

0-775706

На правах рукописи

Карпов Дмитрий Сергеевич

**ФУНКЦИОНАЛЬНО ВАЖНЫЕ УЧАСТКИ RPN4 –
АКТИВАТОРА ТРАНСКРИПЦИИ ПРОТЕАСОМНЫХ ГЕНОВ**

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2009

Работа выполнена в Лаборатории структуры и функций хроматина Учреждения Российской академии наук Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Карпов Вадим Львович

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор, Рязин Сергей Владимирович
член-корреспондент РАН

Кандидат биологических наук Эльдаров Михаил Анатольевич

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Защита состоится «14» апрель 2009 года в 11⁰⁰ час на заседании диссертационного совета Д 002.235.01 при Учреждении Российской академии наук Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д.32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИМБ РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, 32.

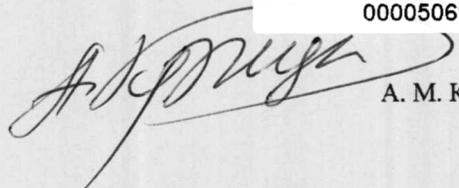
Автореферат разослан «13» марта 2009 года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат химических наук

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000506965


А. М. Крицын

Актуальность проблемы

Содержание белков в клетке обусловлено динамическим равновесием между процессами их синтеза и деградации. У эукариот за протеолиз основной массы белков отвечает высокоселективная убиквитин-протеасомная система. Эта система состоит из комплекса ферментов, осуществляющих узнавание белковых субстратов и ковалентное присоединение к ним полиубиквитина, и крупного многосубъединичного протеазного комплекса – протеасомы, который узнает полиубиквитинированные белки и расщепляет их до олигопептидов. В протеасоме происходит деградация регуляторных белков, контролирующих все основные клеточные процессы, а также белки с нарушенной структурой. Убиквитин-протеасомная система необходима для нормального функционирования клетки и ее выживания при стрессовых воздействиях. У человека нарушения в работе этой протеолитической системы связаны с возникновением различных онкогенных и нейродегенеративных болезней, а также с нарушением работы иммунной системы.

В настоящее время актуальна проблема исследования регуляции экспрессии протеасомных генов. Однако система координированной регуляции протеасомных генов экспериментально описана пока только у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Система состоит из регуляторного элемента, называемого PACE (Proteasome Associated Control Element) и транскрипционного фактора, Rpn4p, связывающегося с последовательностью PACE. В то же время сам Rpn4p является субстратом протеасомы, поэтому содержание протеасом в клетке, по-видимому, регулируется по принципу отрицательной обратной связи. В настоящее время подробно изучены механизмы деградации Rpn4p в протеасоме, но очень немного известно о механизме действия этого транскрипционного фактора и, прежде всего, не установлены его функционально важные домены.

Цели и задачи исследования

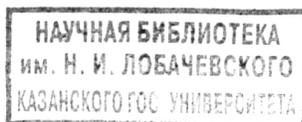
Целью настоящей работы являлось определение функционально важных участков дрожжевого транскрипционного фактора Rpn4p.

Были поставлены следующие задачи:

- 1) получить делеции ряда областей в гене *RPN4* при помощи ПЦР-мутагенеза;
- 2) синтезировать мутантные белки в штамме дрожжей с делецией хромосомной копии гена *RPN4*;
- 3) оценить функциональную активность делеционных производных Rpn4p путем определения содержания мРНК протеасомных генов в дрожжевых клетках;
- 4) проверить наличие ДНК-связывающей активности у мутантных белков;
- 5) определить чувствительность к различным видам стресса дрожжей, синтезирующих мутантные белки.

Научная новизна

Создана модельная система, позволяющая проводить *in vivo* структурно-функциональный анализ Rpn4p, активатора транскрипции протеасомных генов. В этой системе показано, что в зависимости от условий роста клеток для функционирования Rpn4p требуются различные участки. Впервые показано, что кислые активационные домены фактора отличаются по трансактиваторному потенциалу. В N-концевой области Rpn4p обнаружен ранее неизвестный активационный домен, который необходим для функционирования фактора как в нормальных условиях, так и в условиях стресса. Этот домен не гомологичен ни одному из известных активационных доменов транскрипционных факторов и, видимо, регулируется некой модификацией лизинов (возможно убиквитинированием). Впервые показано, что Rpn4p может функционировать не только как транскрипционный фактор, поскольку его мутант без ДНК-связывающих доменов обеспечивает устойчивость клеток к ингибитору трансляции и пероксиду водорода.



Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на 11-й Пушинской конференции молодых ученых (Россия, Пушкино, 2007), на конференции молодых ученых и студентов «Современные проблемы микробиологии и биотехнологии» (Украина, Одесса, 2007), на международной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов, посвященной 120-летию со дня рождения Н. И. Вавилова (Украина, Киев, 2007), на 12-м международном конгрессе «12th International Congress on yeasts» (Украина, Киев, 2008), на VI симпозиуме «Химия протеолитических ферментов» (Россия, Москва, 2007), на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Россия, Новосибирск, 2008). Отдельные фрагменты диссертационной работы докладывались на научных семинарах Лаборатории структуры и функций хроматина ИМБ РАН.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи и 6 тезисов конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 270 источников. Работа изложена на 120 страницах машинописного текста, содержит 19 рисунков и 9 таблиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Rpn4p – позитивный и негативный транскрипционный регулятор убиквитин-протеасомной системы.

Ранее было показано (Mannhaupt *et al.*, 1999), что в модельной системе, в которой промоторы протеасомных генов *RPT6* и *RPT4* сшиты с репортерным геном хлорамфениколацетилтрансферазы, Rpn4p является активатором транскрипции. Наша работа продолжает исследования по изучению механизмов функционирования Rpn4p и сосредоточена на определении функционально важных областей молекулы этого фактора. Схема эксперимента выглядела следующим образом. При помощи ПЦР-мутagenеза в ген *RPN4* вносили делеции интересующих нас участков. Фрагменты ДНК клонировали в дрожжевой экспрессионный вектор под *GAL1* промотор и полученными плазмидами трансформировали дрожжевой штамм с делецией хромосомной копии гена *RPN4*. Синтез мутантных белков индуцировали в селективной среде, содержащей галактозу. Через 6 часов после начала индукции из клеток выделяли тотальную РНК и методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией определяли относительное содержание мРНК протеасомных генов *RPT6*, кодирующий АТФ-азную субъединицу регуляторного комплекса протеасомы и *PRE1*, кодирующий структурную субъединицу протеолитического комплекса. Функциональную активность мутантных белков оценивали по количеству мРНК протеасомных генов. Мутантные белки детектировали методом Вестерн-блоттинга при помощи аффинноочищенных кроличьих поликлональных антител против рекомбинантного Rpn4p. Поскольку протеасома необходима для удаления белков с нарушенной структурой, появляющихся в клетке в условиях стресса, неудивительно, что и Rpn4p также важен для устойчивости клеток к стрессу (Owsianik *et al.*, 2002; Ju *et al.*, 2004; London *et al.*, 2004; Hahn *et al.*, 2006). Устойчивость к стрессу штаммов дрожжей, синтезирующих делеционные производные Rpn4p, проверяли при помощи метода выращивания серийных разведений дрожжевой культуры на чашках Петри. Наконец, наличие ДНК-связывающей активности у мутантных белков определяли при помощи метода фиксации и иммунопреципитации хроматина. Из клеток,

фиксированных формальдегидом, получали лизат, который обрабатывали ультразвуком для дробления хроматина. Сшитые комплексы Rpn4p-ДНК выделяли при помощи поликлональных антител против Rpn4p. ДНК из преципитированного хроматина очищали обработкой протеиназой К с последующей инкубацией при 65°C. ДНК осаждали в этаноле в присутствии гликогена в качестве носителя. Очищенную ДНК анализировали при помощи ПЦР в реальном времени с праймерами на промоторные области протеасомных генов *RPT6* и *PRE1*.

Перед проведением основных экспериментов мы убедились в том, что в дрожжевом штамме с делецией гена *RPN4* снижен уровень содержания мРНК протеасомных генов *RPT4* и *PRE1* (рис.1). В этом эксперименте было показано также, что в мутантном штамме повышен уровень содержания мРНК гена *UBI4*, кодирующего полиубиквитин (рис.2). Полученные результаты указывают на то, что Rpn4p может функционировать как активатор, так и репрессор транскрипции. В нашей работе мы исследовали трансактиваторную функцию Rpn4p.

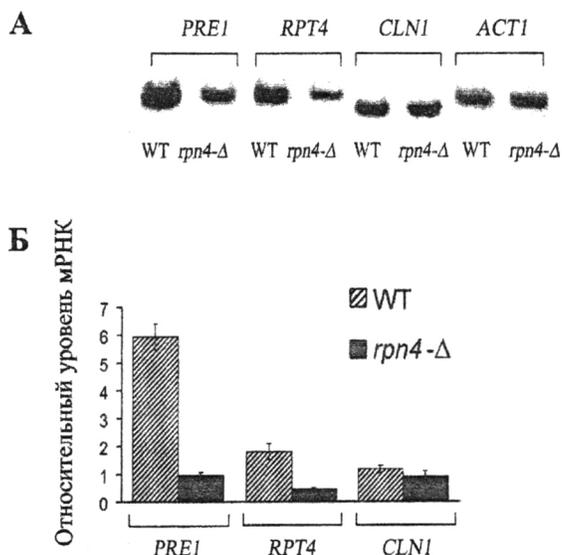


Рис.1. Относительное содержание мРНК протеасомных генов *RPT4* и *PRE1* в штамме *S. cerevisiae* дикого типа и с делецией гена *RPN4* (*rpn4-Δ*). (А) Меченные ^{32}P продукты ОТ-ПЦР, разделенные в полиакриламидном геле. (Б) Результаты количественного анализа радиоактивных сигналов ПЦР-продуктов. Сигналы ПЦР-продуктов протеасомных генов и контрольного гена *CLN1*, который не регулируется Rpn4p (Prinz *et al.*, 2004), нормированы на сигнал ПЦР-продуктов гена *ACT1*. Здесь и 7 далее: WT – штамм дикого типа.

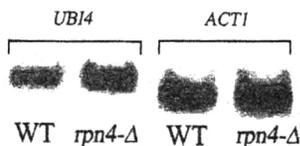
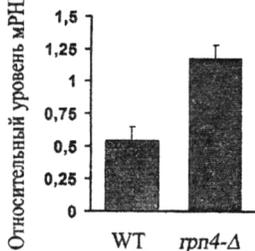
А**Б**

Рис. 2. Относительное содержание мРНК гена *UBI4* в дрожжевых штаммах дикого типа и в мутанте *rpn4-Δ*. (А) Меченные ^{32}P продукты ОТ-ПЦР, разделенные в полиакриламидном геле. (Б) Результаты количественного анализа сигналов от радиоактивных полос ПЦР-продуктов. Сигналы ПЦР-продуктов гена *UBI4* нормированы по сигналу ПЦР-продуктов гена *ACT1*.

Результаты дальнейшей работы для удобства собраны в три группы, характеризующие три условные части Rpn4p: С-концевую область, центральную часть и N-концевую область.

Анализ С-концевой области Rpn4p.

Для функционирования транскрипционных факторов необходимо наличие ДНК-связывающего домена, посредством которого они связываются со специфической последовательностью в промоторной области регулируемых генов. Мотивы двух цинковых пальцев (позиции 477-507 и 444-468), которые, как предполагается, образуют ДНК-связывающий домен Rpn4p, находятся в его С-концевой области (Mannhaupt *et al*, 1999; Mannhaupt and Feldmann, 2007). Помимо способности связываться с ДНК, эукариотические транскрипционные факторы должны обладать сигналами транспорта в ядро. Предполагаемый сигнал ядерной локализации Rpn4p (позиции 381-399) также находится в С-концевой области. На рис.3А представлена схема делеций вышеописанных участков, а также результаты определения общей активности мутантных белков и устойчивости к стрессу дрожжевых клеток, синтезирующих эти белки. Полученные результаты указывают на то, что делеция обоих цинковых пальцев полностью инактивирует Rpn4p, делеция N-

пальца значительно снижает активность белка, в то же время делеция NLS не влияет на активность фактора (рис. 3Б.). Результаты эксперимента по устойчивости клеток к стрессу, вызванному действием метилметансульфоната (MMS) и солями тяжелых металлов, согласуются с полученными данными. В то же время следует отметить, что клетки, синтезирующие Rpn4p без цинковых пальцев, устойчивы к действию циклогексимида, ингибирующего трансляцию, и пероксида водорода.

Потеря активности у мутантов с делециями цинковых пальцев, очевидно, объясняется их неспособностью связываться с промоторными областями протеасомных генов. Отсутствие эффекта при делеции предполагаемого NLS может иметь несколько объяснений: во-первых, Rpn4p может содержать несколько NLS: второй предполагаемый сигнал с последовательностью KNRRK обнаружен в позициях 320-324. Во-вторых, Rpn4p может транспортироваться в ядро с участием протеасомных субъединиц, например, Rpn2p, который может связываться с Rpn4p, имеет функциональный NLS и необходим для транспорта в ядро регуляторного комплекса протеасомы. Какое из объяснений соответствует действительности, остается предметом дальнейших исследований.

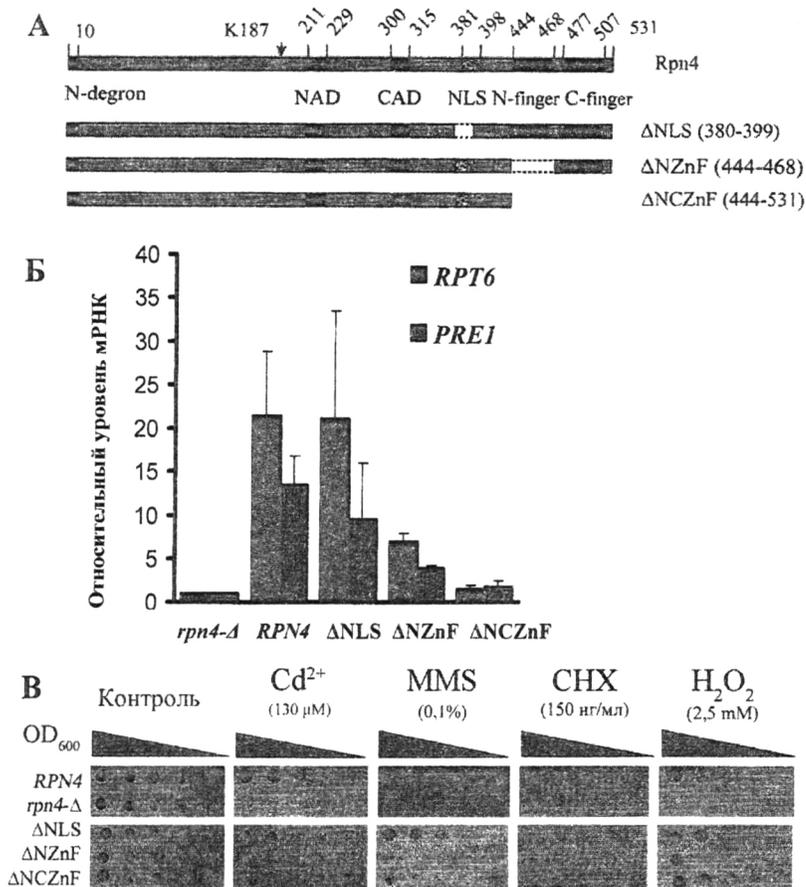


Рис. 3. Анализ влияния делеций в С-концевой области Rpn4p на его активность. (А) Схема делеций в С-концевой области. (Б) Результаты ПЦР в реальном времени по определению относительного содержания мРНК протеасомных генов *RPT6* и *PRE1* в дрожжевых клетках, синтезирующих мутантные формы Rpn4p под контролем *GAL1* промотора. Содержание мРНК в штамме *rpn4-Δ* принято за единицу. Содержание мРНК протеасомных генов нормировано на содержание мРНК гена *PDAl*, который не регулируется Rpn4p (Ju *et al.*, 2004). (В) Устойчивость к стрессу штаммов, синтезирующих делеционные производные Rpn4p (Δ NLS, Δ NZnF, Δ NCZnF). Ночные культуры дрожжей разводили до оптической плотности $OD_{600} = 1$, затем готовили пятикратные разведения. На поверхность агара в чашке Петри, наносили по 3 мкл каждого разведения и инкубировали в течение 2-3 дней при 30°C. В агар на контрольной чашке не добавляли стрессовых агентов, а в опыте в агар добавляли в указанных количествах соли кадмия, MMS-метилметансульфонат, белок- и ДНК-алкилирующий агент, CHX – циклогексимида, ингибитор трансляции и перексид водорода.

Анализ центральной части Rpn4p.

Помимо ДНК-связывающего домена и сигнала ядерной локализации, молекула активатора транскрипции должна содержать активационные домены. Эти участки трансактиватора привлекают к промоторной области гена различные компоненты транскрипционных комплексов, или хроматин-модифицирующих комплексов, которые, изменяя структуру хроматина, привлекают РНК-полимеразу, что в конечном итоге повышает скорость транскрипции гена. Большая часть дрожжевых трансактиваторов обладает кислыми трансактиваторными доменами. У Rpn4p обнаружены два участка, обогащенных остатками кислых аминокислот, которые обозначены как N-концевой кислый домен (N-terminal Acidic Domain, NAD, позиции 211-229) и C-концевой кислый домен (C-terminal Acidic Domain, CAD, позиции 300-315) (Mannhaupt *et al.*, 1999). Предполагается, что эти участки и являются трансактиваторными доменами Rpn4p. Результаты наших экспериментов по делеционному анализу оказались совершенно неожиданными: без обоих кислых доменов фактор обладает активностью, хотя и в меньшей степени в сравнении с полноразмерным белком (рис. 4Б). Также оказалось, что удаление NAD либо не влияет на активность белка (рис. 4Б), или снижает ее (рис. 7), в то время как делеция CAD снижает активность Rpn4p (рис. 4Б) или инактивирует его (рис. 7). Результаты эксперимента по устойчивости клеток к стрессу (рис. 4Г) в основном согласуются с полученными данными: кислые домены, как по отдельности, так и вместе взятые не играют существенной роли в устойчивости клеток к действию MMS и циклогексимида, в то же время наличие обоих кислых доменов необходимо для устойчивости клеток к тяжелым металлам и пероксиду водорода. Из полученных данных можно сделать вывод о том, что, во-первых, CAD обладает большим трансактиваторным потенциалом, чем NAD, во-вторых, кислые домены играют разную роль при действии различных видов стресса, и, в-третьих, Rpn4p, видимо, помимо кислых доменов содержит еще один трансактиваторный домен.

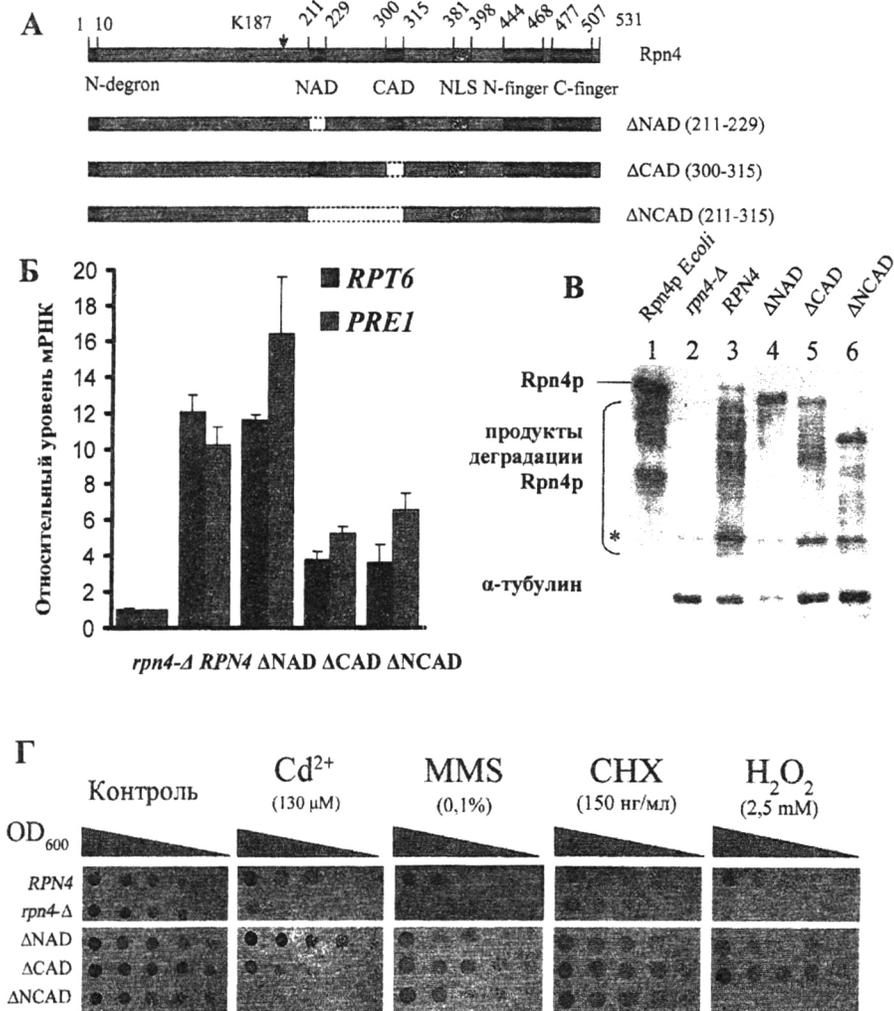


Рис. 4. Влияние делеций в центральной части Rpn4p на его активность. (А) Схема делеций в центральной части белка. (Б) Результаты ПЦР в реальном времени по определению относительного содержания мРНК протеасомных генов *RPT6* и *PRE1* в клетках дрожжей, синтезирующих мутантные формы Rpn4p под контролем *GAL1* промотора. Содержание мРНК протеасомных генов нормировано на содержание мРНК гена *PDA1*. (В) Определение уровня содержания мутантных белков методом Вестерн-блоттинга с кроличьими поликлональными антителами против Rpn4p. (Г) Устойчивость к стрессу дрожжевых клеток, синтезирующих делеционные производные Rpn4p (Δ NAD, Δ CAD, Δ NCAD).

Анализ N-концевой части Rpn4p.

Ранее было установлено, что в N-концевой области фактора находятся N-концевой сигнал убиквитин-независимой деградации (N-degron, первые десять аминокислот) (Ju and Xie, 2004) и остатки лизинов, по которым происходит полиубиквитинирование белка, из них преимущественным сайтом убиквитинирования является лизин 187 (Ju and Xie, 2006). Исходя из данных, полученных нами, можно предполагать, что эта область содержит также трансактиваторный домен. Чтобы определить границы этого домена, мы создали серию мутантов Rpn4p с делециями N-концевой области (рис.5). Мутантные белки были охарактеризованы на способность активировать транскрипцию, уровень содержания в клетке, способность связываться с ДНК и обеспечивать устойчивость клеток к стрессу. В результате мы обнаружили, что значительная разница в активности наблюдается при удалении 109 и 151 N-концевых аминокислот (Рис. 5Б и Рис. 7). В то же время уровень содержания обоих мутантных белков (без 109 и 151 аминокислот) в клетке практически одинаков (рис.5В) и оба мутанта обладают ДНК-связывающей активностью (рис.6). Что касается обеспечения устойчивости клеток, то в этом отношении оба мутанта не активны (рис. 5Г). Исходя из полученных результатов, мы заключили, что участок между 109 и 151 аминокислотами содержит предполагаемый N-трансактиваторный домен, однако для его функционирования также нужны прилегающие области.

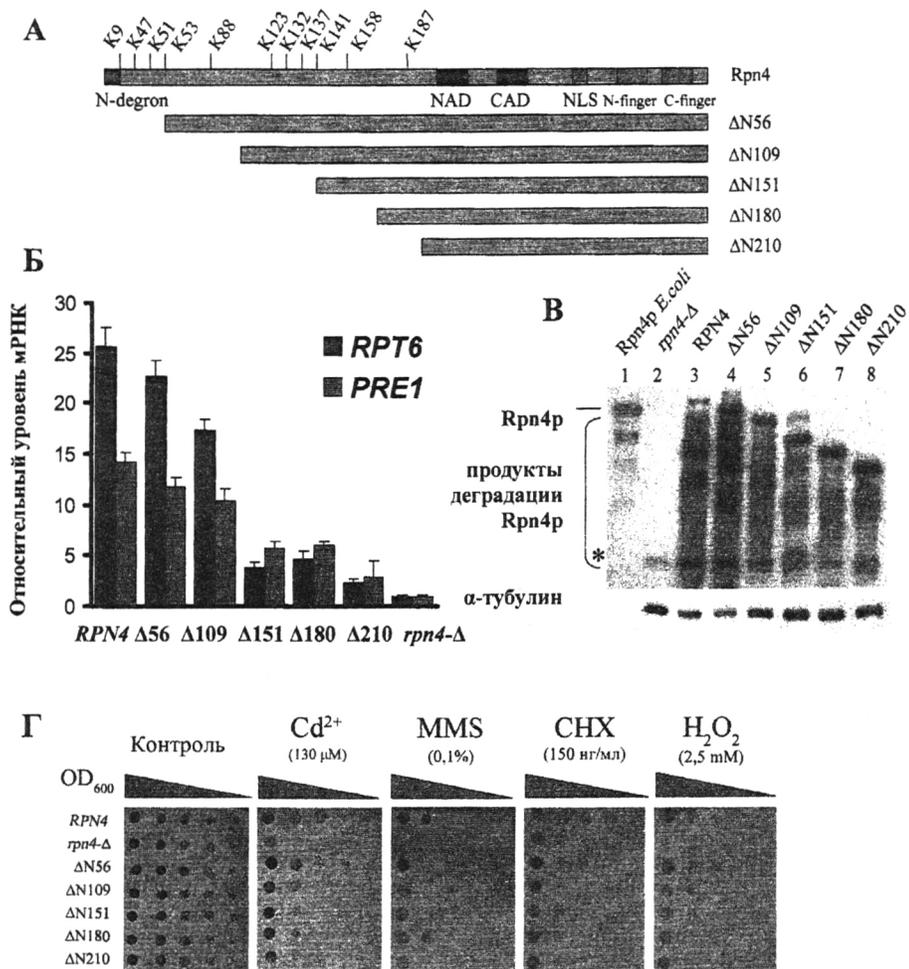


Рис. 5. Влияние делеций в N-концевой области Rpn4p на его активность. (А) Схема делеций в N-концевой области белка. (Б) Результаты ПЦР в реальном времени по определению содержания мРНК протеасомных генов *RPT6* и *PRE1* относительно количества мРНК гена *PDA1*. (В) Определение уровня содержания мутантных белков методом Вестерн-блоттинга с кроличьими поликлональными антителами против Rpn4p. На одну дорожку геля наносили материал, полученный из 2×10^5 клеток. Точкой отсчета для оценки количества мутантных производных Rpn4p служил α -тубулин, содержание которого в трансформированных штаммах считалось неизменным. (Г) Результаты теста на устойчивость к стрессу дрожжевых штаммов, синтезирующих делеционные производные Rpn4p ($\Delta N56$, $\Delta N109$, $\Delta N151$, $\Delta N180$, $\Delta N210$).

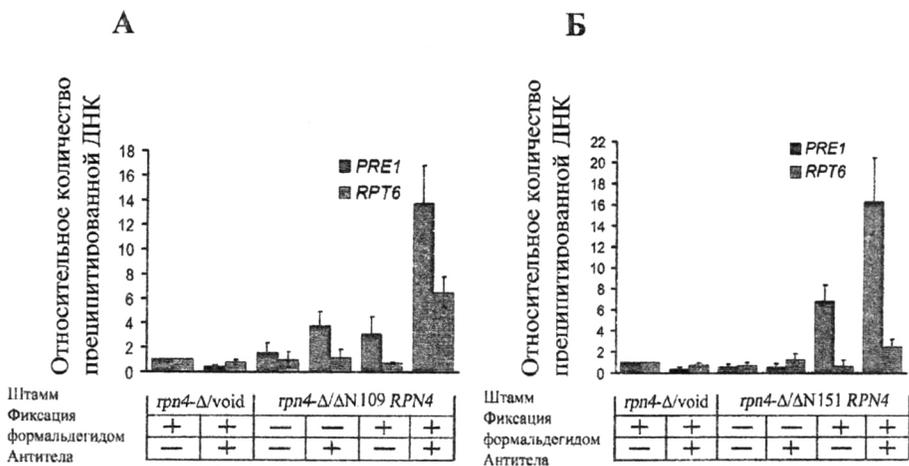


Рис. 6. ДНК-связывающая активность N-концевых мутантов Rpn4p. (А) Результаты эксперимента по фиксации и иммунопреципитации хроматина для мутанта $\Delta N109$. (Б) Результаты эксперимента по фиксации и иммунопреципитации хроматина для мутанта $\Delta N151$. При расчетах за единицу принято количество ДНК, полученной из лизата штамма *grn4-Δ* без добавления антител.

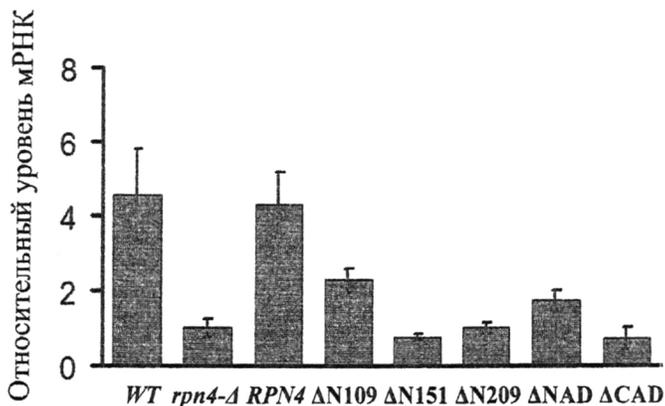


Рис. 7. Активность делеционных производных Rpn4p, синтезированных под контролем промотора *RPN4*. Показано содержание мРНК протеасомного гена *RPT4* относительно мРНК гена *PDA1*, определенное методом ПЦР в реальном времени в штамме *grn4-Δ*, синтезирующем мутантные формы Rpn4p.

Биоинформатический анализ N-концевой области Rpn4p.

Одним из способов получения информации о возможном механизме функционирования белка является поиск консервативных участков в его последовательности. Результаты выравнивания последовательностей гомологов Rpn4p (Mannhaupt and Feldmann, 2007) показали высокую степень гомологии N-концевой области среди близкородственных видов рода *Saccharomyces*. Однако, что касается других дрожжей, то консервативным является только N-концевой сигнал деградации, в то время как оставшаяся часть, включая NTAD, не имеет никакой значительной гомологии (рис. 8). Таким образом, NTAD не является эволюционно консервативным участком, поэтому по результатам биоинформатического анализа невозможно судить о механизме его функционирования.

Scer-RPN4 ---**MASTE~~LSLKR~~TLTDI~~LEDE~~LYHTNP~~GH~~SQFTSHYQNYHPNASITPYKLVNKNKENNFTWNHSLQHQN~~ESS~~**
Spar-RPN4 ---MASTE~~LSLKR~~TLTDI~~LEDE~~LYHTNP~~SH~~NQFAGHYQNYHPNASITPYKLVNKNKENN~~GF~~TWNHSSQ~~Q~~Q~~NESS~~
Sbay-RPN4 ---MASTE~~LSLKR~~TLTDI~~LEDE~~LYHTNP~~AH~~NQFAGHYQNYHPNASITPYKLVNKNKENN~~FT~~WNAP~~Q~~Q~~Q~~Q~~NESS~~
Skud-RPN4 ---MASTE~~LSLKR~~TLTDI~~LEDE~~LYHTNP~~AH~~NQF~~PG~~HYQNYHP~~NS~~SITPYKLVN~~SK~~ESNG~~FT~~WNH~~S~~Y~~Q~~Q~~Q~~Q~~NESS~~
Smik-RPN4 ---MASTE~~LGLKR~~TLTDI~~LEDE~~LYHTNP~~VH~~NQFAGHYQNYHPNASITPYKLVNKNKENN~~FT~~WSH~~P~~I~~A~~S~~DE~~Y~~FP~~N
Scas-RPN4 ---M~~AST~~DL~~FLRR~~TL~~DD~~V~~LEDE~~LYHLNS~~DC~~YQ~~DT~~SV~~Y~~PT~~Y~~Y~~NA~~AQ~~L~~PK~~ER~~LC~~NS~~QL~~SL~~CS~~PS~~SS~~S~~HT~~Q~~ANT~~ST~~
Klac-RPN4 ---MSA~~AD~~LE~~LR~~RT~~LD~~V~~DE~~LE~~RI~~HN~~T~~NP~~MS~~LD~~MG~~FG~~ET~~HY~~DS~~FP~~QL~~TR~~S~~Q~~VH~~S~~F~~Y~~T~~GP~~N~~F~~SS~~GH~~S~~H~~Q~~Y~~N~~M~~Q~~GL~~MG~~
Cgla-RPN4 ---MT~~S~~IDL~~GLKR~~TL~~DD~~V~~LEDE~~LYNM~~RL~~RE~~Q~~ETA~~Q~~-----EQ~~LD~~LE~~AG~~
Dhan-RPN4 ---MT~~S~~LI~~I~~PR~~M~~K~~KT~~IS~~DI~~M~~DE~~LE~~Y~~EV~~P~~ES~~P~~I~~Q~~AQ~~G~~-GR~~S~~DS~~P~~K~~P~~YL~~K~~RTI~~S~~N~~AG~~NS~~G~~NS~~I~~T~~G~~N~~Q~~MY~~G~~SM~~N~~GS~~G~~NN
Ylip-RPN4 ---M~~NT~~T~~D~~GS~~R~~N~~F~~LD~~PH~~SP~~K~~L~~T~~PK~~N~~N~~G~~LS~~L~~Y~~S~~T-----N~~NS~~S~~S~~T~~S~~V~~H~~S~~T~~N~~P~~Q~~S~~H~~M~~I~~A~~S~~D~~E~~Y~~F~~P~~N
Calb-RPN4 ---M~~T~~S~~L~~A~~I~~L~~P~~Q~~L~~K~~R~~T~~I~~D~~I~~M~~DE~~LE~~Y~~Q~~S~~PS~~S~~PN~~S~~M~~T~~S---FP~~S~~GT~~G~~N---L~~M~~S~~N~~T~~N~~H~~N~~T~~F~~N~~Q~~S~~N~~N~~T~~P~~F~~N~~M~~N---Y~~N~~H~~I~~S~~N~~
Cdub-RPN4 ---M~~T~~S~~L~~A~~I~~L~~P~~Q~~L~~K~~R~~T~~I~~D~~I~~M~~DE~~LE~~Y~~Q~~S~~PS~~S~~PN~~S~~M~~T~~S---FP~~S~~GT~~A~~N---L~~M~~S~~N~~T~~N~~H~~N~~T~~F~~N~~Q~~S~~N~~N~~T~~P~~F~~N~~M~~N~~S~~N~~M~~N~~H~~A~~S~~N

Scer-RPN4 -----AASIP~~P~~Q~~Q~~ TYH~~F~~FI~~F~~N~~K~~YAD~~P~~TL~~T~~T~~T~~T~~T~~S~~F~~T~~T~~SEAT~~ANDRQIN~~---NV~~HLI~~P~~NE~~I~~K~~GA~~S~~-----
Spar-RPN4 -----AASIP~~P~~Q~~Q~~ TFH~~F~~FI~~F~~N~~K~~YAD~~P~~TL~~T~~T~~T~~T~~T~~S~~F~~T~~N~~GEG~~P~~AND~~K~~Q~~I~~N---NV~~HLI~~P~~NE~~V~~K~~S~~V~~S-----
Sbay-RPN4 -----TASL~~P~~P~~Q~~Q~~Q~~ TYH~~F~~FI~~F~~N~~K~~YAD~~P~~TL~~T~~T~~T~~SL~~T~~NGEA~~A~~AND~~K~~Q~~V~~V~~G~~NN~~V~~HLI~~P~~NE~~S~~KA~~A~~N-----
Skud-RPN4 -----APSIP~~P~~Q~~Q~~ TYH~~F~~FI~~F~~N~~K~~YAD~~P~~TL~~T~~T~~T~~S~~F~~T~~S~~GEAT~~T~~ND~~R~~Q~~I~~N---NV~~HLI~~P~~NE~~A~~K~~TAA-----
Smik-RPN4 -----VASIP~~P~~Q~~Q~~ TYH~~F~~FI~~F~~N~~K~~YAD~~P~~TL~~T~~T~~T~~T~~F~~T~~N~~G~~D~~T~~ANDRQIS~~---NV~~HLI~~P~~NE~~I~~K~~N~~V~~N-----
Scas-RPN4 NSPAASVIANNEN~~P~~TSY~~F~~N~~V~~N LQ~~D~~LM~~F~~S~~K~~YAD~~P~~SL~~T~~T~~T~~T~~T~~TK~~D~~K~~E~~R~~E~~K~~K~~NN---IN~~K~~L~~N~~F~~H~~I~~Q~~R~~N~~---HR~~N~~
Klac-RPN4 -----HDL~~H~~SD~~D~~ DTAS~~G~~V~~F~~N~~K~~YAD~~P~~N~~L~~T~~L~~DK~~K~~SG~~C~~AV~~P~~AT~~G~~PG~~P~~T~~T~~GA~~AI~~V~~K~~Q~~V~~N~~L~~N-----
Cgla-RPN4 -----KVR~~Q~~V~~Q~~ LQQ~~Q~~MF~~S~~Q~~Y~~AD~~P~~SV~~T~~M~~M~~SG~~D~~V~~A~~CE~~G~~VL~~S~~TAPAN~~L~~L~~A~~N~~P~~DI~~R~~Q~~A~~PAP-----
Dhan-RPN4 -----LSS~~L~~LN~~I~~P DT~~F~~I~~D~~Q~~N~~RL~~N~~ST~~V~~N~~N~~GAG~~A~~G~~N~~GM~~G~~T~~G~~AG~~G~~E~~D~~Y~~T~~M~~V~~P---Q~~A~~Y~~N~~D~~E~~W~~Y~~G~~G~~ND---
Ylip-RPN4 -----L~~T~~P~~V~~Q~~T~~Q~~Q~~ SD~~Q~~F~~T~~E~~Y~~N~~P~~G~~L~~D~~V~~T~~Q~~Q~~H~~Y~~N~~M~~N~~M~~N~~M~~A~~MD~~P~~Q~~M~~D~~Y~~S~~Y~~L~~M~~K~~P~~Q~~Y~~P~~Y~~PC~~N~~Q~~D~~---
Calb-RPN4 -----R~~N~~S~~I~~N~~S~~S~~P~~ N~~L~~S~~A~~T~~T~~F~~N~~N~~A~~N~~L~~G~~N~~V~~L~~N~~I~~P~~D~~S~~F~~L~~E~~Q~~A~~S~~Q~~D~~Y~~I~~D~~H~~L~~K~~S~~Q~~Q~~Q~~Q~~Q~~A~~F~~E~~N~~P~~D~~D~~I~~Y~~
Cdub-RPN4 -----R~~N~~S~~I~~N~~S~~S~~P~~ N~~L~~S~~A~~T~~T~~F~~N~~N~~A~~N~~L~~G~~N~~V~~L~~N~~I~~P~~D~~S~~F~~L~~E~~Q~~A~~S~~Q~~D~~Y~~I~~D~~H~~L~~K~~S~~Q~~Q~~Q~~Q~~Q~~A~~F~~E~~N~~P~~D~~D~~I~~Y~~

Scer-RPN4 -----**ETPLQKT~~VN~~L~~N~~K~~N~~IM~~K~~VSD**-----**PYV~~P~~TR~~N~~T**FNY~~D~~V~~K~~I~~S~~N-----
Spar-RPN4 -----ETPLQKT~~VN~~L~~N~~K~~N~~IM~~K~~VSD-----PYV~~P~~TR~~N~~T~~F~~N~~Y~~D~~V~~K~~I~~S~~N~~-----
Sbay-RPN4 -----ETPLQKT~~V~~D~~L~~N~~K~~NIM~~K~~VSD-----PYV~~P~~TR~~N~~T~~F~~N~~Y~~D~~V~~K~~I~~S~~N~~-----
Skud-RPN4 -----ETPLQKT~~VN~~L~~N~~K~~N~~VM~~K~~VSD-----PYV~~P~~TR~~N~~I~~F~~N~~Y~~D~~V~~K~~I~~S~~N~~-----
Smik-RPN4 -----ETPLQKT~~VN~~L~~N~~K~~N~~IM~~K~~VSD-----PYV~~P~~TR~~N~~T~~F~~N~~Y~~D~~V~~K~~I~~S~~N~~-----
Scas-RPN4 -----LLAK~~V~~K~~T~~I~~N~~LR~~S~~I~~Q~~KE~~P~~R-----P~~N~~ES~~A~~P-----F~~V~~S~~N~~I~~I~~N-----
Klac-RPN4 -----L~~T~~P~~V~~Q~~P~~T~~I~~S~~L~~N~~T~~I~~T~~P~~N~~F~~L~~Q~~S~~S~~A~~R~~F~~P~~N~~A~~Q~~Q~~I~~P~~Q~~N~~N~~P~~N~~H~~H~~G~~M~~S~~N~~G~~R~~L~~N~~S~~V~~R
Cgla-RPN4 -----QA~~Q~~ML~~Q~~V~~N~~PE~~V~~L~~I~~S~~Y~~A~~N~~-----K~~N~~S~~A~~H~~M~~N~~V~~S~~A~~V~~D~~D~~K~~L~~N~~R~~G~~-----
Dhan-RPN4 -----V~~N~~P~~F~~T~~D~~Y~~G~~N~~P~~D~~S~~L~~S~~-T~~Q~~Q-----Q~~T~~H~~S~~F~~I~~Q~~P~~D-----
Ylip-RPN4 -----ML~~P~~L~~N~~D~~N~~N~~F~~A~~Q~~T~~L~~A~~P~~A~~D~~S-----
Calb-RPN4 VQ~~D~~V~~H~~E~~N~~Q~~V~~N~~F~~P~~N~~D~~Y~~G~~N~~P~~D~~S~~F~~I~~R~~A~~Q~~E-----Q~~Q~~S~~Q~~L~~P~~Q~~P~~Q~~P~~I~~S~~Q~~D~~D~~K~~R~~P~~Q~~S~~
Cdub-RPN4 VQ~~Q~~V~~H~~E~~N~~P~~V~~N~~F~~P~~N~~D~~Y~~G~~N~~P~~D~~S~~F~~I~~R~~A~~Q~~E-----Q~~Q~~S~~Q~~L~~P~~H~~P~~Q~~P~~I~~S~~Q~~Q~~E~~Q~~R-----

Рис. 8. Выравнивание последовательностей N-концевых областей гомологов Rpn4p (взято из Mannhaupt and Feldmann, 2007 с изменениями). Названия организмов Scer – *Saccharomyces cerevisiae*, Spar – *Saccharomyces paradoxus*, Sbay – *Saccharomyces bayanus*, Skud – *Saccharomyces kudriavzevii*, Smik – *Saccharomyces mikatae*, Scas – *Saccharomyces castellii*, Klac – *Klyuveromyces lactis*, Cgla – *Candida glabrata*, Dhan – *Debaryomyces hansenii*, Ylip – *Yarrowia lipolitica*, Calb – *Candida albicans*, Cdub – *Candida dublimiensis*. Последовательность N-концевого сигнала деградации выделена курсивом, последовательность N-трансаKTиваторного домена Rpn4p *S. cerevisiae* подчеркнута.

Мы обратили внимание на то, что NTAD содержит четыре лизина, которые, как было показано, являются альтернативными сайтами убиквитинирования белка, однако не играют важной роли в его деградации (Ju and Xie, 2006). Мы предположили, что убиквитинирование этих лизинов может регулировать активность Rpn4p. Для проверки нашего предположения при помощи сайт-направленного мутагенеза лизины были заменены аргининами, которые по физическим свойствам очень близки к остаткам лизина, но не могут подвергаться модификациям,

свойственным лизинам. Оказалось, что активность мутантного белка увеличилась более чем в четыре раза, тогда как его содержание в клетке не изменилось (Рис.9).

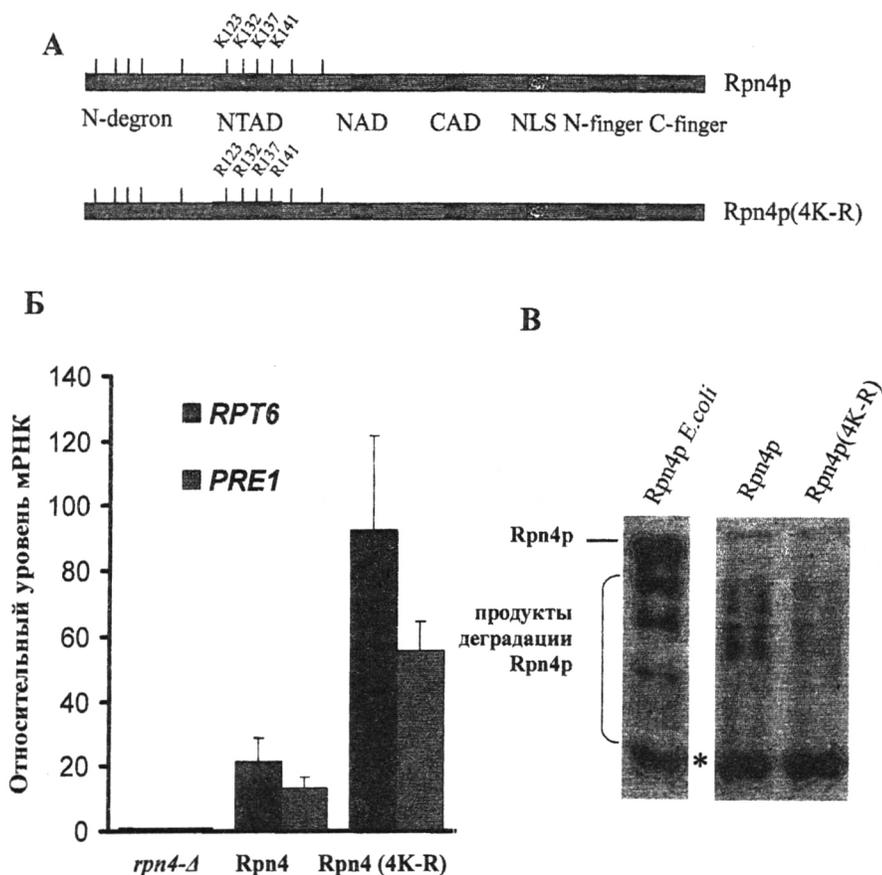


Рис. 9. Влияние замены лизинов на аргинины в предполагаемом N-трансактиваторном домене на активность Rpn4p. (А) Схема положений аминокислотных замен (Б) Результаты ПЦР в реальном времени по определению относительного уровня мРНК протеасомных генов. (В) Определение уровня содержания нативного и мутантного белков методом вестерн-блоттинга с кроличьими поликлональными антителами против Rpn4p.

Эти данные подтверждают наше предположение и указывают на то, что трансактиваторная активность Rpn4p может регулироваться убиквитинированием, не связанным с протеолизом. Однако лизины также могут ацетилироваться, метилироваться и т.д., поэтому в настоящее время нельзя исключить то, что какая-либо другая модификация лизинов влияет на активность Rpn4p.

Предполагаемые механизмы функционирования Rpn4p.

На основании результатов экспериментов мы предложили два возможных механизма регуляции транскрипции протеасомных генов с участием Rpn4p. Согласно первому механизму (рис. 10А) предположено существование белка, который кооперативно связывается с кислыми доменами и с NTAD. Модификация лизинов в NTAD ослабляет взаимодействие этого белка с Rpn4p, что ведет к ослаблению транскрипции. Согласно второму механизму (рис. 10Б) предполагается существование двух белковых факторов, один из которых связывается с NTAD, а другой с кислыми доменами. Взаимодействие первого фактора с Rpn4p ослабляется модификацией лизинов, что в итоге приводит к снижению уровня экспрессии гена.

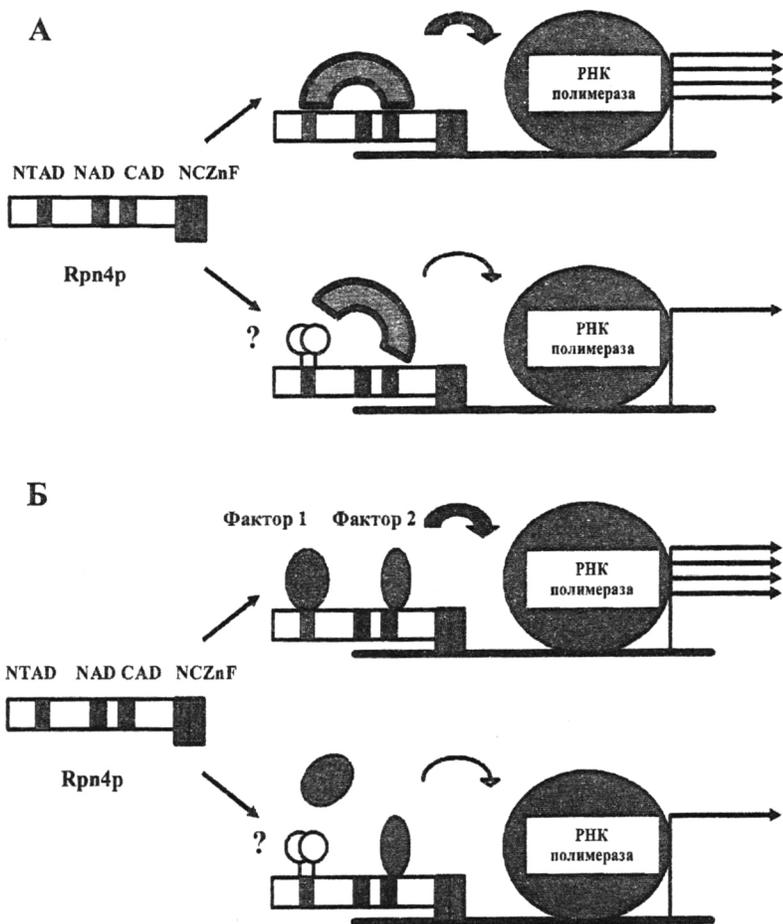


Рис. 10. Предполагаемые механизмы функционирования Rpn4p.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система координированного контроля транскрипции протеасомных генов у дрожжей *S. cerevisiae*, включающая транскрипционный фактор Rpn4p и его сайт связывания – PACE, является важной моделью для изучения регуляции экспрессии протеасомных генов у высших эукариот. Проведенный в данной работе структурно-

функциональный анализ Rpn4p углубляет представления о механизмах действия этого фактора и показывает, что Rpn4p может функционировать не только как транскрипционный фактор. В настоящее время увеличивается число транскрипционных факторов, для которых показано, что их активность регулируется убиквитином и убиквитин-подобными белками, причем по механизмам, не связанным с протеолизом. Возможно, Rpn4p также относится к этой группе факторов, поскольку на его трансактиваторную активность влияет модификация лизинов в N-концевом активационном домене (возможно, этой модификацией является убиквитин). Определение природы посттрансляционной модификации лизинов и конкретного механизма, по которому она влияет на активность Rpn4p, остается объектом дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. С-концевая область белка Rpn4p, содержащая ДНК-связывающие мотивы – цинковые пальцы, и N-концевая область, не имеющая гомологии с участками известных транскрипционных факторов, необходимы для активации транскрипции протеасомных генов.

2. N-концевая область Rpn4p обеспечивает устойчивость дрожжей к действию тяжелых металлов, алкилирующих агентов, циклогексимида и пероксиду водорода, тогда как С-концевая область фактора не играет важной роли при реагировании клеток на стресс, вызванный циклогексимидом и пероксидом водорода.

3. Делеция предполагаемого сигнала ядерной локализации не влияет на активность Rpn4p.

4. С-концевой кислый домен вносит больший вклад в активацию транскрипции, чем N-концевой.

5. Кислые домены Rpn4p по отдельности играют незначительную роль в устойчивости клеток к стрессу алкилирующими агентами и циклогексимидом, тогда как делеция обоих выражается в гиперчувствительности дрожжей к действию тяжелых металлов и пероксиду водорода.

6. В N-концевой области Rpn4p обнаружен ранее не известный активационный домен.

7. Активность N-концевого активационного домена негативно регулируется модификацией лизинов, не связанной с деградацией Rpn4p.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Карпов Д.С.**, Осипов С.А., Преображенская О.В., Карпов В.Л. 2008. Rpn4p – позитивный и негативный регулятор транскрипции убиквитин-протеасомной системы. *Молекуляр. Биология.* **42**, 518–525.
2. **Карпов Д.С.**, Тютяева В.В., Берестень С.Ф., Карпов В.Л. 2008. Картирование участков Rpn4p, ответственных за активацию транскрипции протеасомных генов. *Молекуляр. биология.* **42**, 526–532.
3. **Karpov D.S.**, Tutyayeva V.V., Karpov V.L. 2008. Mapping of yeast Rpn4p transactivation domains. *FEBS Lett.* **582**, 3459–3464.

Тезисы конференций

1. Карпов В.Л., Стародубова Е.С., **Карпов Д.С.**, Тютяева В.В. Механизмы регуляции убиквитин-протеасомного пути деградации белков в клетке// VI симпозиум «Химия протеолитических ферментов», посвященный памяти член-корр. РАН В. К. Антонова, Россия, Москва, 23-25 апреля, 2007 г. Стр. 42.
2. **Karpov D.**, Tutyayeva V., Karpov V. Role Domains of *Saccharomyces cerevisiae* Transcriptional Activator Rpn4 in Proteasome Genes Expression// The young scientists' and students' international scientific conference, Ukraine, Odesa, May 28-31.2007. P. 12.
3. **Karpov D.S.**, Tutyayeva V.V., Karpov V.L. Mapping of Rpn4 Functional Regions// Conference for young scientists, PhD students and students on Molecular Biology and

Genetics, dedicated to 120th anniversary of M.I. Vavilov, Ukraine, Kyiv, September 20-22, 2007. P. 63.

4. **Карпов Д.С.**, Тютяева В.В., Карпов В.Л. Картирование функционально важных участков Rpn4 – активатора транскрипции протеасомных генов *Saccharomyces cerevisiae*// 11-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21-го века», Пущино, 29 октября – 2 ноября 2007 г. Стр. 87.

5. **Карпов Д.С.**, Тютяева В.В., Карпов В.Л. Роль дрожжевого фактора RPN4 в регуляции транскрипции протеасомных генов// IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Россия, Новосибирск, 11-15 мая, 2008 г. Стр. 94.

6. **Karpov D.**, Tutyayeva V., Karpov V. Functional Dissection of Yeast Rpn4p, Activator of Proteasome Genes//12th International Congress on Yeasts, Ukraine, Kyiv, August 11-15, 2008. P. 146.

10-

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 06.02.2009 г.

Формат 60x90 1/16. Усл.печ.л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 062.

Тел. 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,

2-й учебный корпус, 627 к.