

УСКОРЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПРОТЕОЛИЗА ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ИММУНОПРОТЕАСОМОЙ

© 2013 г. Е. С. Кузина, Е. Л. Черноловская, А. А. Кудряева, М. А. Зенкова, В. Д. Кнорре,
Е. А. Сурина, Н. А. Пономаренко, Т. В. Бобик, И. В. Смирнов, А. В. Бачева,
А. А. Белогуров, член-корреспондент РАН А. Г. Габибов, академик В. В. Власов

Поступило 03.06.2013 г.

DOI: 10.7868/S0869565213340215

Протеасома — многосубъединичный белковый комплекс, обладающий протеолитической активностью и присутствующий в ядрах и цитоплазме клеток. Протеасома 20S с молекулярной массой 700 кДа и коэффициентом седиментации 20S в качестве протеолитического ядра входит в состав более сложной частицы — 26S протеасомы [1]. Чтобы регулировать процесс деградации белков, в клетке существует система убиквитинилирования, которая маркирует отслужившие или дефектные белковые молекулы для распознавания протеасомой и последующего протеолиза [2]. Одной из важнейших биологических функций протеасомы является гидролиз внутриклеточных белков до антигенных пептидов, которые затем презентуются на поверхности клетки с помощью молекул главного комплекса гистосовместимости класса I [3]. Недавние исследования свидетельствуют о существовании молекулярного механизма, благодаря которому пептиды, генерируемые протеасомой, могут презентироваться также на молекулах главного комплекса гистосовместимости класса II [4]. Каталитическая активность конститутивной протеасомы обеспечивается тремя субъединицами $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$, которые экспрессируются в клетках конститутивно. Протеасома, содержащая в каталитическом центре соответствующие иммуно-субъединицы $\beta 1i$, $\beta 2i$ и $\beta 5i$, называется иммуно-протеасомой и существенно отличается от кон-

ститутивной протеасомы по активности и субстратной специфичности. Набор антигенных пептидов, образующихся при действии иммуно-протеасомы, отличается от набора пептидов, образующихся при действии конститутивной протеасомы [5, 6]. Недавно было показано, что иммунопротеасома не только изменяет спектр деградации антигенных белков, но и обуславливает поддержание белкового гомеостаза в условиях окислительного стресса, вызванного действием интерферонов на клетку [7]. Повышение количества иммунопротеасомы в клетках наблюдается при ряде заболеваний (гематологические злокачественные опухоли [8], ревматоидный артрит [9], аутоиммунный колит [10], болезнь Альцгеймера [11], болезнь Хантингтона [12]).

Одним из распространенных и социально значимых аутоиммунных заболеваний является рассеянный склероз (РС), характеризующийся разрушением миелиновой оболочки нервных волокон. Основным аутоантигеном, на который направлен иммунный ответ при рассеянном склерозе, является основной белок миелина (myelin basic protein, MBP). В настоящее время молекулярные механизмы, лежащие в основе развития рассеянного склероза, активно изучаются. Результаты недавних исследований продемонстрировали важную роль как конститутивной протеасомы, так и иммунопротеасомы в развитии этого заболевания [13].

Ранее нами был изучен *in vitro* протеолиз MBP протеасомой, изолированной из здоровых мышей и мышей с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) — экспериментальной моделью РС [14]. В процессе дальнейшего развития данного направления исследований нами была создана модель для изучения внутриклеточного протеолиза MBP в клетках млекопитающих. В настоящей работе на базе этой модели было показано, что внутриклеточный гидролиз MBP значительно ускоряется при смещении баланса

Институт биоорганической химии
им. М.М. Шенкина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии наук, Москва
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

Институт химической биологии
и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской Академии наук,
Новосибирск

Институт биологии гена
Российской Академии наук, Москва

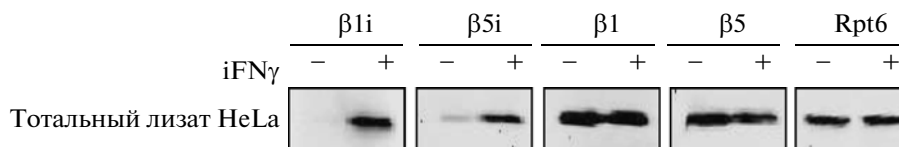


Рис. 1. Определение количества различных субъединиц протеасомы ($\beta 1i$, $\beta 5i$ – каталитические субъединицы иммунопротеасомы; $\beta 1$, $\beta 5$ – каталитические субъединицы конститутивной протеасомы; Rpt6 – субъединица с функцией АТфазы, присутствующая в протеасоме обоих типов) в клетках линии HeLa, обработанных (IFN γ +) и не обработанных (IFN γ –) интерфероном γ .

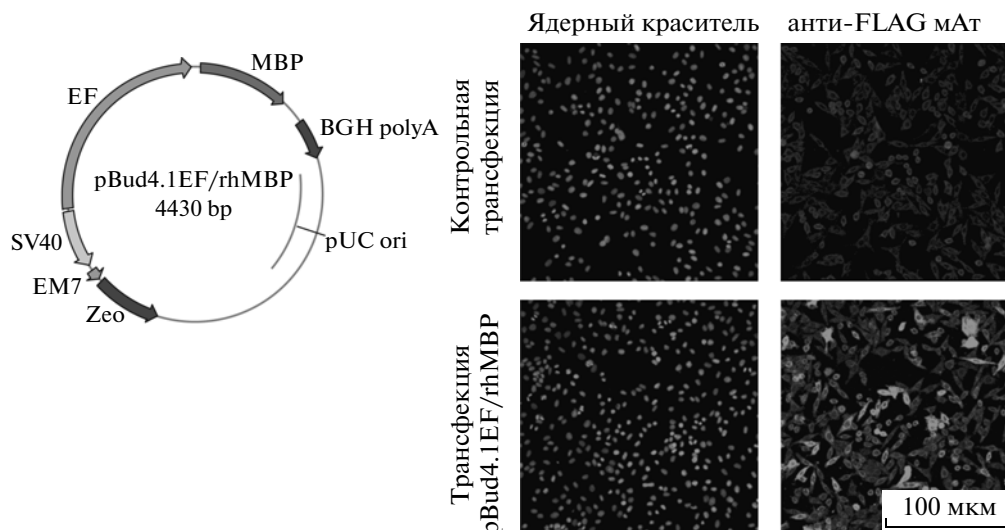


Рис. 2. Генетическая конструкция pBud4.1EF/rhMBP, кодирующая рекомбинантный MBP (слева), и иммуногистохимия культуры клеток HeLa, трансфицированных данной конструкцией и контрольных (справа).

Культура была зафиксирована параформальдегидом, пермеабилizована 0.1% раствором реагента Triton X-100 и окрашена моноклональным антителом к FLAG-эпиту (анти-FLAG мАт) в качестве первичного антитела и антителом к иммуноглобулинам мыши, конъюгированным с флуоресцентной меткой Alexa A488 в качестве вторичного антитела, а также ядерным красителем Hoechst 33342.

протеасома—иммунопротеасома в сторону последней.

Известно, что экспрессия основного белка миеллина в организме млекопитающих детектируется исключительно в центральной и периферической нервных системах. Данный белок содержится в мембране специализированных клеток, олигодендроцитах и шванновских клетках, формирующих миелиновую оболочку аксонов. К сожалению, работа с первичными нейрональными культурами человека несет в себе массу экспериментальных сложностей, в первую очередь недостаток материала и этические проблемы. В связи с этим, на первом этапе для изучения протеолиза MBP *ex vivo* нами была создана генетическая конструкция, позволяющая экспрессировать рекомбинантный MBP человека в клетках млекопитающих. Для этого фрагмент ДНК величиной 546 п.о., кодирующий полноразмерный MBP, был наработан методом ПЦР с использованием перекрывающихся специфических олигонуклеотидов и клонирован в вектор pBudCE4.1/EF под кон-

троль промотора фактора элонгации полипептидной цепи 1 (EF-1). Результирующая генетическая конструкция pBudCE4.1/EF/MBP позволяла экспрессировать в клетках млекопитающих полипептид, содержащий последовательность MBP, слитую с эпитопом 3xFLAG, обеспечивающим детекцию и выделение целевого продукта.

Клетки раковой опухоли шейки матки линии HeLa являются хорошо зарекомендовавшей себя системой для изучения процессинга внутриклеточных белков. Для оценки пригодности данной линии клеток в плане выполнения поставленной задачи мы изучили характер индукции иммунопротеасомы в клетках линии HeLa. Известно, что в клетках млекопитающих под действием провоспалительных цитокинов, таких как IFN γ и TNF α , происходит замещение конститутивных каталитических субъединиц на гомологичные иммуно-субъединицы $\beta 1i$ /LMP2, $\beta 2i$ /MECL1 и $\beta 5i$ /LMP7 [15]. С другой стороны, характер протекания как РС, так и ЕАЕ включает в себя массовый выброс IFN γ внутри центральной нервной системы.

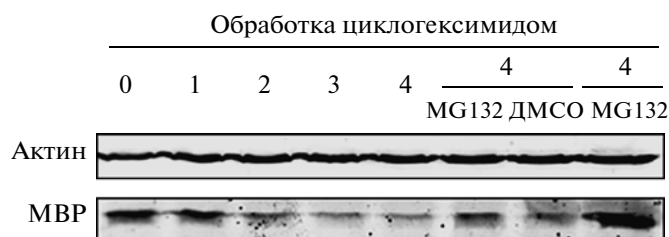


Рис. 3. Вестерн-блоттинг лизатов клеток линии HeLa, экспрессирующих рекомбинантный MBP и лизированных через разные промежутки (0, 1, 2, 3, 4 ч) времени после обработки циклогексимидом.

В качестве контроля использовали клетки, обработанные ингибитором протеасомы MG132. MBP — окрашивание моноклональными антителами к основному белку миелина, актин — окрашивание моноклональными антителами к β -актину.

Принимая во внимание приведенные литературные данные, мы обрабатывали клетки линии HeLa интерфероном γ в концентрации 250 МЕ/мл в ростовой среде в течение 48 ч. Далее клеточный лизат анализировали методом вестерн-блоттинга (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о значительном увеличении процентного содержания иммуносубъединиц протеасомы в клетках, обработанных IFN γ , в то время как общее количество 26S-протеасомы осталось неизменным, судя по уровню структурной субъединицы Rpt6, входящей в состав 19S-регуляторной субчастицы.

Поскольку HeLa оказались удачной клеточной линией для индукции иммунопротеасомы, в дальнейшем нами были предприняты попытки трансфекции данных клеток генетическими конструкциями, кодирующими аминокислотную последовательность MBP человека. Для этого в клетки в оптимальной фазе роста при плотности прикрепленной культуры 75–85% вводили конструкцию pBud4.1EF/rhMBP (рис. 2) с помощью набора Lipofectamine LTX с реагентом Plus. Иммуногистохимический анализ трансфицированной культуры клеток HeLa с использованием моноклональных антител к FLAG-эпиту по продемонстрировал наличие целевого белка в цитоплазме (рис. 2). В дальнейшем нами была изучена стабильность внутриклеточного MBP. Для этого клетки, трансфицированные конструкцией pBud4.1EF/rhMBP, обрабатывали ингибитором эукариотических рибосом — циклогексимидом (ЦГИ). Вследствие прекращения трансляции всех клеточных мРНК синтез белка, в том числе кодируемого, и экзогенной ДНК в клетке полностью останавливается. Через определенные промежутки времени клетки лизировали и далее определяли остаточное количество MBP методом вестерн-блоттинга. Дополнительно клетки были обработаны ингибитором протеасомы MG132 в отсутствие и совместно с ЦГИ, а также диметил-

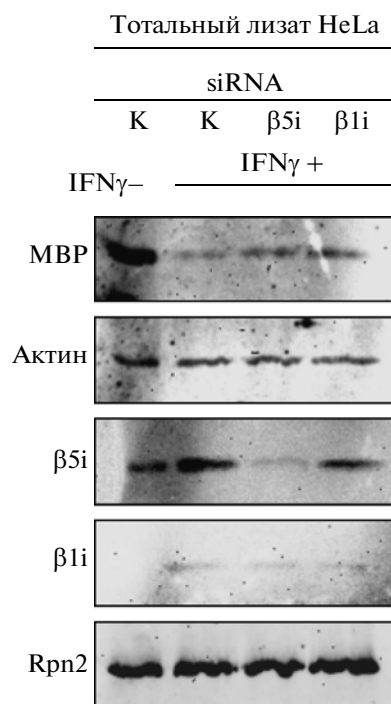


Рис. 4. Вестерн-блоттинг лизатов клеток линии HeLa, экспрессирующих рекомбинантный MBP, обработанных (IFN γ +) и необработанных (IFN γ –) интерфероном γ , а также клеток, в которых понижен уровень иммуносубъединиц LMP2 и LMP7 в результате воздействия малых интерферирующих РНК.

К — трансфекция контрольной неспецифической siRNA, β 5i — siRNA, блокирующей экспрессию субъединицы LMP7 (β 5i), β 1i — siRNA, блокирующей экспрессию субъединицы LMP2 (β 1i). Окрашивание антителами: MBP — антитела к основному белку миелина; β 5i, β 1i, Rpn2 — антитела к соответствующим субъединицам протеасомы; актин — антитела к β -актину.

сульфоксидом (DMSO, контроль). Результаты, приведенные на рис. 3, свидетельствуют, что в присутствии ЦГИ основной белок миелина эффективно гидролизруется в клетках линии HeLa. В то же время распад MBP полностью ингибируется MG132, а в отсутствие ЦГИ ингибирование протеасомы приводит к накоплению MBP. Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что внутриклеточный гидролиз MBP осуществляется протеасомой.

На заключительном этапе работы мы изучали внутриклеточный протеолиз MBP в клетках линии HeLa в нормальных условиях и при обработке противовоспалительным цитокином. Для этого клетки, трансфицированные pBud4.1EF/rhMBP, обрабатывали IFN γ . По прошествии 24 ч содержание MBP в клеточных лизатах анализировали методом вестерн-блоттинга, используя моноклональные антитела к FLAG-эпиту (рис. 4). В качестве контроля процедуры нанесения применяли гибридизацию этой же мембраны с моноклональными антителами

к актину. Как следует из приведенных данных, количество основного белка миелина значительно снижено в клетках, обработанных IFN γ . Данное наблюдение свидетельствует об ускоренном протеолизе МВР иммунопротеасомой. Проведение предварительной трансфекции клеточной культуры малыми интерферирующими РНК (siRNA) к иммуносубъединицам протеасомы $\beta 1i$ и $\beta 5i$ в сравнении с контрольной siRNA не только понижало уровень экспрессии соответствующих иммуносубъединиц, но и ингибировало внутриклеточный протеолиз МВР.

Основываясь на полученных экспериментальных результатах, можно сделать вывод, что опосредованный протеасомой внутриклеточный протеолиз МВР значительно ускоряется при воздействии провоспалительного цитокина IFN γ . Подавление экспрессии иммуносубъединиц протеасомы малыми интерферирующими РНК ингибирует внутриклеточный протеолиз МВР. Полученные данные свидетельствуют о возможной роли иммунопротеасомы в развитии нейродегенерации при аутоиммунных нарушениях в центральной нервной системе, а также способах направленного воздействия на иммунопротеасому с помощью малых интерферирующих РНК.

Работа проведена в рамках научных проектов, выполняемых ведущими молодежными коллективами, РФФИ 12-04-33258 “Новые подходы к терапии аутоиммунных заболеваний”. Поддержана грантами РФФИ 12-04-01609-а, 12-04-92428-ЕМБЛ_а, 10-04-00673-а, 09-04-12128-офи_м ; программами Президиума РАН “Фундаментальные науки — медицине” и № 27 “Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов”; грантом Президента РФ «Научная школа “Химические основы биокатализа”».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Demartino G.N., Gillette T.G. // Cell. 2007. V. 129. P. 659–662.
2. Hershko A., Ciechanover A. // Ann. Rev. Biochem. 1982. V. 51. P. 335–364.
3. Gaczynska M., Rock K.L., Goldberg A.L. // Nature. 1993. V. 365. P. 264–267.
4. Tewari M.K., Sinnathamby G., Rajagopal D., Eisenlohr L.C. // Nature Immunol. 2005. V. 6. P. 287–294.
5. Sijts E.J., Kloetzel P.M. // Cell. and Mol. Life Sci. 2011. V. 68. P. 1491–1502.
6. Chen W., Norbury C.C., Cho Y., Yewdell J.W., Bennink J.R. // J. Exp. Med. 2001. V. 193. P. 1319–1326.
7. Seifert U., Bialy L.P., Ebstein F., Bech-Otschir D., Voigt A., Schroter F., Prozorovski T., Lange N., Steffen J., Rieger M., Kuckelkorn U., Aktas O., Kloetzel P.M., Kruger E. // Cell. 2010. V. 142. P. 613–624.
8. Altun M., Galardy P.J., Shringarpure R., Hideshima T., LeBlanc R., Anderson K.C., Ploegh H.L., Kessler B.M. // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 7896–7901.
9. Muchamuel T., Basler M., Aujay M.A., Suzuki E., Kalim K.W., Lauer C., Sylvain C., Ring E.R., Shields J., Jiang J., Shwonek P., Parlati F., Demo S.D., Bennett M.K., Kirk C.J., Groettrup M. // Nat. Med. 2009. V. 15. P. 781–787.
10. Schmidt N., Gonzalez E., Visekruna A., Kuhl A.A., Lodenkemper C., Mollenkopf H., Kaufmann S.H., Steinhoff U., Joeris T. // Gut. 2010. V. 59. P. 896–906.
11. Mishto M., Bellavista E., Santoro A., Stolzing A., Ligorio C., Nacmias B., Spazzafumo L., Chiappelli M., Licastro F., Sorbi S., Pession A., Ohm T., Grune T., Franceschi C. // Neurobiol. Aging. 2006. V. 27. P. 54–66.
12. Diaz-Hernandez M., Hernandez F., Martin-Aparicio E., Gomez-Ramos P., Moran M.A., Castano J.G., Ferrer I., Avila J., Lucas J.J. // J. Neurosci. 2003. V. 23. P. 11653–11661.
13. Mishto M., Bellavista E., Ligorio C., Textoris-Taube K., Santoro A., Giordano M., D'Alfonso S., Listi F., Nacmias B., Cellini E., Leone M., Grimaldi L.M., Fenoglio C., Esposito F., Martinelli-Boneschi F., Galimberti D., Scarpini E., Seifert U., Amato M.P., Caruso C., Foschini M.P., Kloetzel P.M., Franceschi C. // PloS one. 2010. V. 5. e9287.
14. Bacheva A.V., Belogurov A.A., Ponomarenko N.A., Knorre V.D., Govorun V.M., Serebryakova M.V., Gabibov A.G. // Acta nat. 2009. V. 1. № 1. P. 84–87.
15. Kloetzel P.M. // Nat. Revs. 2001. V. 2. P. 179–187.