

В.Є. Досенко, В.Ю. Загорій, О.О. Мойбенко

Протеасомальна деградація рибонуклеїнових кислот різних ізоформ NO-синтази

*С помощью разработанного метода определения РНКазной активности протеасомы с использованием обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции установлено, что протеасома 26S из протеасомальной фракции II эффективно расщепляет РНК актина, миозина и всех изоформ NO-синтазы. Интенсивность деградации РНК под действием протеасомы и специфических РНКаз практически не отличается. Также показано, что специфический ингибитор протеасомы класто-лактицистин β -лактон в значительной степени подавляет РНКазную активность протеасомы. Таким образом, в условиях *in vitro* протеасома осуществляет деградацию ряда эукариотных РНК, а предложенный метод может быть использован для поиска субстанций, способных специфически подавлять РНКазную активность протеасомы.*

ВСТУП

Важливим показником експресії будь-якого гена є стабільність інформаційних РНК (іРНК), що утворюється внаслідок транскрипції та сплайсингу [1, 7, 15]. Доведено, зокрема, що строк напівжиття іРНК ендотеліальної NO-синтази (eNOS) значно коливається залежно від стадії клітинного циклу, в якому знаходиться ендотеліальна клітина, та від її віку [16, 22]. Якщо клітина проліферує, то показник стабільності eNOS утричі перевищує такий у клітинах, що не діляться (27 і 9 год відповідно), а вміст іРНК внаслідок цього збільшується у 4 рази [22]. Встановлено, що цей феномен зумовлений наявністю протеїну з молекулярною масою 51 кДа, білка який здатний специфічно зв'язуватися з 3'-некодуючою ділянкою іРНК eNOS, а це призводить до прискореної деградації молекули іРНК. У проліферуючих клітинах рівень зв'язування цього протеїну з відповідною ділянкою іРНК eNOS знижений більше, ніж удвічі порівняно із клітинами в стані спокою. Невідомо, які фактори сприяють приєд-

нанню зазначеного білка до іРНК eNOS і які фактори регулюють кількість його в клітині. Зважаючи на те, що майже 90 % внутрішньоклітинних білків підлягають протеасомальній деградації, логічно припустити, що і цей протеїн після убіквітінізації розщеплюється протеасомою [10]. Крім того, французькими дослідниками було доведено, що протеасома має окрім трьох пептидазних ще й РНКазну активність [18–20]. Застосувавши молекулу РНК вірусу табачної мозаїки, вони показали, що як ціла протеасома, так і окремі її субодиниці (zeta та iota) проявляють РНКазну активність [19]. Припускається, що від активності протеасомального протеолізу залежить строк напівжиття молекул РНК, а врешті-решт рівень експресії певних білків у клітинах [1–4, 8]. Цікаво, що РНКазы, тобто ферменти, на яких традиційно покладалася функція з руйнування РНК, є субстратами протеасомального протеолізу [6, 14]. Отже, протеасома може впливати на стабільність РНК одразу за декількома механізмами. Надзвичайну важливість протеасомального протеолізу в цих процесах підтверджують відо-

мості про еволюційну давність залучення протеасоми в регуляцію кількості РНК. Доведено, що субодиниці протеасоми, виділені із соняшника (*Sunflower hypocotyles*), також мають РНКазну активність [5]. Цілком імовірно, що протеасома формувалася як універсальний внутрішньоклітинний макромолекулярний комплекс, призначений для деградації всіх складових системи синтезу білків, починаючи від ДНК, РНК і закінчуючи власне протеїнами.

Виходячи з вищенаведеного та зважаючи на практично повну відсутність даних про можливість руйнування специфічних еукаріотних РНК, було поставлено за мету дослідити можливість протеасомальної деградації РНК різних ізоформ NO-синтази.

МЕТОДИКА

РНК із міокарда лівого шлуночка мишей і щурів виділяли за допомогою набору Trizol RNA-Prep ("Isogene", Росія). Тотальну РНК (150–200 нг) змішували з протеасомальною фракцією II (PF II) у концентрації 0,25 мг/мл [9] або з комбінацією двох рибонуклеаз (RNase A/T1 Mix, "Fermentas", Литва). Концентрація рибонуклеази А в пробі становила 0,12 мг/мл, а рибонуклеази Т1 – 1,5 ОД. Специфічний інгібітор протеасоми класто-лактацистин β-лактон (4 мкмоль/л) додавали або безпосередньо

перед інкубацією, або за 2 год до додавання РНК. В окремих дослідах для попередження деградації РНК добавляли в проби олігонуклеотид 5'-gtgcctttgggctcctccaaggtg-3' (0,26 мкг/мкл), що відповідає послідовності нуклеотидів у РНК індукбельної NO-синтази (iNOS). Об'єм проб доводили до 5 мкл деіонізованою водою. Надалі всі проби інкубували протягом 60 хв при 36°C, після чого проводили зворотну транскрипцію за використання RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit ("Fermentas", Литва) із застосуванням випадкового гексамерного (random hexamer) праймера. В окремих дослідах для виключення можливості протеасомальної деградації зворотної транскриптази PF II додавали безпосередньо перед реакцією. Отриману одноланцюгову ДНК використовували як матрицю у полімеразній ланцюговій реакції для ампліфікації фрагментів генів, що кодують специфічні для серця миші актин і легкі ланцюги міозину [21], а також генів, що кодують NO-синтази щура – ендотеліальну, індукбельну та нейронну (nNOS) [17]. Гени актину та легких ланцюгів міозину було обрано з огляду на високий рівень їх експресії в клітинах серця. Інформацію про послідовність нуклеотидів у праймерах, температуру їх гібридизації та розмір ампліфікатів у парах основ (п.о.) наведено в таблиці. Ампліфікаційна суміш

Послідовність нуклеотидів у праймерах, температура їх гібридизації та розмір ампліфікатів генів, специфічних для серця миші – актину, легких ланцюгів міозину, а також генів різних ізоформ NO-синтази щура

Ген	Праймери	Температура гібридизації, °C	Розмір ампліфікату, п.о.
Актину	прямий – 5'-tgttacgtcgccttgattttgag-3', зворотний – 5'-aagagagagacatatcagaagc-3'	63	300
Легких ланцюгів міозину	прямий – 5'-gccagaagcggatagaag-3', зворотний – 5'-ctgtggtcagggtcagtc-3'	63	300
NO-синтази індукбельної	прямий – 5'-ggaggaccctctatcaggaag -3' зворотний – 5'-gtgcctttgggctcctccaaggtg -3'	58,5	361
ендотеліальної	прямий – 5'-gctgctggcctggaagaag-3' зворотний – 5'-gccatgcacggacagcagcacaat-3'	58,5	437
нейронної	прямий – 5'-gaactgggaggggagaggattctg-3' зворотний – 5'-cacgaggtcctctgtggtgccgg -3'	58,5	398

містила 5 мкл 5-кратного буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 30 пмоль/л кожного з праймерів та 0,5 ОД Таq-полімерази (“АмпліСенс”, Росія) і ДНК-матрицю, отриману в результаті зворотної транскрипції. Об’єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в термоциклері GeneAmp System 2700 (“Applied Biosystems”, США). Кількість циклів ампліфікації становила 30 (для генів актину та легких ланцюгів міозину) та 33 (для генів, що кодують різні ізоформи NO-синтаз). Ампліфікати розділяли в 2%-му агарозному гелі, який містив бромистий етидій. Візуалізацію й оцінку яскравості ампліфікатів після горизонтального електрофорезу (170 В протягом 30 хв) проводили за допомогою транслюмінатора та програмного забезпечення ViTran (“Біоком”, Росія).

Вірогідність різниці отриманих результатів (наявність або відсутність ампліфікату) визначали за χ^2 -критерієм з використанням програми Excel 2000.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Застосування розробленого нами методу визначення РНКазної активності протеасоми із застосуванням зворотної транскрипції та наступною полімеразною ланцюговою реакцією дозволило встановити, що протеасома 26S з PF II ефективно розщеплює РНК (рис. 1, 2). Інтенсивність протеасомальної та РНКазної деградації РНК не відрізняються, тобто ефективність руйнування молекул РНК під дією протеасоми відповідає такій у РНКаз. Також результати дослідів вказали, що класто-лактацистин β -лактон пригнічує РНКазну активність протеасоми тільки в разі достатньо довгої інкубації із PF II (протягом 2 год), практично повністю попереджуючи деградацію РНК актину та міозину ($P=0,01$). Важливо, що класто-лактацистин β -лактон не впливав на перебіг зворотної транскрипції та

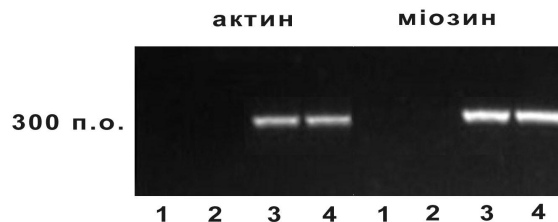


Рис. 1. Вплив протеасомальної фракції II (PF II) на результати зворотної транскрипції з наступною ампліфікацією генів актину та легких ланцюгів міозину: 1 – інкубація РНК з PF II, 2 – інкубація РНК з PF II при додаванні класто-лактацистин β -лактону (4 мкмоль), 3 – інкубація РНК з класто-лактацистин β -лактоном (4 мкмоль), 4 – контрольна проба (тільки РНК). Тривалість інкубації – 60 хв. Тут і на рис. 2, 3 наведено результати одного з п’яти окремих експериментів

полімеразної ланцюгової реакції, бо інкубація цього інгібітора з РНК не змінювала кінцевий результат (яскравість ампліфікату). Також було встановлено, що компоненти PF II не впливають на процес зворотної транскрипції та ампліфікації, тому що при додаванні протеасомальної фракції безпосередньо перед початком зворотної транскрипції кількість продукту полімеразної ланцюгової реакції не змінювалась.

В експериментах з оцінкою впливу PF II на результати ампліфікації генів різних ізоформ NO-синтаз було отримано аналогічні результати (рис. 3) – інкубація РНК з PF II призводила до її руйнування і, як наслідок, не утворювались ампліфікати

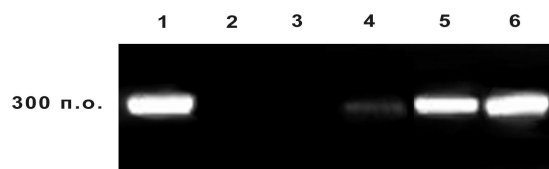


Рис. 2. Вплив протеасомальної фракції II (PF II) на результати зворотної транскрипції з наступною ампліфікацією гена легких ланцюгів міозину: 1 – контрольна проба (тільки РНК), 2 – інкубація РНК з PF II протягом 60 хв, 3 – інкубація РНК з комбінацією рибонуклеаз протягом 60 хв, 4 – інкубація РНК з PF II, що знаходилася протягом 2 год при 36°C, 5 – інкубація РНК з PF II, на яку протягом 2 год впливав класто-лактацистин β -лактон (4 мкмоль), 6 – додавання PF II безпосередньо перед зворотною транскрипцією РНК

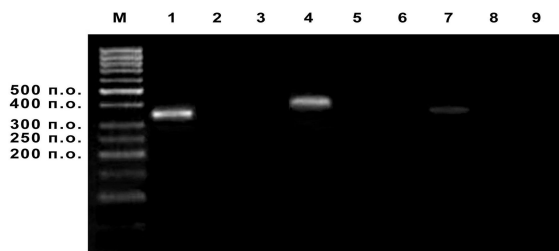


Рис. 3. Вплив протеасомальної фракції II (PF II) на результати зворотної транскрипції з наступною ампліфікацією генів різних ізоформ NO-синтази: iNOS (доріжки 1–3), eNOS (доріжки 4–6), nNOS (доріжки 7–9): 1, 4, 7 – контрольна проба (тільки РНК), 2, 5, 8 – інкубація РНК з PF II протягом 60 хв, 3, 6, 9 – інкубація РНК з PF II протягом 60 хв при додаванні олігонуклеотиду 5'-gtgcctttgggctctcctaagggtg-3'. М – маркер молекулярної маси

відповідних генів ($P=0,01$). Таким чином, за нашими результатами, якоїсь специфічності або вибірковості у деградації РНК протеасомою не спостерігається. Наша спроба попередити руйнування певних РНК за допомоги олігонуклеотиду, що відповідає послідовності нуклеотидів у РНК iNOS, виявилася невдалою – деградація РНК відбувалася так само інтенсивно.

Слід визнати, що вивчення РНКазної активності протеасоми знаходиться на початковому рівні. Досі остаточно не з'ясовано, які саме субодиниці протеасоми забезпечують здатність цього макромолекулярного комплексу до руйнування РНК [11]. Petit та співавт. наводять докази того, що некаталітичні (відносно білків) α -субодиниці протеасоми (zeta та iota) відповідають за РНКазну активність [19], а перша з них виявляється в клітинах переважно (60–70 %) у мономерному стані як в ядрі, так і в цитоплазмі [13]. У наших експериментах уперше показано, що специфічний інгібітор протеасоми, котрий взаємодіє саме з пептидазними каталітичними β -субодиницями, пригнічує РНКазну її активність. Не виключено, що під впливом цього інгібітора змінюється конформація всього комплексу і це призводить до порушення здатності протеасоми руйнувати РНК чи

зв'язуватися з відповідними послідовностями в її молекулах. Нині з'ясовано, що ефективність деградації РНК залежить від кількості послідовностей AUUUA в цих молекулах [8, 12]. Тобто протеасома має можливість безпосередньо або за участю додаткових факторів розпізнавати певні послідовності в молекулах РНК. Однак ці послідовності є завжди і якщо б не було факторів, що обмежують і регулюють РНКазну активність протеасоми, то жодна білкова молекула не синтезувалася б у клітині. Пошук ендогенних і синтетичних регуляторів саме РНКазної активності в цьому аспекті відкриває великі перспективи як у розумінні фундаментальних механізмів регуляції стабільності молекул РНК і синтезу білків, так і в можливостях цілеспрямованого впливу на ці процеси через протеасомальний протеоліз.

V.E. Dosenko, V.Yu. Zagoriy, A.A. Moybenko

PROTEASOMAL DEGRADATION OF RNA OF DIFFERENT NO-SYNTASE ISOFORMS

Using a developed method of determination of the RNase activity of the proteasome *in vitro* with the application of reverse transcription followed by subsequent polymerase chain reaction it was shown that 26S proteasome from the proteasomal fraction II effectively cleaves RNA, encoding actin, myosin and all isoforms of NO synthase. The intensity of RNA degradation by proteasome and specific RNases is similar. It was also shown that clasto-lactacystin β -lactone, a specific proteasome inhibitor significantly depresses RNase activity of the proteasome. Thus, proteasome is capable to degrade certain eukariotic RNA *in vitro* and the proposed method can be used in order to discover specific substances such as inhibitors of RNase activity of the proteasome.

O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dosenko V.E., Zagoriy V.Yu., Moybenko O.O., Parhomenko O.M. Патофізіологічні аспекти генетичного поліморфізму ендотеліальної NO-синтази // Фізіол. журн. – 2002. – 48, №6. – С. 86–102.
2. Евтеева И.Н., Куличкова В.А., Обухова А.Д. и др. EGF регулирует специфическую эндорибонуклеазную активность 26S протеасом из клеток A431:

- потенциальная роль протеасом в контроле стабильности мРНК // Цитология. –2003. – **45**, №5. – С. 488–492.
3. Куличкова В.А., Миттенберг А.Г., Евтеева И.Н. и др. Селективный эффект эпидермального фактора роста на эндорибонуклеазную активность различных субпопуляций протеасом из клеток линии А431 // Там же. –2004. – **46**, №6. – С. 525–530.
 4. Токтарова М.В., Куличкова В.А., Миттенберг А.Г. и др. Селективный эффект индукторов апоптоза на эндорибонуклеазную активность 26S протеасом и альфа-RNP субъединиц в клетках К562: возможное вовлечение 26S протеасом и альфа-RNP в регуляцию стабильности РНК // Там же. – №3. – С. 283–290.
 5. Ballut L., Petit F., Mouzeyar S. et al. Biochemical identification of proteasome-associated endonuclease activity in sunflower // Biochim. and Biophys. Acta. – 2003. – **1645**, № 1. – P. 30–39.
 6. Chase B.I., Zhou Y., Xiang Y. et al. Proteasome-mediated degradation of RNase L in response to phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) treatment of mouse L929 cells // J. Interferon Cytokine Res. – 2003. – **23**, №10. – P. 565–573.
 7. Chu Y., Heistad D.D., Knudtson K.L. et al. Quantification of mRNA for endothelial NO synthase in mouse blood vessels by real-time polymerase chain reaction // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2002. – **22**, №4. – P.611–616.
 8. Gautier-Bert K., Murol B., Jarrousse A.S. et al. Substrate affinity and substrate specificity of proteasomes with RNase activity // Mol. Biol. Rep. – 2003. – **30**, №1. –P. 1–7.
 9. Giulivi C., Davies K.J.A. Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 S) proteasome // J. Biol. Chem. – 1993. – **268**. – P. 8752–4753.
 10. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins // Nature. – 2003. – **426**. – P.895–899.
 11. Horikoshi T., Page J., Lei G. et al. Proteasomal RNase activity in human epidermis // In Vivo. – 1998. – **12**, №2. – P. 155–158.
 12. Jarrousse A.S., Petit F., Kreutzer-Schmid C. et al. Possible involvement of proteasomes (prosome) in AUUUA-mediated mRNA decay // J. Biol. Chem. – 1999. – **274**, №9. – P. 5925–5930.
 13. Jorgensen L., Hendil K.B. Proteasome subunit zeta, a putative ribonuclease, is also found as a free monomer // Mol. Biol. Rep. – 1999. – **26**, №1–2. – P. 119–23.
 14. Lasch P., Petras T., Ullrich O. et al. Hydrogen peroxide-induced structural alterations of RNase A // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, №12. – P.9492–9502.
 15. Laufs U., Liao J.K. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase //Ibid. – 1998. – **273**, №37. –P. 24266–24271.
 16. Matsushita H., Chang E., Glassford A.J. et al. eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: preservation by hTERT immortalization // Circulat. Res. – 2001. – **89**, №9. – P. 793–798.
 17. Park C.O., Yi H.G. Apoptotic change and NOS activity in the experimental animal diffuse axonal injury model // Yonsei Med. J. – 2001. – **42**, №5. – P. 518–526.
 18. Petit F., Jarrousse A.S., Boissonnet G. et al. Proteasome (prosome) associated endonuclease activity // Mol. Biol. Rep. – 1997. – **24**, №1–2. – P. 113–117.
 19. Petit F., Jarrousse A.S., Dahlmann B. et al. Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation // Biochem. J. – 997. – **26**, Pt 1. – P. 93–98.
 20. Pouch M.N., Petit F., Buri J. et al. Identification and initial characterization of a specific proteasome (prosome) associated RNase activity // J. Biol. Chem. – 1995. – **270**, №37. – P. 22023–22028.
 21. Rudnicki M.A., Jackowski G., Saggin L., McBurney M.W. Actin and myosin expression during development of cardiac muscle from cultured embryonal carcinoma cells // Dev. Biol. –1990. – **138**, №2. – P. 348–358.
 22. Searles C.D., Miwa Y., Harrison D., Ramasamy S., Posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase guring cell growth // Circulat. Res. – 1999. – **85**. – P. 588–595.