. 2001. Biochem J. 353:291-297. 12. **Bose S.**, Mason G.G., Rivett A.J. 1999. Mol Biol Rep. 26:11-14. 13. **Bose S.**, Stratford F.L., Broadfoot K.I., Mason G.G., Rivett A.J. 2004. Biochem J. 378:177-184. 14. **Bradford M.M.** 1976. Anal Biochem. 72:248-254. 15. **Castelli J.C.**, Hassel B.A., Maran A., Paranjape J., Hewitt J.A., Li X.L., Hsu Y.T., Silverman R.H., Youle R.J. 1998. Cell Death Differ. 5: 313-320. 16. **Chuang C.Y.**, Chuang L.F. 1979. Biochemistry. 18: 2069-2073. 17. **Claverol S.**, Burlet-Schiltz O., Girbal-Neuhauser E., Gairin J.E., Monsarrat B. 2002. Mol Cell Proteomics. 1: 567-578. 18. **Earnshaw W.C.** 1995. Curr Opin Cell Biol. 7: 337-343. 19. **Farout L.**, Mary J., Vinh J., Szweda L.I., Friguet B. 2006. Arch Biochem Biophys. 453(1): 135-142. 20. **Fernandez Murray P.**, Biscoglio M.J., Passeron S. 2002. Arch. Biochem. Biophys. 404: 116-125. 21. **Frisan T.**, Levitsky V., Polack A., Masucci M.G. 1998. J. Immunol. 160: 3281-3289. 22. **Glickman M.H.**, Ciechanover A. 2002. Physiol Rev. 82: 373-428. 23. **Haass C.**, Kloetzel P.M. 1989. Exp. Cell Res. 180: 243-252. 24. **Hendil K.B.**, Kristensen P., Uerkvitz W. 1995. Biochem. J. 305: 245-252. 25. **Hough R.**, Pratt G.,

Rechsteiner M. 1987. *J. Biol. Chem.* 262: 8303-8313. **26. Iwafune Y.**, Kawasaki H., Hirano H. 2002. *Electrophoresis*. 23: 329–338. **27. Jarrousse A.S.**, Petit F., Kreutzer-Schmid K., Gaedigk R., Schmid H.P. 1999. *J. Biol. Chem.* 274: 22023-22028. **28. Kiyomiya K.**, Kurebe M., Nakagawa H., Matsuo S. 2002. *Int J Oncol.* 20(6): 1205-1259. **29. Kiyomiya K.**, Matsuo S., Kurebe M. 2001. *Cancer Res.* 61(6): 2467-2471. **30. Kristensen P.**, Johnsen A.H., Uerkvitz W., Tanaka K., Hendil K.B. 1994. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 1785–1789. **31. Laemmli U.K.** 1970. *Nature*. 227: 680-685. **32. Lopes U.G.**, Erhardt P., Yao R., Cooper G.M. 1997. *J. Biol. Chem.* 272: 12893-12896. **33. Maniatis T.**, Fritsch E.F., Sambrook J. 1982. New York: Cold Spring Harbor Laboratory: 150-162. **34. Mason G.G.**, Hendil K.B., Rivett A.J. 1996. *Eur. J. Biochem.* 238: 453–462. **35. Naujokat C.**, Hoffmann S. 2002. *Lab Invest.* 82:965-980. **36. Orłowski M.**, Cardozo C., Michaud C. 1993. *Biochemistry*. 32:1563-1572. **37. Petit F.**, Jarrousse A-S., Dahlmann B., Sobek A., Hendil K.B., Bury J., Briand Y., Schmid H.-P. 1997. *Biochem. J.* 326:93-98. **38. Ptacek J.**, Snyder M. 2006. *Trends Genet.* 22:545-554. **39. Rivett A. J.**, Sweeney S. T. 1991. *Biochem. J.* 278: 171–177. **40. Rivett A.J.**, Bose S., Brooks P., Broadfoot K.I. 2001. *Biochimie.* 83:363-366. **41. Rockel T.D.**, Stuhlmann D., von Mikecz A. 2005. *J Cell Sci.* 118:5231-542. **42. Salghetti S.E.**, Kim S.Y., Tansey W.P. 1999. *EMBO J.* 18: 717–726. **43. Sohn D.**, Totzke G., Essmann F., Schulze-Osthoff K., Levkau B., Janicke R.U. 2006. *Mol Cell Biol.* 26: 1967-1978. **44. Tanaka K.**, Fujiwara T., Kumatori A., Shin S., Yoshimura T., Ichihara A., Tokunaga F., Aruga R., Iwanaga S., Kakizuka A. 1990. *Biochemistry*. 29(15): 3777-3785. **45. Tokumoto M.**, Horiguchi R., Nagahama Y., Tokumoto T. 1999. *Gene.* 239(2): 301-308. **46. Tourriere H.**, Chebli K., Tazi J. 2002. *Biochimie.* 84: 821-37. **45. Umeda M.**, Manabe Y., Uchimiya H. 1997. *FEBS Lett.* 403(3):313-307. **47. Varghese J.**, Khandre N.S., Sarin A. 2003. *Apoptosis.* 8:363-370. **48. Vink J.**, Cloos J., Kaspers G.J. 2006. *Br J Haematol.* 134:253-262. **50. Wojcik C.** 2002. *J. Cell. Mol. Med.* 6: 25-48. **51. Wojcik C.**, DeMartino G.N. 2003. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35: 579-589. **52. Yang W.**, Monroe J., Zhang Y., George D., Bremer E., Li H. 2006. *Cancer Lett.* 243: 217-227. **53. Zachara N.E.**, Hart G.W. 2004. *Trends Cell Biol.* 14(5): 218-221.