

УДК 577.2+577.29+57.021

## ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ PSMD11 И ДРУГИХ БЕЛКОВ ПРОТЕАСОМЫ С УРОВНЕМ ИНАКТИВАЦИИ РИБОСОМ РИЦИНОМ И ВИСКУМИНОМ

© 2020 г. Д. В. Мальцева<sup>1,2,3,\*</sup>, М. П. Райгородская<sup>2</sup>, О. В. Тихонова<sup>4</sup>,  
Е. Н. Князев<sup>1,\*\*</sup>, Е. А. Тоневицкий<sup>5</sup>

Представлена академиком РАН А. В. Лисицей

Поступило 23.03.2020 г.

После доработки 25.03.2020 г.

Принято к публикации 27.03.2020 г.

В работе исследовалась роль белков протеасомы и системы ERAD в цитотоксичности рибосом-инактивирующих белков второго типа рицина и вискумина. Для этого использовали клеточную линию колоректальной аденокарциномы HT29 и полученную на ее основе линию HT29-sh002 с измененной экспрессией этих белков клетки. Было показано, что вклад протеасомы в деградацию каталитических А-субъединиц рицина и вискумина различен. Регуляторная субъединица протеасомы PSMD11, по-видимому, играет в этом процессе значимую роль. Кроме того, ко-шаперон Cdc37 поддерживает стабильности А-субъединицы вискумина в цитоплазме.

*Ключевые слова:* Cdc37, ERAD, HT29, MLI, PSMD11, вискумин, деградация, протеасома, рибосом-инактивирующий белок, рибин

**DOI:** 10.31857/S2686738920040137

Особенность рибосом-инактивирующих белков второго типа (РИБ-II) – наличие А- и В-субъединиц, соединенных дисульфидной связью [1].

*Список сокращений:* ERAD – системы контроля качества белков, ассоциированная с ЭПР, RTA – А-субъединица рицина, VTA – А-субъединица вискумина, ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией продукта в режиме реального времени, РИБ – рибосом-инактивирующий белок второго типа, ЭПР – эндоплазматический ретикулум

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Научно-технический центр “БиоКлиникум”, Москва, Россия

<sup>3</sup> Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича”, Москва, Россия

<sup>5</sup> Фонд развития инновационного научно-технологического центра “Долина Менделеева”, Москва, Россия

\*e-mail: dmaltseva@gmail.com

\*\*e-mail: knyazevevg@gmail.com

В-субъединица, обеспечивает связывание РИБ-II с мембраной клетки и проникновение путем ретроградного транспорта в эндоплазматический ретикулум (ЭПР). А-субъединица обеспечивает токсическое действие РИБ-II, обладает каталитической N-гликозидазной активностью и необратимо модифицирует рибосомы. Для осуществления токсического действия, в ЭПР должно произойти восстановление дисульфидной связи, соединяющей субъединицы. При этом, происходит частичное разворачивание А-субъединицы и увеличение гидрофобности белковой глобулы, что служит сигналом для ее транслокации через мембрану ЭПР с помощью системы ERAD – системы контроля качества белков, ассоциированной с ЭПР [1–3]. Деградация системой ERAD частично несвернутых белков, эндогенных для ЭПР, включает следующие основные этапы: 1) обнаружение и сортировка, 2) транслокация через мембрану ЭПР и перенос белка в цитоплазму, 3) деградация с помощью протеасомы. А-субъединицы РИБ-II, в отличие от эндогенных белков, после транслокации в цитоплазму способны обратное сворачиваться и, таким образом, избежать деградации в протеасоме [1]. Цитотоксическое действие РИБ-II во многом определяется эффективностью этого процесса, а также временем жизни каталитически активной вновь свернутой А-субъединицы в цитоплазме [4].

**Таблица 1.** Изменение экспрессии белков в клетках линии HT29-sh002 по сравнению с линией HT29

Обозначение белка	Изменение экспрессии белка, разы*
Adrm1	2.5
Cdc37 (p50)	2.6
PSMD6	2.1
PSMD11	9.1

\* Для всех указанных значений FDR  $p$ -value < 0.05.

В настоящей работе исследовалось влияние изменения экспрессии белков, вовлеченных в процесс деградации белков системой ERAD, на цитотоксичность ризицина и вискумина. Данные РИБ-II являются структурными гомологами и обладают одинаковым механизмом действия [5, 6]. Несмотря на то, что А-субъединицы ризицина (RTA) и вискумина (VTA) характеризуются близкой каталитической активностью [7], эффективность токсического действия ризицина и вискумина значительно различается [8–10]. По-видимому, это обусловлено различием стабильности белковых глобул RTA и VTA и способностью их развернутых полипептидных цепей обратно сворачиваться в каталитически активную форму после транслокации в цитоплазму [3]. Нами была получена модификация линии колоректальной аденокарциномы HT29 (HT29-sh002) [11]. Анализ протеома, проведенный в соответствии с методикой описанной в [11], выявил в клетках данной линии изменение экспрессии ряда белков, вовлеченных в ERAD-ассоциированную деградацию, включая белки протеасомы (табл. 1). Из них наибольшее увеличение экспрессии детектировалось для регуляторной субъединицы протеасомы PSMD11. Ранее было показано, PSMD11 игра-

ет ключевую роль в сборке 26S протеасомы, а нокдаун гена этого белка повышает чувствительность клеток к ризицину [12]. Таким образом, увеличение экспрессии PSMD11, а также других компонент протеасомы, должно приводить к снижению чувствительности клеток к ризицину.

Преимуществом работы с РИБ-II является возможность количественной оценки доли специфически инактивированных ими рибосом с помощью ПЦР-РВ, по методу, разработанному нами ранее [9]. Появление инактивированных рибосом является прямым свидетельством попадания каталитически активных А-субъединиц РИБ-II в цитоплазму. Клетки исследуемых линий обрабатывались ризицином или вискумином в течение 1 ч. После этого среду отбирали, клетки промывали и дополнительно инкубировали в среде без РИБ-II в течение 1 ч. Затем клетки лизировали, выделяли РНК, оценивали качество и количество образцов РНК, и проводили детекцию доли инактивированных рибосом в соответствии с работами [9, 13]. Действительно, как предполагалось, в клетках линии HT29-sh002 для всех используемых концентраций ризицина доля инактивированных рибосом была ниже по сравнению с исходной линией HT29 (табл. 2).

Однако, при обработке вискумином, доля инактивированных рибосом в клетках HT29-sh002 оказалась, наоборот, выше, чем в клетках HT29 (табл. 2). В отличие от ризицина, для которого была показана 26S протеасом-зависимая деградация RTA [1], про деградацию VTA в настоящий момент известно мало. Полученные результаты указывают на то, что в деградации VTA 26S протеасома играет менее важную роль по сравнению с RTA. Это согласуется с отсутствием в аминокислотной последовательности VTA лизинов [3].

**Таблица 2.** Инактивация рибосом вискумином и ризицином в клетках HT29 и HT29-sh002

РИБ-II, М	Доля инактивированных рибосом, %*		Отношение доли инактивированных рибосом в клетках HT29-sh002 и HT29**
	HT29	HT29-sh002	
Вискумин			
$1 \times 10^{-9}$	<0.001	0.003	3.0 (↑)
$1 \times 10^{-8}$	0.02	0.075	3.7 (↑)
$1 \times 10^{-7}$	0.4	1.5	3.7 (↑)
Ризицин			
$1 \times 10^{-9}$	0.8	0.05	16.0 (↓)
$1 \times 10^{-8}$	6.1	0.6	10.2 (↓)
$1 \times 10^{-7}$	30	6.0	5.0 (↓)

\* Для всех указанных значений погрешность определения (SD) не превышала 10%.

\*\* Стрелка указывает на направление изменения доли инактивированных рибосом в клетках HT29-sh002 по сравнению с HT29.

Увеличение доли инактивированных VTA рибосом в клетках HT29-sh002, может быть связано с увеличением экспрессии ко-шаперона Cdc37 (табл. 1). Последний принимает участие в сворачивании белков шапероном Hsp90 и поддержании их стабильности в цитоплазме [14, 15]. Cdc37 может способствовать более эффективному рефолдингу VTA после транслокации в цитоплазму, а также поддерживать ее стабильность между каталитическими актами при взаимодействии с рибосомами.

Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что, для VTA деградация 26S протеасомой, по-видимому, менее характерна, по сравнению с RTA. В случае RTA уровень экспрессии регуляторной субъединицы протеасомы PSMD11, по-видимому, имеет в этом процессе важное значение. Роль убиквитин-независимой деградации А-субъединиц рибосомы 20S протеасомой требует дополнительных исследований.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Исследование протеома проводилось с использованием оборудования Центра коллективного пользования "Протеом человека" (ИБМХ).

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 17-14-01338).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nowakowska-Gołacka J., Sominka H., Sowa-Rogozjińska N., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 6. P. 1307.
2. Agapov I.I., Tonevitsky A.G., Maluchenko N.V., et al. // *FEBS Lett.* 1999. V. 464. № 1–2. P. 63–66.
3. Volynsky P.E., Nolde D.E., Zakharova G.S., et al. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 413.
4. Cherubin P., Quiñones B., Teter K. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 2494.
5. Agapov I.I., Tonevitsky A.G., Moysenovich M.M., et al. // *FEBS Lett.* 1999. V. 452. № 3. P. 211–214.
6. Moisenovich M., Tonevitsky A., Maljuchenko N., et al. // *Histochem. Cell Biol.* 2004. V. 121. № 6. P. 429–439.
7. Tonevitsky A.G., Agapov I.I., Shamshiev A.T., et al. // *FEBS Lett.* 1996. V. 392. № 2. P. 166–168.
8. Moisenovich M., Tonevitsky A., Agapov I., et al. // *Eur. J. Cell Biol.* 2002. V. 81. № 10. P. 529–538.
9. Nikulin S.V., Mnaflki N.A., Shilin S.A., et al. // *Mol. Biol.* 2018. V. 52. № 4. P. 583–589.
10. Maltseva D.V., Krainova N.A., Khaustova N.A., et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. V. 163. № 4. P. 451–455.
11. Maltseva D.V., Raigorodskaya M.P., Tsygina I.M., et al. // *Biotekhnologiya.* 2019. V. 35. № 6. P. 3–11.
12. Bassik M.C., Kampmann M., Lebbink R.J., et al. // *Cell.* 2013. V. 152. № 4. P. 909–922.
13. Khaustova N.A., Maltseva D.V., Oliveira-Ferrer L., et al. // *Biochimie.* 2017. V. 142. P. 197–206.
14. Li T., Jiang H.-L., Tong Y.-G., et al. // *J. Hematol. Oncol.* 2018. V. 11. № 1. P. 59.
15. Maltseva D.V., Ryabenco E.A., Sizova S.V., et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. V. 153. № 6.

## RELATIONSHIP BETWEEN THE EXPRESSION LEVEL OF PSMD11 AND OTHER PROTEASOME PROTEINS WITH THE ACTIVITY OF RICIN AND VISCUMIN

D. V. Maltseva<sup>a,b,c,#</sup>, M. P. Raigorodskaya<sup>b</sup>, O. V. Tikhonova<sup>d</sup>, E. N. Knyazev<sup>a,##</sup>, and E. A. Tonevitsky<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Scientific Research Center Bioclinicum, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

<sup>e</sup> Development Fund of the Innovation Science and Technology Center "Mendeleev Valley", Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: dmaltseva@gmail.com

<sup>##</sup>e-mail: knyazevevg@gmail.com

Presented by Academician of the RAS A.V. Lisitsa

**Abstract** — The role of proteasome proteins and proteins of the ERAD system in the cytotoxicity of type II ribosome-inactivating proteins ricin and viscumin was investigated. For this, the cell line of colorectal adenocarcinoma HT29, as well as the HT29-sh002 line obtained on its basis, were used. Based on the proteome analysis of these lines and the estimation of proportion of inactivated ribosomes, it was shown that the contribution of the proteasome to the degradation of the catalytic subunits of toxins is different. The role of Cdc37 co-chaperone in maintaining the stability of A subunit of viscumin in the cytoplasm is shown.

**Keywords:** Cdc37, ERAD, HT29, MLI, PSMD11, degradation, proteasome, ribosome inactivating protein, ricin, viscumin