

УДК 577.21, 577.12

НАЛИЧИЕ И КАНОНИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ КЛЮЧЕВЫХ АМИНОКИСЛОТ ДЕГРОНА ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ – НЕДОСТАТОЧНОЕ УСЛОВИЕ ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА

© 2011 г. А. В. Морозов^{1*}, А. В. Тимофеев¹, В. А. Морозов², В. Л. Карпов¹

¹Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Robert Koch Institute, Berlin, 13353 Germany

Поступила в редакцию 26.10.2010 г.

Принята к печати 29.11.2010 г.

Орнитиндекарбоксилаза (ОДК) мышей деградирует в протеасоме по убиквитин-независимому пути с периодом полураспада около 2 ч. Эффективная деградация белка обусловлена наличием на его С-конце 37 аминокислот, известных как деградационный сигнал (дегрон). Недавно среди этих аминокислот выявлены ключевые позиции – Cys441 и Ala442, мутации по которым приводили к стабилизации белка в целом, при этом замены других аминокислотных остатков существенно не влияли на функциональность ОДК-дегрона. Кроме того, любые делеции или же инсерции в области между ключевыми аминокислотами и С-концом ОДК приводили к серьезному замедлению скорости деградации белка, таким образом, принципиальным оказалось и расстояние (удаленность) этих аминокислот от С-конца ОДК. Используя эти данные в нашей работе, мы внедрили необходимые для функционирования ОДК-дегрона аминокислотные остатки в состав альфа-фетопротеина с делетированным экспортационным сигналом (Δ AFP), причем на расстоянии 20 аминокислот от С-конца (Δ AFPCAG и Δ AFPLCAG). Делеция N-концевого экспортационного сигнала исключала возможную секрецию Δ AFP и модифицированных белков из клетки. Компьютерный анализ Δ AFP и полученных на его основе Δ AFPCAG и Δ AFPLCAG показал, что внедрение аминокислотных замен не приводит к значительным изменениям профиля гидрофобности, а также практически не сказывается на вторичной структуре С-концевой области белков. По результатам анализа *in vitro*, проведенного с использованием ингибитора протеасомы MG132 и ингибитора трансляции циклогексимида, в клетках HEK293T стабильность белков Δ AFPCAG и Δ AFPLCAG и Δ AFP практически одинакова. Таким образом, введение ключевых аминокислот ОДК-дегрона, причем в ключевые позиции относительно С-конца, в состав Δ AFP не повлияло на его деградационные характеристики. Возможно, это связано с наличием других, пока неизвестных, но важных для функционирования аминокислотных остатков в составе ОДК-дегрона, либо конформация Δ AFP исключает возможность взаимодействия его С-конца с протеасомой.

Ключевые слова: орнитиндекарбоксилаза, дегрон, протеасомная деградация, ключевые аминокислоты, альфа-фетопротеин.

CRITICAL AMINO ACIDS OF ORNITHINE DECARBOXYLASE DEGRON: THE PRESENCE AND C-TERMINAL ARRANGEMENT IS INSUFFICIENT FOR ALFA-FETOPROTEIN DEGRADATION, by A. V. Morozov^{1*}, A. V. Timofeev¹, V. A. Morozov², V. L. Karpov¹ (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, *e-mail: Runkel@inbox.ru; ²Robert Koch Institute, Berlin, 13353 Germany). Mouse ornithine decarboxylase (ODC) degrades in proteasome in an ubiquitin-independent manner with an average half-life of 2 h. The 37 amino acid long C-terminal fragment known as a degradation signal (degron) is responsible for the effective degradation of ODC. Recently, amino acids being critical for degradation in the ODC-degron have been mapped. Mutations of Cys441 and Ala442 led to protein stabilization, while a substitution of other amino acids composing ODC-degron had almost no effect on the protein turnover; whereas insertions or deletions in region between Ala442 and ODC C-terminus diminished greatly rate of protein degradation, e.g. positioning of the key amino acids from the C-terminus was shown to be crucial. Using these data we introduced both key amino acids into the alfa-fetoprotein with truncated exportation signal (Δ AFP), at the same distance from the C-terminus as they being in the ODC (Δ AFPCAG and Δ AFPLCAG). Removal of N-terminal exportation signal prevented secretion of modified proteins. Using *in silico* approach we demonstrated no significant difference in hydrophobicity or secondary structure between C-terminus of Δ AFP and mutated proteins. The degradation kinetics of Δ AFP, Δ AFPCAG, Δ AFPLCAG in cycloheximide-chase and proteasome

Принятые сокращения: AFP – альфа-фетопротеин; ОДК – орнитиндекарбоксилаза.

* Эл. почта: Runkel@inbox.ru; Runkel10@gmail.com

inhibition assay (using MG132) was identical. Obtained results suggest that introduced substitutions are insufficient for effective recognition of mutated Δ AFP by 26S proteasome. We assume that additional amino acids composing ODC-degron or their combine action could also affect degradation. Besides that, one cannot exclude that conformation of the mutated Δ AFP limits its C-terminus accessibility to proteasome.

Keywords: ornithine decarboxylase, degron, proteasomal degradation, critical amino acids, alpha-fetoprotein.

Выяснение механизмов деградации клеточных белков чрезвычайно важно, в частности, для понимания путей передачи клеточных сигналов и развития иммунологического ответа, а также при создании ДНК-вакцин. Протеасома – важнейший центр протеолиза внутриклеточных белков в эукариотической клетке. Перед деградацией в протеасоме белки-мишени “помечаются” убиквитином, таким образом приобретая деградационный сигнал, узнаваемый протеасомой [1, 2]. Однако не все белки деградируют в протеасоме по убиквитин-зависимому пути. Орнитиндекарбоксилаза (ОДК) мышей – это ключевой элемент в биосинтезе полиаминов. Этот белок представляет собой короткоживущий фермент, который разрушается в протеасоме по убиквитин-независимому пути [3]. На С-конце ОДК находится специфический деградационный сигнал (дегрон) размером 37 аминокислот [4]. Химерные белки, фланкированные по С-концу ОДК-дегроном, быстро деградируют в клетках различных клеточных линий животных и человека [5], а также грибов и растений [6, 7]. В ряде лабораторий с помощью сайт-направленного мутагенеза изучали влияния отдельных аминокислот в составе ОДК-дегрона на кинетику деградации ОДК. Так, еще в 1993 г. мутация Cys в позиции 441 была признана стабилизирующей. [8]. Недавно выявлены наиболее важные позиции в деградационном сигнале ОДК: деградация белка полностью блокируется в случае замены аминокислотных остатков Cys441 и Ala442, причем важно их местоположение (удаленность) относительно С-конца белка; при этом точечные замены других аминокислотных остатков не оказывают существенного влияния на деградацию ОДК [9, 10].

Альфа-фетопропротеин (AFP) – белок сыворотки крови развивающегося эмбриона млекопитающих. Продуцируемый печенью и желточным мешком эмбриона, он почти полностью исчезает из крови вскоре после рождения (через 1–2 года) животного или человека, но появляется в значительных количествах в крови взрослых особей при развитии рака печени и некоторых опухолей репродуктивной системы [11–13]. Таким образом, AFP представляет собой онкомаркер, который может быть использован как мишень для противоопухолевой терапии. В этой связи изучение AFP в целом и кинетики его деградации в клетке, в частности, важно как для фундаментальных, так и прикладных исследований.

Предположив, что в случае “удачной” модификации С-конца любого белка его деградация в про-

теасоме будет обеспечена, мы разработали следующую стратегию: с помощью сайт-направленного мутагенеза воссоздать реплику ОДК-дегрона путем введения его ключевых оснований на С-конец молекулы белка. В случае использования в качестве модельного белка AFP также необходимо предварительно удалить экспортационный сигнала с N-конца – во избежание секреции AFP из клетки. *A priori* можно сказать, что такие модификации AFP мало повлияют на его конформацию и антигенные характеристики, но обеспечат направленную протеасомную деградацию. В данной работе проанализировано влияние таких модификаций на кинетику деградации белка на примере AFP.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание вектора р Δ AFP. Полноразмерный ген *AFP* мышей (*mAFP*) был амплифицирован с использованием коммерческого вектора p Δ 116AFP и переклонирован в pCDNA3.1(-) (“Invitrogen”, США), в результате получена плаزمида рAFP.

При конструировании вектора р Δ AFP необходимо было удалить экспортационный сигнал (54 п.н.) с 5'-конца гена *mAFP*, для чего мы использовали праймеры Fd и Rd со встроенными сайтами рестрикции эндонуклеаз XbaI и BamHI соответственно (табл. 1). С плазмиды рAFP амплифицировали короткий фрагмент области 5'-конца *mAFP*, причем полученные амплимеры не содержали экспортационного сигнала. При этом удаленный вместе с экспортационным сигналом иницирующий кодон воссоздали в соответствии с правилом Козак.

Амплифицированный фрагмент вырезали из геля и далее очищали, используя набор Promega Wizard Gel Extraction kit (“Promega”) согласно рекомендациям производителя. Амплимер подвергали рестрикции эндонуклеазами XbaI и BamHI (“Fermentas”, Литва), после чего фрагмент выделяли из 2%-ного агарозного геля, как указано выше.

Фрагмент 5'-конца гена *mAFP*, содержащий экспортационный сигнал, удаляли, обрабатывая плазмиду рAFP рестриктазами XbaI и BamHI. Затем вектор выделяли из 1%-ного агарозного геля и очищали, как описано ранее.

Фрагмент 5'-конца *mAFP*, не содержащий последовательности экспортационного сигнала, лигировали по сайтам XbaI – BamHI с помощью T4 ДНК-лигазы (“Fermentas”) в подготовленный “раскрытый” на предыдущем этапе вектор рAFP. Далее проводили трансформацию клеток *Escherichia coli*

Таблица 1. Использованные праймеры

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')
Fd	CAT TTC GCT GCG TCT AGA ATG TTG CAC GAA AAT G
Rd	GAC TTA GCT TAA TAA TGG TTG TTG CCT G
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
Afp1	GAG TTT GGG ATA GCT TCC ACG TTA G
Afp2	GCA TGT ATG TTC AGT GAT AAG
Afp3	TCC ACG TGC TGC CAG CTC AGC G
BGHr	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
SDM CAG F	GCA AAG CCC AGG ACC AGT GTG CCG GTT TCA CAG AAG AGG GTC CAA AGT TG
SDM CAG R	CCC TCT TCT GTG AAA CCG GCA CAC TGG TCC TGG GCT TTG CAG CAC TTC TC
SDM LCAG F	CCT TTT GGA GAA GTG CTG CAA ATT GCA GGA CCA GTG TGC CGG TTT CA
SDM LCAG R	CAC ACT GGT CCT GCA ATT TGC AGC ACT TCT CCA AAA GGC CCG AG

Таблица 2. Программа проведения сайт-направленного мутагенеза

Время	1 мин	50 с	50 с	1 мин/т.н.	7 мин
Температура, °C	95	95	60	68	68
Количество циклов	1		18		1

штамма DH5- α ("Promega") по следующей схеме: инкубация в течение 1 ч на льду, затем 45 с при 42°C и еще 2 мин на льду. Затем клетки наносили на чашки Петри ("Corning Costar", США) с агаром, содержащим ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. На следующий день колонии переносили в 5 мл среды LB ("Sigma-Aldrich", США) и амплифицировали 16 ч, после чего плазмиды выделяли с помощью набора Qiagen Plasmid Mini Kit ("Qiagen", Германия). Таким образом, получен вектор р Δ AFP, нуклеотидная последовательность которого подтверждена секвенированием с использованием праймеров T7, Afp1, Afp2, Afp3 и BGHr (табл. 1).

Получение векторов р Δ AFPCAG и р Δ AFPLCAG. Мутации вводили в Δ AFP с помощью сайт-направленного мутагенеза, используя два набора праймеров (SDMCAG F и SDMCAG R, а также SDMLCAG F и SDMLCAG R) (табл. 1). Единичные нуклеотидные замены в области С-конца AFP вводили с помощью набора QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit ("Stratagene", США) согласно протоколу производителя.

Реакционная смесь ПЦР включала следующие компоненты: 5 мкл 10-кратного реакционного буфера, 1 мкл (10 нг) р Δ AFP, 0,5 мкл (125 нг) праймера SDMCAG F, 0,5 мкл (125 нг) праймера SDMCAG R, 1 мкл смеси dNTPs, 3 мкл QuikSolution (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit), 1 мкл ДНК-полимеразы PfuUltra.

Аmplификацию проводили по программе, приведенной в табл. 2.

Полученные в результате амплификации образцы помещали в лед и оставляли до тех пор, пока

температура не снизится ниже 37°C, после чего в каждый из них добавляли 1 мкл рестриктазы DpnI для разрушения исходной неметилированной матрицы; содержимое пробирок тщательно перемешивали и инкубировали 1 ч при 37°C.

Трансформацию проводили в 45 мкл ультракомпетентных клеток XL 10-Gold (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit), в которые предварительно добавляли 2 мкл β -меркаптоэтанола. Далее клетки трансформировали 2 мкл ДНК, обработанной Dpn I, по следующей схеме: инкубация в течение 30 мин на ледяной бане, затем 30 с при 42°C и 2 мин на льду. После этого добавляли 0,5 мл NZY+ и инкубировали клетки в течение 1 ч при 37°C на шейкере при 225 об/мин. Клетки высевали на чашки Петри с агаром, содержащим ампициллин в концентрации 100 мкг/мл; на следующий день выросшие колонии переносили в 5 мл среды LB и оставляли на 16 ч. Плазмиды выделяли с помощью набора Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System ("Promega").

На первом этапе в вектор р Δ AFP введены нуклеотидные замены, приводящие к замене трех аминокислотных остатков в белке Δ AFP: Glu554Cys, Val555Ala и Cys556Gly (позиции 18, 19 и 20 от С-конца Δ AFP соответственно). Полученный вектор назван р Δ AFPCAG. Наличие заданных мутаций в полученных клонах подтверждено секвенированием.

На втором этапе использовали ту же схему эксперимента и пару праймеров SDMLCAG F и SDMLCAG R, которые предназначены для введения четвертой аминокислотной замены – Ala550Leu. По материалам Такеучи (Takeuchi) и соавт. [10], Leu550 играет определенную, хоть и не ключевую, роль в

функционировании ОДК-дегрона, поэтому на основе вектора рΔAFPCAG получали вектор рΔAFPLCAG. Таким образом, синтезирующийся с него белок ΔAFPLCAG содержал уже 4 аминокислотные замены в С-концевой области. Процедура сайт-направленного мутагенеза выполнена по вышеприведенной схеме, наличие мутации Ala550Leu подтверждено двунаправленным сиквенсом.

Трансфекция, получение лизатов и анализ культуральной жидкости. Трансфекцию клеток НЕК293Т проводили с помощью трансфекционного реагента Mirus TransIT-LT1 (“Mirus Bio”, США) согласно инструкции производителя.

За день до трансфекции 4×10^4 клеток высевали на 24-луночный планшет (“Corning-Costar”, США) таким образом, чтобы на следующий день монослой клеток составлял 50–70%.

Трансфекционный реагент (2–8 мкл на 1 мкг ДНК) инкубировали 15 мин в среде DMEM (“Sigma-Aldrich”, США), затем добавляли 1 мкг плазмиды, тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Тем временем культуральную жидкость заменяли на свежую среду с сывороткой, после чего на клетки по капле наносили смесь TransIT-LT1/ДНК и оставляли в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Через 48 ч после трансфекции клетки трижды отмывали фосфатным буфером (ФБ): 50 мМ фосфат калия, рН 7.2, 150 мМ NaCl. Затем их снимали механически с помощью скребка (“Falcon”, США), переносили в 1.7-мл стерильную пластиковую пробирку и промывали еще 2 раза ФБ. Клетки суспендировали в буфере для лизиса (50 мМ Трис-HCl, рН 8.0, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 5 мМ ЭДТА), содержащем ингибитор протеолиза Complete (“Roche”, Германия) и оставляли на 10 мин на льду. Полученный лизат осветляли при 10000 об/мин в течение 10 мин и собранный супернатант хранили при температуре –70°C.

Для анализа секреции белков трансфекцию клеток НЕК293Т проводили в среде с 10%-ным искусственным заменителем сыворотки Lifo (“Lifo-a-cell”, США). Через 48 ч после трансфекции культуральную жидкость собирали, центрифугировали при комнатной температуре 5 мин при 3000 об/мин, а затем еще 10 мин при 10000 об/мин, после чего культуральную жидкость фильтровали через мембрану с диаметром пор 0.22 мкм (“Schleicher & Schuell”, Германия) и концентрировали, используя колонки Vivaspin Δ30 кДа (“Sartorius”, США). Культуральные жидкости анализировали на наличие AFP методом иммуноблоттинга.

Электрофорез в ПААГ и иммуноблоттинг. Лизаты трансфицированных клеток анализировали методом электрофореза в градиентном 4–20% SDS-ПААГ Invitrogen Novex Tris-Glycine Gel (“Invitrogen”) на приборе Xcell SureLock Mini-Cell той же фирмы при напряжении 125 В в течение 90 мин.

При переносе белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (“BioRad”, США) использовали ком-

мерческий Трис-глициновый буфер (“Invitrogen”), содержащий 20% метанола. Перенос проводили на приборе Xcell II Blot Module (“Invitrogen”) при напряжении 45 В в течение 1.5–2 ч при 4°C. Эффективность переноса белков контролировали, окрашивая мембрану 0.1%-ным раствором Ponceau S (“Sigma”) в 1%-ной уксусной кислоте.

Затем мембрану инкубировали в течение ночи в блокирующем буфере (ФБ, содержащий 6% обезжиренного молока и 0.1% Твин-20), а после этого в течение 90 мин с поликлональной сывороткой кролика к AFP (“Abcam”, Великобритания) в разведении 1 : 500. Мембрану отмывали 5 раз по 5 мин в ФБ с 0.1% Твин-20 и инкубировали 90 мин с козьими анти-кроличьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (“Dako”, Дания), взятыми в разведении 1 : 5000 в блокирующем буфере. Мембрану отмывали 5 раз по 5 мин в ФБ с 0.1% Твин-20 и проявляли, используя набор ECL (“GE Healthcare”, Великобритания) и рентгеновскую пленку CL-Xposure X-ray film (“Thermo scientific”, США).

Количество нанесенного на гель тотального белка (для нормализации сигнала) определяли следующим образом: после проявки ECL мембрану отмывали от антител с помощью ФБ с 2% SDS и 0.07% β-меркаптоэтанола при 42°C в течение 30 мин, затем отмывали 30 мин в ФБ при комнатной температуре. Далее инкубировали с моноклональными мышинными антителами против β-актина (“Sigma-Aldrich”, США) или тубулина (“Dako”) в разведении 1 : 5000, после чего мембраны отмывали и инкубировали со вторичными кроличьими анти-мышинными антителами, мечеными пероксидазой хрена (“Dako”), в разведении 1 : 5000. Мембраны проявляли, как описано ранее.

Изучение протеасомной деградации белков и их стабильности. Эффективность протеасомной деградации рекомбинантных белков оценивали с помощью ингибитора протеасомы MG132 (“Sigma-Aldrich”). Через 30 ч после трансфекции в культуральную жидкость клеток НЕК293Т добавляли ингибитор MG132 до концентрации 5 мкМ и инкубировали клетки еще 18 ч. Затем клетки лизировали и полученные лизаты анализировали методом электрофореза в SDS-ПААГ и иммуноблоттингом.

Стабильность рекомбинантных белков в клетках и период полураспада оценивали методом ингибирования трансляции с помощью циклогексимида (“Sigma-Aldrich”). Для этого через 48 ч после трансфекции в культуральную жидкость клеток НЕК293Т вносили циклогексимид 100 мкг/мл. Сразу после добавления ингибитора, а также через 2, 4 и 6 ч клетки снимали, лизировали и полученные лизаты анализировали методом иммуноблоттинга.

Анализ накопления рекомбинантных белков проводили, используя двойное ингибирование. Через 30 ч после трансфекции в культуральную жидкость клеток НЕК293Т добавляли MG132, а еще через 18 ч – циклогексимид. Клетки снимали сразу,

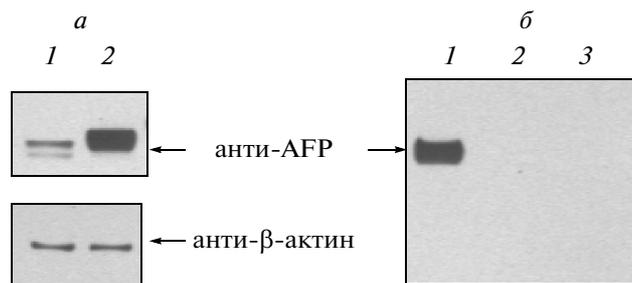


Рис. 1. Вестерн-блот анализ экспрессии и секреции Δ AFP: *a* – в лизатах клеток HEK293T, трансфицированных р Δ AFP (1) или рAFP (2), сигнал нормировали по β -актину с использованием соответствующих антител; *б* – в культуральной жидкости клеток HEK293T, трансфицированных рAFP (1) или р Δ AFP (2), и нетрансфицированных (3).

через 2, 4 и 6 ч после добавления второго ингибитора, лизировали и анализировали, как описано выше.

Компьютерные программы. В работе для анализа нуклеотидных последовательностей и построения физических карт плазмид, а также комплексного анализа вторичной структуры С-концевых участков химерных белков применен пакет программ DNASTar: Seqman, EditSeq, MegaAlign, Protean (“Lasergene”, США). Кроме того, для определения профиля гидрофобности С-конца полученных белков использована программа ProtScale ExPASy Proteomics server (“Swissprot”, Швейцария). Изменения, вносимые аминокислотными заменами во вторичную структуру белка, оценивали также с помощью программы Jpred (“University of Dundee”, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение экспрессионных векторов и анализ рекомбинантных белков

Прежде, чем приступить к анализу белков с модифицированными С-концами, был создан базовый вектор с делетированным N-концевым экспортационным сигналом – р Δ AFP.

Уровень экспрессии Δ AFP в клетках HEK293T, трансфицированных р Δ AFP, оказался ниже, чем уровень экспрессии AFP дикого типа, транскрибируемого с вектора рAFP (рис. 1а).

На следующем этапе проведена оценка уровня секреции AFP из трансфицированных клеток. Наличие в культуральной среде фетальной бычьей сыворотки (ФБС) с большим содержанием (~6.5 мг/мл) родственного AFP альбумина затрудняло анализ секреции AFP и модифицированных белков. Поэтому вместо ФБС мы использовали среду, содержащую 10% искусственного заменителя сыворотки Lifo. Перед исследованием секреции белков культуральную жидкость дважды центрифугировали, после чего фильтровали через мембрану с диаметром пор 0.22 мкм и концентрировали в 5 раз, используя колонки Vivaspin Δ 30. Как показано вестерн-блот анализом, в культуральную жидкость трансфицированных клеток, выращенных на среде

без ФБС, эффективно секретируется только AFP дикого типа (рис. 1б).

Создание векторов, экспрессирующих модифицированный по С-концу Δ AFP

С помощью сайт-направленного мутагенеза в конструкцию р Δ AFP вводили нуклеотидные замены, обеспечивающие воссоздание на С-конце Δ AFP аминокислотных остатков, необходимых для нормального функционирования деградационного сигнала ОДК [10]. Таким способом был получен вектор р Δ AFPCAG, экспрессирующий белок, содержащий на С-конце ключевые аминокислоты ОДК-дегрона: Cys554, Ala555 и Gly556 (позиции 18, 19 и 20 от С-конца Δ AFP соответственно); при этом мутация Glu554Cys соответствовала Cys441 в ОДК-дегрене, Val555Ala – Ala442, а Cys556Gly – Gln443. Следует отметить, что третью мутацию вводили как дополнительную – для обеспечения оптимальной конформации полученного мотива. С целью усиления деградационного сигнала, в соответствии с данными Такеучи (Takeuchi) и др. [10], в р Δ AFPCAG введены дополнительные нуклеотидные замены, приводящие к мутации Ala550Leu в позиции 24 от С-конца Δ AFPCAG, и полученный вектор назван р Δ AFPLCAG, правильность нуклеотидной последовательности которого подтверждена двунаправленным сиквенсом (рис. 2).

Анализ вероятных изменений структуры С-концевых областей модифицированных белков

С помощью программ ProtScale, Jpred и DNASTar-Protean проведен сравнительный анализ вторичной структуры С-концевых областей белков Δ AFP, Δ AFPCAG и Δ AFPLCAG. С помощью программ ProtScale и DNASTar-Protean показано, что С-концевые участки белков Δ AFPCAG и Δ AFPLCAG несколько более гидрофобны, чем у Δ AFP. На рис. 3 представлены профили гидрофобности С-концевых участков трех белков и, как можно видеть, различия в них (I) столь незначительны, что ими можно пренебречь.

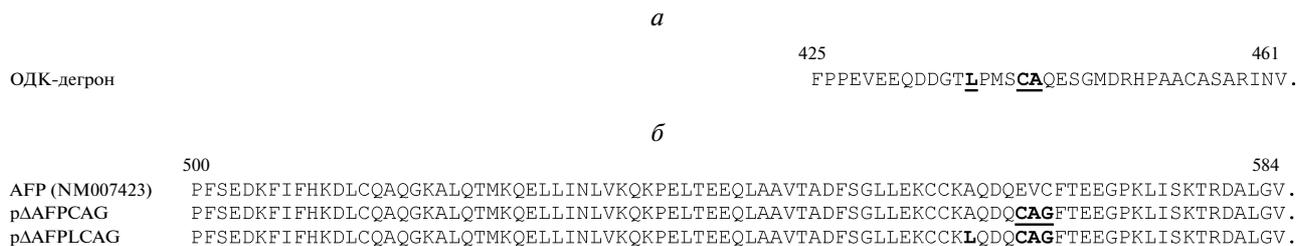


Рис. 2. Аминокислотное выравнивание С-концевых последовательностей ОДК, AFP и модифицированных вариантов ΔAFP. *a* – Деградиционный сигнал ОДК; подчеркнуты аминокислотные остатки, которые считаются ключевыми в составе дегрона. *б* – С-концевые последовательности AFP дикого типа и мутантных вариантов; подчеркнуты аминокислотные остатки, введенные сайт-направленным мутагенезом.

С целью оценить возможные различия во вторичных структурах С-концевых областей этих белков мы использовали приложения Jpred и Protean. В результате проведенного анализа выявлено небольшое нарушение структуры С-концевых α-спиралей в белках ΔAFPCAG и ΔAFPLCAG по сравнению с ΔAFP (рис. 3, II).

Среди предполагаемых изменений наиболее значительное различие между ΔAFP и модифицированными белками может быть связано с различной экспонированностью анализируемой области (III). Однако предсказанные иммунологические характеристики, в частности антигенные детерминанты этого района (IV), практически одинаковы для трех белков, что косвенно свидетельствует об отсутствии существенных изменений с точки зрения доступности этой области для взаимодействия с другими молекулами. Результаты моделирования вторичной структуры ΔAFP и модифицированных белков с помощью программы Jpred в целом соответствовали тем, которые описаны выше.

Кинетический анализ деградации белков ΔAFPLCAG, ΔAFPCAG и ΔAFP

С целью сравнить динамику накопления ΔAFP и белков с измененным С-концом в трансфицированных клетках мы проанализировали кинетику их деградации. В анализе использованы ингибитор протеасомы MG132, а также ингибитор трансляции циклогексимид.

На первом этапе оценивали период полураспада базового белка ΔAFP, используя следующую процедуру: клетки HEK293T трансфицировали вектором рΔAFP и, спустя 48 ч, в культуральную жидкость добавляли циклогексимид; клетки снимали с подложки через 2, 4 и 6 ч, лизировали и определяли количество ΔAFP методом иммуноблоттинга. Так оценили стабильность ΔAFP в трансфицированных клетках в присутствии циклогексимид (рис. 4*a*). После добавления ингибитора количество белка в клетках практически не изменялось на протяжении 6 часов. Более того, значительной разницы в накоплении ΔAFP в лизатах трансфицированных клеток, обработанных MG132 и контрольных (не обработанных ин-

гибитором протеасомы), также не выявлено (рис. 4*б*, 1 и 2).

Затем, с целью более детального понимания механизма стабильности ΔAFP, в клетках HEK293T трансфицированных вектором рΔAFP, анализировали накопление целевого белка в присутствии двух ингибиторов: MG132 и циклогексимид. В результате такого эксперимента зарегистрировано некоторое уменьшение количества белка в лизатах клеток. Период полураспада ΔAFP в таких условиях составлял около 6–8 ч (рис. 4*б*, 3–5). Вероятно, в данном случае ускорение деградации связано с усилением общего цитотоксического действия ингибиторов.

На втором этапе проведен сравнительный анализ стабильности белков, экспрессируемых с модифицированных конструкций, с использованием ингибитора протеасомы. Как видно из рис. 5, существенных различий в уровнях накопления ΔAFPLCAG, ΔAFPCAG и ΔAFP в присутствии и в отсутствии MG132 нет.

На третьем этапе мы провели заключительный эксперимент. Трансфицированные плазмидами клетки оставляли в присутствии ингибитора трансляции на 30 ч, в результате чего количество всех трех белков в клеточных лизатах уменьшалось, причем одинаково. Это дополнительное свидетельство в пользу отсутствия различий между скоростями их деградации (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Протеасомная деградация – один из фундаментальных процессов в клетке, обеспечивающий поддержание клеточного гомеостаза. Целенаправленной протеасомной деградации большинства клеточных белков предшествует их полиубквитинирование, которое обеспечивает распознавание субстрата протеасомой. Однако существует ряд белков, использующих принципиально другие механизмы. Так, выявлены белки, имеющие особые деградиционные сигналы, которые, как предполагают, могут структурно напоминать убиквитин [14, 15]. Такие белки могут связываться со специфическими кофакторами, которые облегчают распознавание образовав-

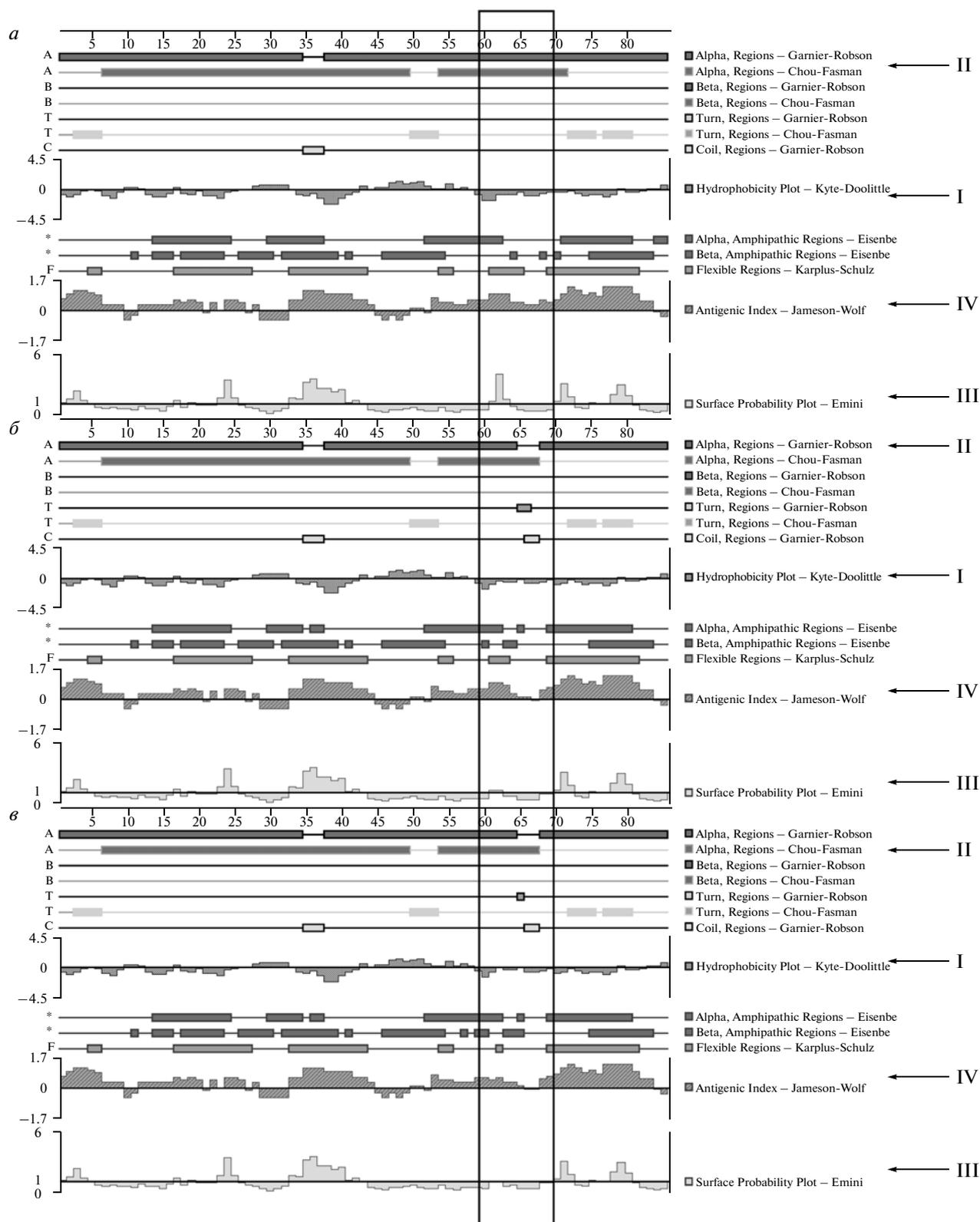


Рис. 3. Результаты развернутого компьютерного анализа С-концевых областей: *a* – AFP, *б* – Δ AFP CAG и *в* – Δ AFP L CAG. Рамкой выделена область аминокислотных замен, а также использованы следующие условные обозначения: I – предсказанный профиль гидрофобности; II – предсказанные α -структуры; III – вероятность экспонирования области на поверхности белка; IV – предсказанный профиль антигенности.

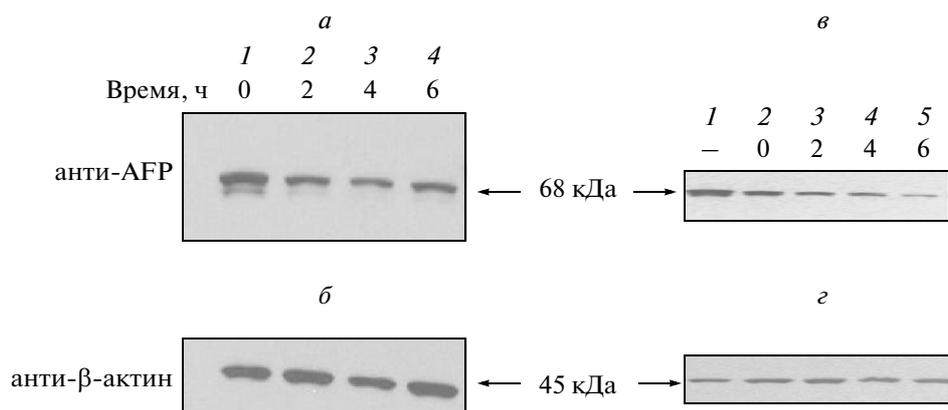


Рис. 4. Анализ кинетики деградации Δ AFP. *a* – Вестерн-блот анализ стабильности Δ AFP в трансфицированных клетках, находившихся под действием ингибитора трансляции циклогексимида 2, 4 или 6 ч соответственно; *б* – для нормализации сигнала мембрана отмывта от антител к AFP и проинкубирована с иммуноглобулинами к β -актину. *в* – Иммуноблоттинг лизатов трансфицированных р Δ AFP клеток HEK293T (1), находившихся под действием ингибитора протеасомы MG132 (2); находившихся под действием как MG132, так и циклогексимида в течение 2, 4, 6 ч (соответственно 3, 4, 5); *з* – для нормализации сигнала мембрана проинкубирована с антителами к β -актину.

шегося комплекса 26S протеасомой [3]. Один из таких белков – ОДК, короткоживущий регуляторный белок мышей. ОДК – ключевой компонент в клеточной системе синтеза полиаминов, деградирующий в протеасоме по убиквитин-независимому пути [3]. На С-конце молекулы ОДК находится последовательность из 37 аминокислот, представляющая собой деградационный сигнал [4]. Однако точная кристаллографическая структура С-конца ОДК на сегодняшний день не известна [16, 17]. В составе

этого сигнала идентифицированы аминокислотные остатки, Cys441 и Ala442, мутации которых приводят к стабилизации молекулы ОДК. Более того, показано, что эффективность деградационного сигнала зависит от местоположения этих аминокислот; точнее – от их расположения относительно С-конца белка, которое, по данным авторов, составляет 20 аминокислот [8–10].

Известно, что добавление деградационного сигнала ОДК, а также полноразмерного ОДК к С-концу различных белков приводит к их быстрой протеасомной деградации [5, 18]. С целью изучить влияние деградационного сигнала ОДК, введенного в состав других белков, на их протеасомальную деградацию, мы использовали в качестве модели белок AFP, а для введения целенаправленных мутаций – вектор, содержащий ген AFP мышей (*mAFP*). Мы предполагали, что при удалении экспортационного сигнала AFP и модификации его С-конца по типу С-конца ОДК, скорость деградации полученного модифицированного белка увеличится. В этом случае изменения, произошедшие в скорости деградации AFP, могут коренным образом повлиять на иммунный ответ (путем смещения его в сторону клеточного), развивающийся после введения животным ДНК-вакцины, кодирующей ген *AFP*. В этом случае следовало учитывать еще один важный момент – модификации не должны вносить изменений во вторичную структуру (конформацию) белка.

В результате проведенных исследований показано, что при удалении N-концевого экспортационного сигнала AFP секреции Δ AFP не происходит, а эффективность экспрессии остается на сопоставимом уровне. Затем с помощью сайт-направленного мутагенеза в области 3'-конца гена AFP произведены нуклеотидные замены, которые позволили воссоздать ключевой аминокислотный мотив ОДК-де-

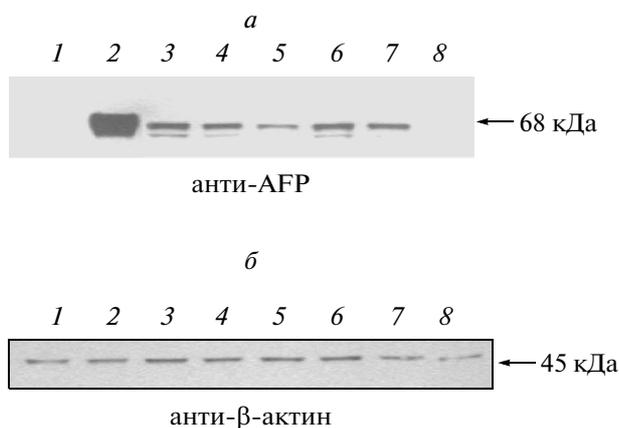


Рис. 5. Анализ протеасомной деградации белков с измененным С-концом. *a* – Иммуноблоттинг лизатов HEK293T клеток: нетрансфицированных (1), трансфицированных рAFP (2), р Δ AFP (3), р Δ AFPСAG (4); находившихся под действием ингибитора MG132, трансфицированных р Δ AFPСAG (5); трансфицированных р Δ AFPPLСAG (6); находившихся под действием ингибитора MG132, трансфицированных р Δ AFPСAG (7); трансфицированных контрольным вектором рСDNA3.1(-) (8). *б* – Сигнал нормирован по β -актину с использованием соответствующих антител.

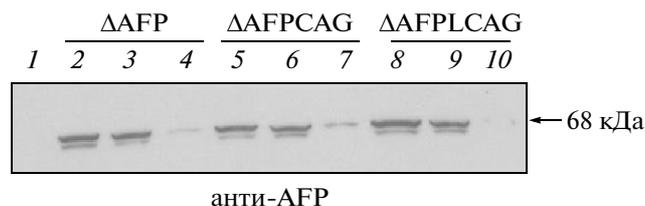


Рис. 6. Анализ стабильности Δ AFP, Δ AFPCAG и Δ AFPLCAG. Иммуноблоттинг лизатов НЕК293Т клеток: нетрансфицированных (1), трансфицированных р Δ AFP, р Δ AFPCAG или р Δ AFPLCAG (2, 5 и 8 соответственно); трансфицированных р Δ AFP, р Δ AFPCAG или р Δ AFPLCAG и проинкубированных с MG132 (3, 6 и 9 соответственно); трансфицированных р Δ AFP, р Δ AFPCAG или р Δ AFPLCAG и проинкубированных 30 ч с циклогексимидом (4, 7 и 10 соответственно).

грона (указанный в работе Такеучи и соавт. [10]) на С-конце Δ AFP. Так были сконструированы векторы, кодирующие белки Δ AFPCAG и Δ AFPLCAG.

Интересно отметить, что анализ кинетики деградации белков, экспрессированных с полученных конструкций, не подтвердил нашей гипотезы: скорость деградации полученных модифицированных белков — без лидерной последовательности, с целенаправленно измененным С-концом — не отличалась от скорости деградации Δ AFP. Мы предполагаем, что причиной отсутствия влияния ключевых аминокислот ОДК-дегрона в составе Δ AFP на его деградацию может быть другая, по сравнению с ОДК, трехмерная структура С-конца AFP. Например, С-конец может быть “закрыт”, т.е. недостаточно экспонирован для взаимодействия с протеасомой. Кроме того, мы не исключаем наличия дополнительного, не установленного пока, структурного элемента в составе ОДК-дегрона (и потому не воспроизведенного в составе представленных конструкций), оказывающего сильное влияние на скорость и направленность деградации. Таким образом, на основании полученных результатов можно утверждать, что наличие выявленных ранее [10] ключевых аминокислот и их расположение относительно С-конца ОДК представляется необходимым, но недостаточным условием для эффективной “работы” деградационного сигнала ОДК в контексте AFP.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hershko A., Ciechanover A. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 761–807.
- Goldberg A.L. 1992. The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.* **205**, 9–23.
- Murakami Y., Matsufuji S., Kameji T., et al. 1992. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature.* **360**, 597–599.
- Ghoda L., van Daalen Wetters T., Macrae M., et al. 1989. Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl terminal truncation. *Science.* **243**, 1493–1495.
- Starodubova E., Boberg A., Litvina M., et al. 2008. HIV-1 reverse transcriptase artificially targeted for proteasomal degradation induces a mixed Th1/Th2-type immune response. *Vaccine.* **26**, 5170–5176.
- Hoyt M.A., Zhang M., Coffino P. 2003. Ubiquitin-independent mechanisms of mouse ornithine decarboxylase degradation are conserved between mammalian and fungal cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 12135–12143.
- DeScenzo R.A., Minocha S.C. 1993. Modulation of cellular polyamines in tobacco by transfer and expression of mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Mol. Biol.* **22**, 113–127.
- Miyazaki Y., Matsufuji S., Murakami Y., Hayashi S. 1993. Single amino acid replacement is responsible for the stabilization of ornithine decarboxylase in HMOA cells. *Eur. J. Biochem.* **214**, 837–844.
- Takeuchi J., Chen H., Coffino P. 2007. Proteasome substrate requires association plus extended peptide. *EMBO J.* **26**, 123–131.
- Takeuchi J., Chen H., Hoyt M.A., Coffino P. 2008. Structural elements of ubiquitin-independent proteasome degron of ornithine decarboxylase. *Biochem. J.* **410**, 401–407.
- Татаринов Ю.С. 1964. Обнаружение эмбриоспецифического α -глобулина в сыворотке крови больного первичным раком печени. *Вопр. мед. химии.* **1**, 90–91.
- Abelev G.I. 1971. Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.* **14**, 295–357.
- Brock D.J.H., Sutcliffe R.G. 1972. Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet.* **2**, 197–194.
- Zhang M., Pickart C.M., Coffino P. 2003. Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, an ubiquitin-independent substrate. *EMBO J.* **22**, 1488–1496.
- Hoyt M.A., Coffino P. 2004. Ubiquitin-free routes into the proteasome. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 1596–1600.
- Kern A.D., Oliveira M.A., Coffino P., Hackert M.L. 1999. Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Structure.* **7**, 567–581.
- Almud J.J., Oliveira M.A., Kern A.D., et al. 2000. Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *J. Mol. Biol.* **295**, 7–16.
- Стародубова Е.С., Исагулянц М.Г., Карпов В.Л. 2006. Искусственное увеличение скорости утилизации обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека типа 1 по протеасомному пути. *Молекуляр. биология.* **40**, 885–890.